



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

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE DE INSETOS DAS
ORDENS LEPIDOPTERA E HEMIPTERA VIA COLONIZAÇÃO
SISTÊMICA POR *Bacillus thuringiensis* EM ALGODOEIRO E
TOMATEIRO**

FLÁVIA SANTANA SOUZA DA COSTA

TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA/DF
OUTUBRO/2023



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

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE DE INSETOS DAS
ORDENS LEPIDOPTERA E HEMIPTERA VIA COLONIZAÇÃO
SISTÊMICA POR *Bacillus thuringiensis* EM ALGODOEIRO E
TOMATEIRO**

FLÁVIA SANTANA SOUZA DA COSTA

ORIENTADORA: ROSE GOMES MONNERAT

TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA

PUBLICAÇÃO:

BRASÍLIA/DF
OUTUBRO/2023



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

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE DE INSETOS DAS
ORDENS LEPIDOPTERA E HEMIPTERA VIA COLONIZAÇÃO
SISTÊMICA POR *Bacillus thuringiensis* EM ALGODOEIRO E
TOMATEIRO**

FLÁVIA SANTANA SOUZA DA COSTA

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE DOUTOR EM AGRONOMIA.**

APROVADA POR:

**Rose Gomes Monnerat, Ph.D. Diretora de Pesquisa e Desenvolvimento SoluScience (Solubio
Tecnologias Agrícolas)**
(Orientadora)
e-mail: rose.monnerat@solubio.agr.br

Cristina Schetino Bastos, Prof^a Dra. Universidade de Brasília
(Examinador interno)
e-mail: cschetino@unb.br

Jean Kleber de Abreu Mattos, Prof. Dr. Universidade de Brasília
(Examinador interno)
e-mail: kleber@unb.br

Sandro Coelho Linhares Montalvão, Dr. Solubio Tecnologias Agrícolas
(Examinador externo)
e-mail: sandro.coelho@yahoo.com.br

Marcelo Tavares de Castro, Dr. Pesquisador SoluScience (Solubio Tecnologias Agrícolas)
(Examinador externo)
e-mail: marceloengflorestal@gmail.com
Brasília/DF, 16 de outubro de 2023.

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Flávia Santana Souza da.

Promoção de crescimento e controle de insetos das ordens Lepidoptera e Hemiptera via colonização sistêmica por *Bacillus thuringiensis* em algodoeiro e tomateiro. / Flávia Santana Souza da Costa; orientação de Rose Gomes Monnerat; Brasília, 2023.

196 p. : il.

Tese de Doutorado (D) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2023.

1. *Gossypium hirsutum*. 2. Colonização endofítica. 3. Crescimento de plantas. 4. Controle biológico. 5. *Solanum lycopersicum*. I. Monnerat, R. II. Título.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

COSTA, F. S. S. **Promoção de crescimento e controle de insetos das ordens Lepidoptera e Hemiptera via colonização sistêmica por *Bacillus thuringiensis* em algodoeiro e tomateiro.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2023, 196 p. Tese de Doutorado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Flávia Santana Souza da Costa

TÍTULO DA TESE: **Promoção de crescimento e controle de insetos das ordens Lepidoptera e Hemiptera via colonização sistêmica por *Bacillus thuringiensis* em algodoeiro e tomateiro.**

GRAU: Doutor

ANO: 2023

É concedida à Universidade de Brasília 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 a autorização por escrito do autor.

Flávia Santana Souza da Costa
CPF: 623.525.471-72
Tel.: (61) 9 9949.1302
e-mail: flaviasantana_agr@hotmail.com

*Dedico aos meus pais Lázaro e Íria,
ao meu companheiro e amigo Osmar
e às minhas filhas Hellen e Maria Clara
que me motivaram a seguir em frente.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus acima de todas as coisas.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Rose Monnerat pelos ensinamentos, pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela confiança e por sua amizade. Você me ensinou muita coisa e tem o meu respeito, meu carinho e admiração.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Dra. Lílian Praça e a Dra. Bárbara Eckstein pela amizade e contribuições no projeto. Ao Dr. Paulo Queiroz e à Dra. Érica Martins pelo incentivo de sempre e pela disponibilidade. Ao Dr. Marcelo Soares obrigada pela pessoa e pelo profissional que tu és.

À Ana Cristina Menezes pela gentileza e colaboração no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Embrapa-Cenargen.

Ao meu marido Osmar, minhas filhas Hellena e Maria Clara pela estrutura emocional, por estarem ao meu lado em cada tijolinho colocado na construção deste sonho e por fazer parte da minha vida. Eu amo tanto vocês!

Aos meus pais Lázaro de Souza e Iria Santana pela base e cuidados com a minha formação, e aos meus irmãos por sempre acreditarem no meu trabalho.

A todos os meus amigos e colegas do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa-Cenargen: Cris Macedo, Carla Caixeta, Fernanda Bernardes, Neila Damasceno, Zezinho, Janaína Hirbs, Amanda Stefanello, Sulian, Briana, Marcel, Marina, Marcela, Zonaite, Isabela, Helinho, Laura, Thaís Baraviera, Vinícius, Melina, Jônatas, Alyne, Evelin, Fabiano, Ivan, Marcelo Breçot e Raul.

Ao amigo Dr. Sandro Montalvão pela amizade e pelos conhecimentos compartilhados que me ajudaram a evoluir como pessoa e como profissional. Sinto admiração e orgulho do ser humano que você representa.

Ao Dr. Marcelo Tavares de Castro, pela suas contribuições, pela generosidade em compartilhar seus conhecimentos, por estar sempre presente com tamanha energia. Agradeço ainda mais pela amizade genuína que construímos.

A Daniela Sousa pela contribuição, pelos ensinamentos e auxílio nos trabalhos.

Aos Professores Dr. Jean Kleber Mattos e Dra. Cristina Schetino pela disponibilidade e pelas contribuições para este trabalho.

Aos funcionários dos Departamentos de Controle Biológico com quem tive o prazer de conviver.

A todos os colegas do PPG de Agronomia da UnB, ao coordenador do curso Prof. Dr.^a Márcio de Carvalho Pires, agradeço por toda a atenção.

A todos que de uma maneira ou outra contribuíram para o trabalho do meu doutorado, eu agradeço imensamente.

Muito obrigada!

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE DE INSETOS DAS ORDENS LEPIDOPTERA E HEMIPTERA VIA COLONIZAÇÃO SISTÊMICA POR *Bacillus thuringiensis* EM ALGODOEIRO E TOMATEIRO

RESUMO GERAL

As toxinas Bt têm sido usadas como bioinseticidas no controle de insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, e algumas toxinas foram selecionadas para ácaros, nematóides e insetos sugadores (hemípteros). Foi demonstrado a capacidade de *Bacillus thuringiensis* em promover crescimento de plantas de algodão, além de possuir efeito tóxico sobre *Spodoptera frugiperda*. A descoberta desta capacidade colonizadora do Bt, abriu perspectivas para novos estudos em plantas e uso sobre insetos mastigadores e sugadores. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi: (a) avaliar o crescimento das plantas de algodão em função do método de inoculação por Bt e avaliar o potencial germinativo de cultivares de algodão submetidas ao tratamento de sementes com a bactéria; (b) avaliar o desenvolvimento de *S. frugiperda* alimentadas na sua fase larval com plantas de algodoeiro endofiticamente colonizadas com Bt, e verificar o comportamento de oviposição das mariposas; (c) testar a habilidade de *Bemisia tabaci* em adquirir Bt e testar a preferência de oviposição por plantas inoculadas e não inoculadas com Bt; (d) avaliar os efeitos da colonização do tomateiro por estirpes de Bt na capacidade promotora crescimento do vegetal e sua toxicidade sobre *Helicoverpa armigera*. Os ensaios realizados com plantas verificaram que o tratamento com Bt afetou positivamente o índice de velocidade de emergência e o desenvolvimento de plantas de algodoeiro com incremento de cerca de 30% no peso seco das raízes da cultivar IMA 1318 e 14% no peso de raízes da cultivar BRS 8H. Cerca de 40% dos genótipos testados foram afetados positivamente pelo uso de Bt no tratamento das sementes sendo que a matéria seca das plantas da cultivar IMA 6035 B2RF aumentou em torno de 30%. Quanto aos bioensaios com os insetos-praga foi observado que os tratamentos com Bt não influenciaram negativamente na duração e na viabilidade de *S. frugiperda*. Após o período de 72 horas, as plantas do tratamento testemunha apresentaram maior número de oviposições do que as plantas tratadas com a bactéria. No ensaio de translocação e aquisição de Bt por *B. tabaci* foi comprovada a colonização endofítica nas plantas de algodão com capacidade de ser adquirida por adultos e ninfas *B. tabaci* durante a alimentação. Além disso, plantas que foram tratadas com a estirpe S1806 apresentaram menor número de ovos de *B. tabaci*. O tomateiro colonizado por Bt não apresentou diferenças de crescimento em relação às plantas não colonizadas. A colonização e a translocação de Bt nas plantas de tomate foram confirmadas

pela visualização das suas estruturas por microscopia e pela recuperação do Bt das raízes, do caule e das folhas de plantas tratadas com a estirpe S1450. Foi verificado um percentual de 13,3% de mortalidade de larvas de *H. armigera* alimentadas em plantas de tomateiro inoculadas, mas não foi visualizado sintomas de intoxicação pela bactéria. Esses resultados mostram que o uso do Bt como colonizador e endofítico de plantas possui potencial no controle biológico de insetos-pragas e como promotor de crescimento de plantas de algodoeiro.

Palavras-chave: *Bacillus*, ação endofítica, biocontrole, promotor de crescimento de plantas

GROWTH PROMOTION AND CONTROL OF INSECTS OF THE ORDERS LEPIDOPTERA AND HEMIPTERA VIA SYSTEMIC COLONIZATION BY *Bacillus thuringiensis* IN COTTON AND TOMATO

OVERVIEW

Bacillus thuringiensis (Bt) toxins have been used as bioinsecticides in the control of insect's orders Coleoptera, Lepidoptera and Diptera, and some toxins were selected for mites, nematodes and in sucking insects of the order Hemiptera. The Bt demonstrated the ability to induce growth of cotton plants, furthermore, to have toxic effect against *Spodoptera frugiperda*. The discovery of this endophytic ability of Bt opened prospects for further studies using this bioinsecticide against chewing and sucking insects, as well as in other plants species. Thus, the objective of this study was: (a) to evaluate the growth of cotton plants according to the method of inoculation by Bt and to evaluate the germination potential of cotton cultivars submitted to seed treatment with the bacterium; (b) to evaluate the development of *S. frugiperda* fed in their larval phase with cotton plants endophytically colonized with Bt and to verify the oviposition behavior; (c) test the ability of *Bemisia tabaci* to acquire Bt and test the oviposition preference in inoculated and non-inoculated plants with Bt; (d) to evaluate the effects of tomato colonization by Bt strains on the growth promoter capacity and its toxicity on *Helicoverpa armigera*. Plant trials showed that Bt treatment positively affected the rate of emergence speed and the development of cotton plants with an increase of about 30% in the dry weight of the roots of the cultivar IMA 1318 and 14% in the weight of the roots of the cultivar BRS 8H. About 40% of the tested genotypes were positively affected by the use of Bt in the treatment of the seeds and the dry matter of the plants of the cultivar IMA 6035 B2RF increased around 30%. As for the bioassays with the pest insects, it was observed that the treatments with Bt did not negatively influence the duration and viability of *S. frugiperda*. After the 72 hour period, the plants of the control treatment had a higher number of ovipositions than the plants treated with the bacterium. In the assay of Bt translocation and acquisition by *B. tabaci*, the Bt endophytic colonization in cotton plants with the ability to be acquired by *B. tabaci* adults and nymphs during feeding was confirmed. Furthermore, plants that were treated with strain S1806 presented lower numbers of *B. tabaci* eggs. The tomato colonized with Bt showed no differences for the growth of the plants. The colonization and translocation by Bt in tomato plants were confirmed by visualization of their structures by microscopy and by Bt recovery of roots, stem and leaves of plants treated with strain S1450. A percentage of 13,3% mortality of

H. armigera larvae fed in the inoculated plant were verified, but no symptoms of bacterial intoxication were observed. These results show that the use of Bt as colonizer and endophytic of plants has potential in the biological control of insect pests and as growth promotion of cotton plants.

Keywords: *Bacillus*, endophytic action, biocontrol, plant growth promotion

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	
ABSTRACT.....	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 A cultura do algodoeiro.....	3
2.1.1 <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith)	8
2.1.2 <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius)	12
2.2 A cultura do tomateiro.....	14
2.2.1 <i>Helicoverpa armigera</i> Hübner	16
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner)	18
2.4 Microrganismos endofíticos.....	20
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

CAPÍTULO I – Promoção de crescimento vegetal por *Bacillus thuringiensis* em algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)

RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
1. INTRODUÇÃO.....	54

2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
2.1 Cultivo do material bacteriano.....	56
2.2 Descrição dos métodos de inoculação com <i>B. thuringiensis</i>	58
2.3 Interferência de métodos de inoculação com a estirpe S2122 de <i>B. thuringiensis</i> na promoção de crescimento de plantas de algodoeiro.....	59
2.3.1 Efeito promotor de crescimento de <i>B. thuringiensis</i> sobre a cultivar BRS 8H.....	59
2.3.2 Efeito promotor de crescimento de <i>B. thuringiensis</i> sobre a cultivar IMA 1318.....	61
2.3.3 Potencial germinativo de sementes de algodão tratadas com <i>B. thuringiensis</i>	62
2.4 Análise estatística.....	63
3. RESULTADOS.....	64
4. DISCUSSÃO.....	80
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

CAPÍTULO II – Inoculação de *Bacillus thuringiensis* em plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) e efeito sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)

RESUMO.....

ABSTRACT.....

1. INTRODUÇÃO.....	106
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	107
2.1 Condições experimentais de ensaios com <i>S. frugiperda</i>	107
2.1.1 Cultivo do material bacteriano.....	107

2.1.2 Preparo do material vegetal.....	108
2.1.3 Descrição dos métodos de inoculação.....	109
2.1.4 Criação de <i>S. frugiperda</i>	110
2.1.5 Desenvolvimento de <i>S. frugiperda</i> alimentadas na fase larval em plantas de algodoeiro colonizadas por <i>B. thuringiensis</i>	110
2.1.5.1 Fase larval e de pupas.....	110
2.1.5.2 Fase adulta de <i>S. frugiperda</i>	112
2.1.6 Comportamento de oviposição de <i>S. frugiperda</i> em plantas de algodão colonizadas por <i>B. thuringiensis</i>	113
2.1.6.1 Preparo do material vegetal.....	113
2.2 Condições experimentais dos ensaios com <i>B. tabaci</i> biótipo B.....	115
2.2.1 Criação de manutenção de <i>B. tabaci</i>	115
2.2.2 Teste de aquisição de <i>Bt-gfp</i> por <i>B. tabaci</i> em plantas de algodoeiro.....	115
2.2.3 Teste de oviposição de <i>B. tabaci</i> em plantas de algodoeiro inoculadas com <i>B. thuringiensis</i>	117
2.3 Análise estatística.....	118
3. RESULTADOS.....	119
4. DISCUSSÃO.....	130
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137

CAPÍTULO III – Efeito da colonização de *Bacillus thuringiensis* no crescimento vegetal do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) e sobre *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)

RESUMO.....

ABSTRACT.....

1. INTRODUÇÃO.....	152
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	154
2.1 Condições gerais ao ensaio.....	154
2.1.1 Cultivo do material bacteriano.....	154
2.1.2 Preparo das suspensões bacterianas.....	155
2.1.3 Condições gerais de cultivo.....	155
2.1.4 Inoculação das raízes de tomateiro.....	155
2.2 Avaliação da indução de crescimento de tomateiro por <i>B. thuringiensis</i>	156
2.3 Root Printing.....	157
2.4 Isolamento de <i>B. thuringiensis</i> das raízes, caule e folhas de plantas do	157
tomateiro.....	
2.5 Crescimento das estirpes S1450 e S2122 de <i>B. thuringiensis</i> recuperadas	158
de plantas inoculadas.....	
2.6 Microscopia eletrônica de varredura de plantas de tomate inoculadas com	159
a estirpe S1450 de <i>B. thuringiensis</i>	
2.7 Efeito de plantas de tomateiro inoculadas com a estirpe S1450 de <i>B.</i>	160
<i>thuringiensis</i> sobre <i>H. armigera</i>	
2.8 Análise estatística.....	160
3. RESULTADOS.....	161
4. DISCUSSÃO.....	170
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	175
ANEXOS.....	186

1 INTRODUÇÃO GERAL

Nos sistemas de produção agrícola, a cultura do algodoeiro é considerada uma das mais desafiadoras, devido à complexidade do manejo e ao elevado custo de produção. Ainda assim, o Brasil é um dos principais produtores e exportadores da fibra (Mapa, 2018; Abrapa, 2022). A tomaticultura é outra cultura que também enfrenta tais dificuldades na produção, possui elevada importância comercial e é a segunda hortaliça mais cultivada no mundo (Conab, 2019).

O aumento da população mundial vem elevando gradualmente a demanda por alimentos, roupas e combustíveis em todo o planeta. Até o ano de 2050, estima-se que a população mundial crescerá em dois a três bilhões atingindo um número cerca de 10 bilhões de pessoas. Para o ano de 2100 espera-se que a população ultrapasse 11,2 bilhões de habitantes (FAO, 2020). As expectativas das condições climáticas também são sabidamente um grande desafio para o desenvolvimento das plantas e as condições de sanidade dos cultivos (Embrapa, 2018).

Estas duas culturas, algodão e tomate, hospedam várias espécies de insetos-praga, obrigando o produtor a efetuar sucessivas pulverizações de pesticidas, muitas vezes, indiscriminadas (Moura et al., 2014; Silva et al., 2018). O controle destes insetos-praga é um dos fatores que mais oneram os custos de produção. A espécie *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) está presente no algodoeiro e sua injúria pode ser percebida durante todo ciclo da cultura, assim como a presença danosa de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) predominante em quase todo o território brasileiro (Miranda e Silva, 2022). A *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) obteve o status de praga em cultivos brasileiros, inclusive em cultivos de tomate e causou perdas econômicas significativas em vários estados brasileiros desde a sua introdução no país (Czepak et al., 2013; Pratisoli et al., 2015).

A ocorrência e permanência dessas pragas são beneficiadas pelos cultivos contínuos e sucessivos, predominantes no país, assim como o controle através do uso de inseticidas

sintéticos em larga escala (Boiça Junior, 2013; Embrapa, 2018). O controle de insetos-praga no algodão e no tomate, além de onerar os custos de produção pelo elevado número de aplicações de inseticidas sintéticos, levam à seleção de organismos-praga resistentes, riscos ambientais e à saúde humana (Moura et al., 2014; Gómez et al., 2018; Soberon et al., 2018).

À medida que há expansão da agricultura a demanda pelo uso de agrotóxicos cresce, verifica-se os efeitos negativos sobre o ambiente e sobre as populações alvo e não alvo desta forma de controle (Michaud et al., 2018; Souza et al., 2019). Um dos desafios para a sustentabilidade dos sistemas de produção agrícola está na busca por novas medidas ambientalmente amigáveis e que promovam mais resiliência dos cultivos (Embrapa, 2018).

O uso de microrganismos associados a plantas no controle de pragas e doenças tem sido apontado como um método seguro e uma alternativa sustentável para o manejo de pragas (Valicente, 2019; Rocha et al., 2023; Faria et al., 2023). Atualmente, o Brasil é referência mundial na utilização de defensivos agrícolas biológicos (CropLife Brasil, 2022). O uso do controle biológico apresenta vantagens em relação ao controle químico no que tange a preservação do ambiente, dos inimigos naturais, otimização do uso dos pesticidas sintéticos especialmente onde se observa perda de eficiência de controle e redução no uso dos pesticidas sintéticos (Parra e Coelho Jr., 2022).

Dentre as formas mais efetivas de controle, cita-se a adoção de produtos de baixo impacto, como os formulados à base de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), que podem produzir toxinas altamente específicas aos seus insetos-alvo, ao mesmo tempo em que são inócuas ao ser humano, aos vertebrados e plantas e não poluem o meio ambiente (Bravo et al., 2011; Monnerat et al., 2015).

Estudos indicam a possibilidade de uso do *B. thuringiensis* através da colonização de tecidos de plantas de algodão abrindo a possibilidade de uso endofítico deste organismo. Tais estudos verificaram que a estirpe padrão de *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 inoculada no solo

próximo às raízes de algodoeiro e de couve se espalhavam nos tecidos da parte aérea, chegando aos insetos que se alimentavam dessas plantas (Monnerat et al., 2009; da Costa et al., 2020). Os resultados apresentados mostram o potencial de pesquisa nessa área e comprovaram que estirpes de *B. thuringiensis* podem atuar como organismos endofíticos em plantas, promovendo o incremento no seu crescimento, além da sua reconhecida capacidade tóxica para lepidópteros-praga.

Portanto, novas tecnologias vêm sendo incorporadas ao sistema de produção na busca da garantia e elevação dos níveis atuais de produtividade, bem como na redução dos custos de produção no Brasil (Abrapa, 2015; Mapa, 2022). A utilização de microrganismos endofíticos na agricultura é uma ferramenta extremamente promissora que abre novas perspectivas de uso do *B. thuringiensis* no desenvolvimento de plantas e no controle de insetos que se alimentam dessas plantas (Praça et al., 2012, Cunha et al., 2017; García-Suárez et al., 2017; da Costa et al., 2020).

Os estudos propostos neste trabalho podem colaborar para um maior entendimento da interação hospedeiro sistemicamente colonizado pelo *B. thuringiensis* no crescimento de plantas de algodoeiro e de tomate, e no potencial tóxico sobre *S. frugiperda* e *H. armigera*, respectivamente. Podem permitir ainda avaliar o efeito do *B. thuringiensis* sobre o sugador *B. tabaci* em plantas de algodão inoculadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do algodoeiro

O algodão é uma dicotiledônea, da família Malvaceae, pertencente ao gênero *Gossypium*, composto por mais de 50 espécies (Laws, 2013). O gênero *Gossypium* está disperso em cinco continentes, e as espécies responsáveis por maior parte da produção mundial de algodão são *G. hirsutum* L. e *G. barbadense* L. (Barros et al., 2020).

Gossypium hirsutum, conhecido como algodão herbáceo ou anual, é a espécie de algodão mais cultivada em todo o mundo, responsável por cerca de 95% da produção mundial devido ao seu rendimento de fibras e por sua ampla adaptação ambiental (Lee e Fang, 2015). Todos os anos, uma média de 35 milhões de hectares de algodão é plantada em todo o planeta (Abrapa, 2022).

A fibra produzida pela planta de algodão é o principal produto e destinado, prioritariamente, à indústria têxtil. Os caroços são utilizados nas indústrias de alimentos e de rações, devido ao acúmulo de óleos e proteínas, é utilizado também como matéria-prima e transformado em energia renovável na fabricação de biodiesel (Mapa, 2020).

O algodão é um produto de grande importância social e econômica para o Brasil, pois a sua cadeia produtiva (têxtil, alimentação animal e humana, moda, entre outros) é importante fonte de renda e empregos (Mapa, 2019; Abrapa, 2022).

O Brasil tem se destacado entre os cinco maiores produtores mundiais da fibra ficando em quarta posição logo atrás da Índia, China, Estados Unidos e à frente do Paquistão, e o quinto maior em área plantada. Estes países responderam por 75% de toda a fibra produzida no mundo todo em 2021/2022. Atualmente, o Brasil é o segundo maior exportador e a China o maior mercado consumidor e importador mundial da fibra de algodão (ICAC, 2022).

A área de produção no Brasil foi de 1,6 milhão de hectares na safra 2021/2022, registrando uma produção de 2.815,40 em toneladas da pluma e a média de produtividade de 1.414,94 em kg da pluma por hectare. O país ocupa o primeiro lugar em produtividade em cultivo de sequeiro (Abrapa, 2022; Conab, 2022).

Os maiores produtores da pluma no Brasil se concentram no bioma Cerrado, representados por grandes grupos produtores localizados nos estados do Mato Grosso e Bahia. Estes dois estados são responsáveis por mais de 90% de toda a fibra produzida e juntos representam a maior área cultivada com 1,4 milhões de hectares (Conab, 2022). As demais

áreas produtoras de algodão estão localizadas principalmente nos estados do Maranhão, Goiás, Mato Grosso do Sul e Piauí (Conab, 2022).

O avanço da tecnologia pelo uso comercial de cultivares de algodão biotecnológicos e programas de manejo de pragas bem sucedidos contra pragas, têm contribuído para o desenvolvimento do setor e o aumento da produtividade (Adams, 2015). A adoção de cultivares transgênicos ou geneticamente modificadas contribuíram para o crescimento das lavouras de algodão, devido à expressiva redução de custos de produção e qualidade do produto (James, 2007; Gowda et al., 2016; Barros et al., 2020) sem que houvesse, proporcionalmente, expansão das áreas cultivadas.

A tecnologia que utiliza plantas transgênicas tem por características a tolerância a herbicidas e a resistência a insetos suscetíveis, e são uma solução eficiente e sustentável (Barros et al., 2020). As variedades de algodão que apresentam resistência a insetos-praga da ordem Lepidoptera, possuem genes que codificam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Plantas Bt/transgênicas), com benefícios constatados que incluem aumentos na produtividade, redução dos custos de manejo de pragas, redução na quantidade de uso de inseticidas e na intoxicação de trabalhadores a campo (Santos e Torres, 2010; Barroso et al., 2015).

O mercado de fibra branca obtida de cultivares transgênicas é o principal segmento explorado no Brasil e no mundo, porém as fibras naturais coloridas abrem novas oportunidades para pequenos agricultores do semiárido, que adotam manejos orgânicos ou agroecológicos (Barros et al., 2020).

A cada ano são registrados problemas recorrentes relativos à manifestação do ataque das pragas. Na última safra 2021/2022, além da incidência do bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), que continua sendo a principal praga da cultura, a *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), os ácaros fitófagos

e percevejos migrantes foram citados por sua grande importância nas lavouras de algodão (Miranda e Silva, 2022).

O algodoeiro atrai e hospeda um complexo significativo de pragas, as quais atacam as raízes, caule, folhas, botões florais, maçãs e capulhos que podem ocasionar prejuízos significativos à produção além de provocar preocupações quanto a sustentabilidade do sistema produtivo (Santos, 2001; Santos, 2007; Santos, 2015).

Dentre as pragas são citados com frequência causando danos no algodoeiro: o pulgão do algodoeiro *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae); tripes *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae); mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae); ácaro-rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae); ácaro-vermelho *Tetranychus ludeni* Zacher (Acari: Tetranychidae); ácaro-branco *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Acari: Tarsonemidae); percevejo-rajado *Horcias nobilellus* (Berg) (Hemiptera: Miridae); cochonilha *Planococcus minor* (Maskell) (Hemiptera: Pseudococcidae); a lagarta curuquerê *Alabama argillacea* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae); lagarta falsas-medideira *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae); *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae); lagartas-das-maçãs *Chloridea virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae); *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae); lagarta-rosada *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae); as lagartas do gênero *Spodoptera* spp. (Lepidoptera, Noctuidae); percevejo-manchador *Dysdercus* spp. (Hemiptera: Pyrrhocoridae); além de outros artrópodes que possuem importância secundária e incluem os percevejos migrantes da soja (Hemiptera: Pentatomidae), o percevejo-castanho *Scaptocoris castanea* Perty (Hemiptera: Cydnidae), a lagarta-rosca *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae) e a broca-da-raiz-do-algodão *Eutinobothrus brasiliensis* (Hambleton) (Coleoptera: Curculionidae) (Miranda e Suassuna, 2004; Pereira et al., 2006; Miranda, 2010; Ribeiro et al., 2015; Silva et al., 2018; Rabelo et al.,

2020). Dentre os insetos-praga do gênero *Spodoptera* a espécie *S. frugiperda* é a mais prevalente em áreas de cerrado e por essa razão foi selecionada para os estudos com Bt realizados nesse trabalho.

Um dos grandes desafios para atender à crescente demanda por fibras, é proteger a cultura das perdas causadas por estas pragas, preservando recursos naturais, mantendo a qualidade ambiental além da segurança da saúde humana (Naranjo et al., 2015).

Na cultura do algodoeiro, embora várias estratégias que compõem o manejo integrado sejam utilizadas para conter populações de pragas (monitoramento, utilização de diferentes táticas de controle incluindo controle químico, biológico, comportamental, cultural, legislativo e resistência hospedeira), o controle mais adotado ainda é o químico (Miranda e Silva, 2022). O controle de pragas por meio de inseticidas sintéticos de amplo espectro, de maneira sequencial, tem levado à seleção de organismos-praga resistentes, reduzindo a eficácia e a vida útil destes compostos, além de onerar excessivamente os custos de produção. O problema da resistência tem afetado a produção agrícola a nível mundial (Nauem et al., 2019).

Em 2013, de Lima e colaboradores já relatavam a elevação dos custos de produção devido às frequentes aplicações de inseticidas sintéticos de amplo espectro que somavam aproximadamente 15 pulverizações por safra da cultura. Na safra 2020/2021, foram efetuadas em média 26 aplicações de inseticidas sintéticos e biológicos nos cultivos de algodoeiro. Dentre estas aplicações o maior percentual foi direcionado a conter os surtos populacionais do bicudo (70%), seguido do controle de lagartas (20%) (Miranda e Silva, 2022).

As soluções biológicas utilizam agentes predadores, parasitoides e organismos entomopatogênicos (fungos, vírus e bactérias) para combater pragas que atacam as lavouras. Essa prática utiliza a gestão racional, que integrada ao manejo fitossanitário, contribui de forma eficiente na minimização dos atuais níveis de utilização de inseticidas sintéticos e promove a biodiversidade nos ambientes agrícolas (Anuário Brasileiro do Algodão, 2022).

Há uma grande disponibilidade de pessoas no Brasil envolvidas no uso de novas tecnologias que permitam o enfrentamento de condições climáticas adversas, de acordo como o Painel Intergovernamental para Mudança do Clima - IPCC (2019), que desafiam e afetam o desenvolvimento das plantas e as condições da sanidade dos cultivos (Embrapa, 2018; FAO, 2020). Cada vez mais se consolida a visão de que os produtos de base biológica podem compor diferentes e mais eficientes estratégias para o controle real integrado de pragas (Borsari e Vieira, 2022; Miranda e Silva, 2022).

2.1.1 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)

A lagarta *Spodoptera frugiperda* (Smith) é considerada praga-chave do milho e, a despeito desse fato, provoca injúria significativa no algodoeiro (Lepidoptera: Noctuidae) (Miranda, 2006).

Spodoptera frugiperda é uma espécie nativa das regiões tropicais e subtropicais da Américas, onde está geograficamente distribuída, se alimenta e se hospeda em uma ampla gama de plantas cultivadas (Luginbill, 1928). É considerada uma praga em grande expansão, pela frequência e intensidade dos prejuízos causados em regiões produtoras de algodão no cerrado brasileiro, que pode reduzir de forma significativa a produção (Miranda, 2006; Fontes et al., 2006; Santos, 2007; Santos et al., 2010; Nascimento et al., 2016).

Está presente em todas as áreas de cultivo do algodoeiro no Brasil (Degrande, 1998; Fontes et al., 2006). Plantas da família Poaceae estão entre as maiores hospedeiras da praga, com destaque para o milho (*Zea mays* L.), trigo (*Triticum* spp.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), milheto (*Pennisetum glaucum* L.) e as brachiárias (Bolzan et al., 2019). Apesar da preferência em se alimentar em espécies gramíneas, ela ataca outras culturas de importância econômica tais como a soja (*Glycine max* L.), a batata (*Solanum tuberosum* L.) e o amendoim (*Arachis hypogaea* L.) (Campos et al., 2012).

No sistema de cultivo atual em que existe sobreposição ou sucessão dos cultivos de soja, milho e algodão, existe uma oferta continuada de alimentos para espécies polípagas tais como *S. frugiperda* (Santos, 2001; Boiça Júnior et al., 2013), aumentando a sobrevivência e o número de gerações do inseto-praga. Além disso, outras causas estão envolvidas nas elevações das populações da espécie, como condições climáticas favoráveis (altas temperaturas e baixa umidade do ar), o plantio do algodão sobre a palhada de espécies gramíneas ou próximo às espécies hospedeiras, e as pulverizações excessivas e inadequadas de inseticidas (Soares e Araújo, 2001; Valicente e Fonseca, 2004; Miranda, 2006).

A lagarta de *S. frugiperda* causa injúria em todas as fases do desenvolvimento do algodoeiro, desde a emergência das plântulas (plantas jovens) até o amadurecimento dos frutos (Santos, 2001; Campos et al., 2012). As larvas cortam as plântulas na base do caule e reduzem o estande de plantas (Santos 2001; Santos et al., 2010; Campos et al., 2012). Com o desenvolvimento da cultura, as lagartas destroem folhas, necrosam as partes basais do caule, destroem o meristema do broto apical, perfuram botões florais, flores e maçãs (Degrande 1998; Santos, 2001; Miranda, 2006; Santos et al., 2010), resultando em comprometimento da produtividade e na qualidade da fibra (Campos et al., 2012).

O adulto de *S. frugiperda* é uma mariposa que apresenta hábito noturno, fazendo suas posturas durante a noite, ovipositando na maioria dos estádios fenológicos da planta, normalmente, na parte mediana da planta e preferencialmente na superfície inferior das folhas (Cruz, 1995; Boiça Júnior et al, 2013). A atividade diária das mariposas começa ao pôr-do-sol e atinge o pico entre duas e quatro horas mais tarde. O acasalamento ocorre nessa ocasião e a oviposição durante o terceiro e o quarto dia após a emergência da fêmea (Cruz, 1995; Moraes et al., 2015).

A fêmea oviposita de 500 a 600 ovos em camadas sobrepostas e o período de incubação é de cerca de três dias (Cruz et al., 1997; Miranda, 2006). Após a postura, os ovos de *S.*

frugiperda são de coloração verde-clara, passando a uma coloração alaranjada. Eles são recobertos por uma camada fina e longa de escamas, colocada pela fêmea por ocasião da postura (Cruz, 1995). As lagartas recém-emergidas permanecem junto à postura dos ovos, são esbranquiçadas antes de se alimentarem e esverdeadas após a alimentação (Cruz, 1995).

A lagarta de *S. frugiperda* apresenta variações nas colorações, de parda-escura, a esverdeada ou quase preta. O estágio larval possui seis instares de desenvolvimento, sendo completado em 12 a 30 dias, quando a lagarta pode medir cerca de 50 mm (Miranda, 2006; Silva et al., 2017; Lucchetta et al., 2022).

Após o término do período larval, as lagartas completamente desenvolvidas penetram no solo, onde se transformam em pré-pupas e posteriormente, em pupas, e não se alimentam (Miranda, 2010). A pupa possui tegumento transparente com as vísceras visíveis, nessa fase o corpo é frágil e muito sensível a danos (Miranda, 2010; Lucchetta et al., 2022). O período pupal pode variar de 8 a 25 dias, dependendo da temperatura do ambiente (Miranda, 2006).

Normalmente o controle da *S. frugiperda* é feito em grande escala através do uso de inseticidas sintéticos, pela utilização de cultivares resistentes e pelo uso de plantas geneticamente modificadas. O manejo do inseto com o uso de inseticidas é um dos métodos mais utilizados no Brasil para o controle da praga, sobretudo quando há altas infestações, mesmo mediante o uso da tecnologia Bt (Valicente et al., 2010; Campos et al., 2012; Moraes et al., 2015; Barroso et al., 2015; Barros et al., 2020; Miranda e Silva, 2022).

O controle também é possibilitado pelo uso de microrganismos como fungos, vírus e bactérias, patogênicos para *S. frugiperda*, liberação de espécies parasitóides e nematóides entomopatogênicos que são produzidos em escala industrial e disponíveis comercialmente (Agrofit, 2022). *Bacillus thuringiensis* (Bt) é o organismo base da maioria dos produtos biopesticidas disponíveis e mais explorados no controle de lepidópteros-praga (Agrofit, 2022). Larvas de *S. frugiperda* são suscetíveis a diferentes isolados de Bt (Monnerat et al., 2007; dos

Santos et al., 2009; Valicente et al., 2010; Cerqueira et al., 2016), e cada isolado, por sua vez, possui uma composição diferenciada de genes codificadores da proteína tóxica à praga.

Além dos bioinseticidas, as toxinas Bt ainda estão presentes nas plantas de algodoeiro transgênicas resistentes a lagartas. As plantas geneticamente modificadas produzem as toxinas inseticidas de Bt em seus tecidos devido à expressão dos genes (*cry1Ac*, *cry 2Ab*, *cry 2Ae* e *cry1F*) utilizados na construção dos seus eventos (Barroso et al., 2015; Yang et al., 2022).

Entretanto, apesar das vantagens econômicas e ambientais proporcionadas pelos transgênicos, existe atualmente grande preocupação com a evolução da resistência em populações de insetos-pragas que são alvos dos cultivos de Bt (Farias et al., 2014). Já foram relatadas populações de *S. frugiperda* apresentando resistência às plantas Bt (Farias et al., 2014; Monnerat et al., 2015). O problema da seleção de insetos resistentes é maior pois o milho, outra cultura de elevada importância econômica e abundante nos atuais sistemas agrícolas, é um hospedeiro preferencial de *S. frugiperda*, e plantas de milho transgênico também possuem os mesmos genes portadores das toxinas utilizada em algodoeiro (Barroso et al., 2015).

A contínua expressão de genes *cry* em grandes extensões de cultivos com plantas Bt exerce uma forte pressão e acelera a seleção para resistência das pragas-alvo (Zhang et al., 2013). Foi sugerido que a causa desta resistência estaria relacionada à perda de receptores do intestino médio ou à sua capacidade de ligação às proteínas (Tabashnik, 1994; Gómez et al., 2018). Assim, foi demonstrada que as toxinas expressas em plantas de milho Bt competiram entre si pela ligação aos receptores (Monnerat et al., 2015).

Uma forma eficiente de evitar ou retardar o desenvolvimento da resistência dos insetos à toxina é pela prática de cultivo das áreas de refúgio (com algodoeiros que não contenham toxina de Bt), nas proximidades das áreas de cultivos com algodoeiro transgênicos resistentes a insetos. Essa prática permite que a população dos insetos suscetíveis à toxina se multiplique,

mantendo os genes de resistência à toxina presente na população dos insetos sob baixa expressão (Barroso et al., 2015).

2.1.2 *Bemisia tabaci* (Gennadius)

Bemisia tabaci (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) é um inseto sugador de seiva, polífono e cosmopolita (Lourenção e Nagai, 1994).

As moscas-brancas têm o ciclo de vida que inclui: ovo, quatro instares ninfais e a fase adulta (Flint, 1995). Tanto os adultos quanto as ninfas possuem aparelho bucal do tipo picador-sugador, que é inserido até o floema, onde ocorre a sucção da seiva elaborada, de onde retiram o alimento (Villas Bôas et al., 2002).

Os adultos dessa espécie medem aproximadamente de um a dois milímetros de comprimento, o corpo é de coloração amarelo pálido e as fêmeas geralmente são maiores que o macho. A reprodução é sexuada ou assexuada, onde os ovos fertilizados originam descendentes fêmeas e as fêmeas não acasaladas colocam ovos não fertilizados originando descendentes machos (Byrne e Bellows, 1991).

As fêmeas de *B. tabaci* se alimentam e colocam os ovos preferencialmente na superfície abaxial das folhas, e os ovos encontram-se presos por meio de um pedicelo curto (Silva et al., 2013). Cada fêmea pode ovipositar de 100 a 300 ovos durante todo seu ciclo de vida (Brown e Bellows, 1992). Os ovos possuem coloração branca, posteriormente se tornam amarelados, e adquirem coloração marrom avermelhada quando as ninfas estão próximas de emergir (Byrne e Bellows, 1991; Silva et al., 2013).

Ao emergirem, as ninfas de *B. tabaci* passam por quatro instares, e as do primeiro instar são as únicas móveis, o que possibilita a localização de um ponto favorável para a sua alimentação e desenvolvimento (Simmons, 2002), tornando-se, em seguida, sésseis. No quarto e último instar, também denominado de “pupário”, caracterizado morfologicamente por

apresentar olhos de coloração vermelha, os indivíduos são transparentes o que possibilita a visualização do adulto próximo à emergência (Pessoa, 2015). A duração do ciclo de vida da mosca-branca varia de acordo com a espécie hospedeira, porém a temperatura é um dos fatores mais determinantes (Villas Bôas et al, 2002). Em algodoeiro, o ciclo de ovo a adulto para *B. tabaci* pode variar entre 17 e 28 dias, aproximadamente, conforme a temperatura (Powell e Bellows, 1992).

As injúrias causadas por *B. tabaci* no algodoeiro estão principalmente relacionadas à grande extração de seiva e, de forma indireta, pela transmissão de viroses, incluindo o “mosaico comum” (Abutilon mosaic vírus - AbMV) (Rodrigues e Vivan, 2007; Farroq et al., 2021). Além disso, o inseto ao se alimentar secreta uma substância açucarada e propicia o acúmulo do fungo responsável pela ocorrência da fumagina sobre as folhas, o que prejudica a fotossíntese, e sobre a pluma, provocando danos no beneficiamento e causando depreciação da qualidade da fibra (Lourenção et al., 1999; Toscano et al., 2003).

O método mais utilizado no controle de *B. tabaci* ocorre por meio da aplicação de inseticidas sintéticos que, quando utilizados indiscriminadamente, favorecem a seleção de populações resistentes e afetam diretamente a população de inimigos naturais (Navas-Castilho et al., 2011; Salazar-Magallon et al., 2015; Velasco et al., 2020).

A ampla distribuição da mosca branca também está relacionada à sistemas de cultivo que utilizam a rotação e sucessão de culturas hospedeiras durante todo o ano (Embrapa, 2018). Mais de 600 espécies são registradas como hospedeiras do gênero *Bemisia*, incluindo tanto plantas cultivadas quanto silvestres, que disponibilizam alimento continuamente permitindo que a praga não interrompa seu desenvolvimento e garantindo o contínuo crescimento populacional (Haji et al., 2004).

2.2 A cultura do tomateiro

O tomateiro, *Solanum lycopersicum* L., da família Solanaceae é uma planta herbácea e perene, sendo cultivada como anual. Pode apresentar crescimento determinado ou indeterminado, dependendo da cultivar, com ciclo variando de 90 a 120 dias. O caule é flexível com a necessidade de tutorar as plantas destinadas ao consumo *in natura* (Silva et al., 2010). O sistema radicular é constituído por raízes principal, secundárias e adventícias que alcançam até 20 cm de profundidade (Silva et al., 2010).

O tomateiro tem como centro primário de origem os países andinos da América do Sul, desde o Norte do Chile até a Colômbia (Jaramillo et al., 2007; Silva et al., 2010). No México, segundo centro de origem, o tomate passou a ser cultivado e domesticado por tribos indígenas primitivas e chegou ao Brasil por imigrantes europeus entre o século XVIII e XIX (Alvarenga, 2013).

Juntamente com a batata, o tomateiro é uma das hortaliças mais cultivadas no mundo. Encontra-se na segunda posição em área cultivada e a principal em volume industrializado comparado às demais olerícolas (Alvarenga, 2013; Conab, 2019). Considerada uma cultura cosmopolita devido a sua ampla capacidade adaptativa pois é cultivada nas mais diferentes latitudes geográficas (Filgueira, 2008).

Os maiores produtores mundiais de tomate são: a China, seguida pela Índia, Turquia, Estados Unidos, Egito, Irã, Itália, Espanha e México, respectivamente. O Brasil ocupa o décimo lugar no ranking mundial de maiores produtores dessa hortaliça (Faostat, 2020).

A safra brasileira de tomates ficou em torno de 3,6 milhões de toneladas em uma área de 51,9 mil hectares e com rendimento médio de 70,8 toneladas por hectare. Essa produção encontra-se dividida em “tomate rasteiro”, mais utilizado no processamento industrial para a produção de molhos e extratos, e “tomate estaqueado”, utilizado de forma *in natura*, nas cozinhas brasileiras (IBGE, 2022). Os maiores produtores são Goiás com 20,57% da produção

nacional, São Paulo com 18,90%, Minas Gerais com 14,13% e Bahia com 9,21% da produção nacional de tomate industrial e *in natura* (IBGE, 2022).

Apesar da grande expressão da tomaticultura no mundo, a espécie pode ser considerada uma das mais suscetíveis ao ataque de artrópodes-praga, devido à área foliar extensa e ao microclima gerado, propício ao desenvolvimento de organismos fitófagos, que causam prejuízos quanto à produtividade e reduzem seu valor comercial (Figueira, 2003; Alvarenga, 2013; Moura et al., 2014).

As espécies de artrópodes-praga ocorrem no cultivo desde a sementeira, após o transplante das mudas no campo, até a colheita dos frutos. A importância que cada uma dessas espécies assume para a cultura varia de acordo com a região e a época de cultivo (Moura et al., 2014). Neste contexto são citadas: moscas-brancas *Bemisia tabaci* (Gennadius) e *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae); tripes *Frankliniella* spp. e *Thrips* spp. (Thysanoptera: Thripidae); pulgões *Aphis gossypii* Glover, *Myzus persicae* (Sulzer) e *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera: Aphididae); traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae); broca pequena *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae); vaquinha *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae); mosca-minadora *Liriomyza* spp. (Diptera: Agromyzidae); lagarta rosca *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae); *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: Noctuidae); broca-gigante (complexo Heliothinae) *Helicoverpa armigera* Hübner, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae), *Chloridea virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae); lagarta-falsa-medideira (complexo Plusiinae) (*Chlysodeixis includens* (Walker), *Trichoplusia ni* (Hübner) e *Rachiplusia nu* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae); percevejo-da-perna-folhada *Leptoglossus zonatus* (Dallas) (Hemiptera: Coreidae); percevejo-do-tomate *Phthia picta* (Drury) (Hemiptera: Coreidae); os ácaros *Aculops lycopersici* (Masse) (Acari:

Eriophyidae); *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) e *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Acari: Tarsonemidae) (Moura et al., 2014; Michereff Filho et al., 2019).

Para mitigar os problemas de ordem fitossanitária associados à cultura do tomateiro, como a ocorrência destes insetos e ácaros-praga, que afetam significativamente o setor agrícola, as medidas de controle são realizadas em grande parte utilizando inseticidas e acaricidas sintéticos. Nesse sentido, o desenvolvimento de novas táticas de controle ambientalmente amigáveis pode contribuir com a crescente demanda pela produção de tomates de elevada qualidade e livres de contaminantes e, ao mesmo tempo, com respeito e observação à preservação do ambiente, e a saúde do consumidor e do trabalhador rural (Moura et al., 2014).

2.2.1 *Helicoverpa armigera* Hübner

Helicoverpa armigera Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das mais importantes pragas e de ampla distribuição geográfica que causa prejuízos em cultivos de importância econômica (Ali et al., 2009; Pratissoli et al., 2015).

Em 2013, houve a confirmação de sua ocorrência nas culturas da soja e do algodão nos estados de Goiás, Bahia e Mato Grosso, quando ocorreu o primeiro registro de *H. armigera* no continente americano (Czepak et al., 2013). Foi relatado também a ocorrência deste inseto em cultivos de tomate, no Estado do Espírito Santo (Pratissoli et al., 2015).

Na fase adulta, as fêmeas de *H. armigera* são capazes de ovipositar de 1000 a 1500 ovos num período de 12 a 15 dias. Os ovos são colocados isolados sobre talos, folhas, frutos e flores, preferencialmente na face superior da folha ou em superfícies mais ásperas (Czepak et al., 2013).

A fase larval de *H. armigera* possui seis instares e, em condições tropicais, a cor dos indivíduos varia entre branco-amarelado, aos tons de verde, marrons ao preto, com listras brancas longitudinais (Czepak et al., 2013). No primeiro e segundo instares as larvas são pouco

móveis e sua cápsula cefálica pode ser de tons marrons-escuros a preto. No quarto instar, a espécie apresenta no primeiro segmento abdominal o formato de “sela”, devido a presença de tubérculos abdominais escuros e visíveis (Czepak et al., 2013; Srinivasan et al., 2013).

Já no sexto instar as cores variam de acordo com a alimentação, predominando o amarelo-palha e o verde com listras marrons na lateral do tórax, abdômen e cabeça (Czepak et al., 2013). O ciclo completo do seu desenvolvimento é em torno de 30 dias e varia com a alimentação e com as condições climáticas (Guedes et al., 2013).

Helicoverpa armigera causa perdas severas em diferentes espécies de plantas entre espécies cultivadas e silvestres, incluindo diferentes culturas de interesse agrônômico como o algodão, sorgo, feijão, soja, milho, milheto e tomate (Moral Garcia, 2006; Ávila et al., 2013; Pratisoli et al., 2015). A lagarta pode infestar tanto a fase vegetativa quanto a fase reprodutiva das plantas, alimentando-se de folhas, caules, brotos, inflorescências, frutos e vagens (Pratisoli et al., 2015), mas possui preferência pelas estruturas reprodutivas (Ávila et al., 2013). A injúria direta causada às estruturas de floração e frutificação das plantas hospedeiras de *H. armigera* e o uso intensivo de inseticidas resultam em baixa produtividade e altos custos de controle, respectivamente (Fathipour e Naseri, 2011). Os prejuízos à cultura podem chegar a até 55% de perda da produção (Usman et al., 2013).

No mesmo período em que foram detectados surtos populacionais da praga no país, e em virtude da liberação emergencial do pesticida químico benzoato de emamectina pelo MAPA (Ministério da Agricultura e Pecuária), frente à ineficácia dos inseticidas disponíveis para o controle da praga, os biodefensivos à base de Bt foram uma boa solução encontrada para o manejo de *H. armigera* nas lavouras de todo o país (CropLife Brasil, 2022).

Ainda assim, o controle químico é um dos principais métodos empregados contra pragas na cultura do tomateiro em todo o mundo. No entanto, o uso de inseticidas como única ou principal tática de manejo pode ocasionar danos severos ao ambiente, como desequilíbrio

biológico, e danos à saúde do trabalhador rural e do consumidor, além do desenvolvimento de resistência a inseticidas sintéticos (Ali et al., 2009; Mamta et al., 2016).

2.3 *Bacillus thuringiensis* (Berliner)

Bacillus thuringiensis é uma bactéria da família Bacillaceae, gram-positiva com formato de bastonete, aeróbia podendo crescer facultativamente em anaerobiose e de ocorrência cosmopolita, sendo encontrada em todas as partes do mundo (Monnerat e Bravo, 2000; Monnerat et al., 2015). Seus esporos, que são suas estruturas de resistência, podem ser isolados em vários substratos tais como solo, rizosfera, filoplano, água fresca, grãos, superfície de plantas, teias de aranhas, insetos e crustáceos (Krywunczyk e Fast, 1980; Raymond et al., 2010; Bravo et al., 2011).

Esta bactéria foi isolada primeiramente em 1902, porém foi em 1960 que foi isolada uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, chamada de HD-1 (Dulmage, 1970), a qual apresentou toxicidade até 20 vezes superior às estirpes anteriormente utilizadas nos produtos comerciais. Atualmente, este isolado é empregado como padrão e como base de produtos no controle de lepidópteros-praga (Bravo et al., 2011; Palma et al., 2014; Gómez et al., 2018).

Esta bactéria se distingue de outras espécies de *Bacillus* pela capacidade de síntese de inclusões cristalinas, as quais contêm as proteínas inseticidas, conhecidas como as δ -endotoxinas ou protoxinas Cry (cristal) e protoxinas Cyt (citólítica), produzidas durante a fase de esporulação. Após serem ingeridas pelos insetos suscetíveis em sua fase imatura, essas protoxinas são solubilizadas e ativadas tanto pelo pH quanto pelas proteases existentes no intestino do inseto. Essa ação faz com que a estrutura do cristal seja ativada tomando uma conformação que possibilitará que ela seja reconhecida pelo receptor presente no intestino, promovendo a formação de um poro que altera a sua permeabilidade levando o inseto à morte por septicemia (Bravo et al., 2007; Soberón et al., 2018).

Os isolados de Bt produzem diferentes proteínas com ação tóxica e que são altamente específicas a diferentes ordens de insetos, principalmente Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (Bravo et al., 2005; Bideshi et al., 2013; Palma, et al. 2014). Também há relatos da sua ação tóxica sobre insetos da ordem Hemiptera (Torres-Quintero et al., 2016; Cabra e Hernandez Fernandez, 2019; Dorta et al., 2020; da Costa et al., 2020).

Para a agricultura a adoção do Bt traz muitas vantagens, pois essas bactérias são seguras para o meio ambiente, de fácil manipulação, são normalmente inócuas aos seres humanos e aos animais domésticos (Bravo et al., 2005). Os produtos à base de Bt são amplamente comercializados e utilizados em todo o mundo em programas de controle biológico. A inserção de genes de Bt em plantas, através da síntese de toxinas que conferem resistência a lepidópteros-praga, também é uma tecnologia difundida, incluindo na cotonicultura, que contribui para a conservação do seu potencial produtivo e é parte integrante das práticas de manejo mais sustentáveis (Anuário Brasileiro Algodão, 2022).

A grande maioria dos produtos à base de Bt são comercializados para controle de lepidópteros. Para o algodoeiro os bioinseticidas à base de Bt estão no rol de produtos disponibilizados para uso no controle de lagartas do complexo Heliothinae (*Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea* e *Chloridea virescens*), além de outros noctuídeos tais como *Alabama argillacea*, *Chrysodeixis includens* e *S. frugiperda* (Agrofit, 2022). Para a cultura do tomateiro o Bt também é o agente de controle biológico mais utilizado no controle de lagartas tais como *Tuta absoluta*, *Liriomiza spp.*, *Heliothis zea*, *Helicoverpa armigera* (Moura et al., 2014). Há também o desenvolvimento de linhagens de plantas do tomateiro com respostas de eficiência na resistência a insetos lepidopteros como acontece com a cultura do algodoeiro (Koul et al., 2014; Kumar et al., 2020).

2.4 Microrganismos endofíticos

Plantas são naturalmente associadas a microrganismos. Os organismos endofíticos são assim denominados por colonizarem os tecidos internos das plantas em alguma fase do seu ciclo de vida sem provocar quaisquer sintomas de danos às plantas hospedeiras (Azevedo e Araújo, 2007; Araújo et al., 2010; Hardoim et al., 2015; Wang et al., 2019; Rocha et al., 2021).

Espécies do gênero *Bacillus* são comuns entre os organismos residentes nos tecidos internos de várias espécies de plantas, incluindo o algodoeiro (McInroy e Kloepper, 1995; Reva et al., 2002; Monnerat et al., 2009).

Além de serem citados como potenciais agentes de biocontrole, as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* destacam-se por possuir grandes vantagens considerando a capacidade de sobreviver na rizosfera, colonizar as raízes das plantas e apresentar vários benefícios às culturas, tais como promoção de crescimento de plantas, disponibilização de nutrientes e hormônios vegetais, por seu efeito antagônico a fungos e nematoides, por indução de resistência a estresses bióticos e abióticos (Strobel e Long, 1998; Reva et al., 2002; Machado et al., 2012; Rao et al., 2017; Qiao et al., 2017; Rocha et al., 2023).

O crescimento vegetal promovido por bactérias endofíticas envolve mecanismos de fixação de nitrogênio, produção de fitormônio como auxinas, citocininas, giberelinas, e a regulação da síntese de etileno, além de uma variedade de outras moléculas bioativas, a solubilização de fosfatos, o controle biológico de patógenos, e o aumento da resistência vegetal a diferentes estresses abióticos (Oliveira et al., 2014).

Outra contribuição bastante interessante destas bactérias endofíticas é a capacidade de uso do seu potencial entomopatogênico em plantas colonizadas. Foi relatado por Praça et al. (2012) a atividade inseticida de plantas de repolho (*Brassica oleracea* L.) tratadas com Bt sobre *P. xylostella*. Esta atividade também foi descrita por Prabhakar e Bishop (2009) trabalhando com plantas de *Brassica campestris* var. *chinensis* colonizadas por Bt sobre *Pieris brassicae*

L. (Lepidoptera: Pieridae). Estudos realizados por Castro et al. (2019) relataram efeitos de controle de *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) pelo uso do Bt sistêmico em mudas de mogno (*Swietenia macrophylla* King). Plantas de algodoeiro foram endofiticamente colonizadas por estirpes de Bt com potencial efeito promotor no crescimento e sobre *S. frugiperda* (da Costa et al., 2020). A translocação de Bt em mudas de citros também foi verificada com efeito tóxico sobre ninfas de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Dorta et al. 2020).

Embora o entendimento da interação entre plantas e endófitos seja mais complexo, ainda são poucos os relatos que descrevem como as relações benéficas entre bactéria e planta são efetivamente firmados, definindo a ação de biocontrole sobre as pragas, além de não existir um padrão da dispersão desses microrganismos nos diferentes tecidos (Turner et al., 2013). Há a possibilidade até mesmo de que a complexidade química manifestada pelas plantas na interação possa manipular seus fenótipos e modificar sua relação com os insetos (Wittstock e Gerhenzon, 2002).

A associação de uma espécie bacteriana com uma determinada espécie vegetal envolve fatores bioquímicos de compatibilidade entre os genótipos vegetal e bacteriano que culminam na perpetuação do microrganismo e benefícios para a planta (Glick, 2012).

Assim, a utilização de microrganismos do gênero *Bacillus* com ação de biocontrole e/ou promoção de crescimento vem sendo estudada e é alternativa viável para sistemas de produção agrícolas economicamente sustentáveis (Sousa et al., 2009; Compant et al., 2010; Rocha et al. 2021; Pacífico et al., 2021; Agrofit, 2022).

3 PROBLEMÁTICA E RELEVÂNCIA

O Brasil é líder mundial na utilização de agrotóxicos sintéticos, e uma referência mundial na utilização de produtos biológicos no campo (Anvisa e UFPr, 2012; Pelaez et al., 2013;

Monnerat et al., 2015; CropLife Brasil, 2022). Uma das alternativas para o controle de pragas, em virtude dos diversos problemas proporcionados pelo uso indiscriminado desses produtos quimicamente sintetizados, tais como contaminação do ambiente, intoxicação dos trabalhadores rurais e seleção de populações resistentes de pragas aos princípios ativos, é o uso de produtos biológicos ou biodefensivos (Freire, 2015).

O volume de negócios de produtos para controle biológico atravessa um cenário muito positivo com demandas e oportunidades de crescimento em inovação e aperfeiçoamento de uso de biodefensivos para agricultura brasileira (Monnerat et al., 2015). O crescimento do mercado biológico é evidenciado pela maior oferta de ativos biológicos, novas formulações e técnicas de aplicação (CropLife Brasil, 2022). A adoção global de biodefensivos pelos agricultores cresceu 16% de 2015 a 2020; comparado ao setor de defensivos químicos essa taxa de crescimento foi de 1% no mesmo período. Entre os produtos biológicos registrados 64% possuem ingredientes ativos baseados em microrganismos (Mapa, 2022; CropLife Brasil, 2022).

As culturas do algodoeiro e do tomateiro são expostas a estresses bióticos e abióticos desde o estabelecimento da cultura do algodão e da fase inicial de produção de mudas de tomateiro, etapas fortemente ligadas à produtividade, até a colheita (Pareek et al., 2010; Naranjo et al., 2015; Silva et al., 2018). Tais fatores demonstram que são desejáveis medidas que auxiliem as culturas favorecendo condições ideais de estabelecimento e fitossanidade. Contudo, são frequentes os relatos dos custos com uso de inseticidas como sendo um dos mais onerosos para a produção destes cultivos (Moura et al., 2014; Miranda e Silva, 2022).

Do grande número de insetos que atacam a cultura do algodoeiro, o controle do lepidóptero-praga *S. frugiperda* e a praga sugadora *B. tabaci* tem se mostrado desafiador (Farroq et al., 2021; Miranda e Silva, 2022). Por outro lado, a lagarta *H. armigera* já foi identificada provocando prejuízos na cultura do tomateiro (Pratissoli et al., 2015).

O *Bacillus thuringiensis* é amplamente utilizado e já consolidado na agricultura (Palma et al., 2014; Monnerat et al., 2015; Gómez et al., 2018). No entanto, são poucos os relatos do uso de Bt colonizando plantas e induzindo respostas positivas tanto no crescimento de plantas como no potencial biocontrolador de insetos-praga.

Em pesquisa realizada por Monnerat et al. (2003) com estirpes de *B. thuringiensis* isoladas de plantas de algodão, constatou-se que a planta é capaz de absorver a bactéria aplicada no solo, protegendo-a contra insetos da ordem Lepidoptera. Estes resultados foram pioneiros e abriram perspectivas de uso do Bt nesta nova modalidade utilizando a colonização sistêmica na redução das desvantagens do produto que incluem a sensibilidade aos raios ultravioletas e a lavagem do bioproduto pela água das chuvas.

O entendimento dessa interação planta e bactéria, em especial a exploração do potencial de uso biotecnológico do microrganismo de interesse agrônômico, pode trazer múltiplos benefícios para a planta e com possibilidade de uso como táticas de controle biológico que auxiliem no manejo destes insetos-praga.

Assim sendo, as perspectivas de uso de *B. thuringiensis* colonizando sistemicamente plantas de interesse agrícola são promissoras. Para o alcance desses objetivos, são necessários esforços para entender os efeitos desta interação benéfica do Bt tóxico e planta sobre importantes pragas das culturas, e o estabelecimento de métodos de aplicação da bactéria para que respostas promotoras de crescimento vegetal e de controle sejam favorecidas.

4 HIPÓTESES

- A utilização de métodos de inoculação do *B. thuringiensis* em plantas de algodoeiro influenciam no desempenho do crescimento vegetal.
- Plantas de algodoeiro colonizadas por *B. thuringiensis* interferem no ciclo biológico de *S. frugiperda* e são reconhecidas diferentemente como hospedeiras para oviposição.

- *Bacillus thuringiensis* translocado na planta de algodão pode ser adquirido por *B. tabaci* e influenciar na sua oviposição.
- Estirpes de *B. thuringiensis* são capazes de colonizar plantas de tomate, induzir o crescimento das plantas e provocar toxicidade sobre *H. armigera*.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da colonização sistêmica por *B. thuringiensis* na promoção de crescimento de plantas de algodão e de tomate, e no controle de insetos das ordens Lepidoptera e Hemiptera.

5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento de plantas de algodão em função do método de inoculação por *B. thuringiensis* e avaliar o potencial germinativo de cultivares de algodão tratadas com a bactéria nas sementes.
- Avaliar o desenvolvimento de *S. frugiperda* alimentadas na sua fase larval com plantas de algodoeiro colonizadas com *B. thuringiensis* e verificar o comportamento de oviposição.
- Testar a capacidade de aquisição de *B. thuringiensis* por *B. tabaci* e testar a preferência de oviposição em plantas inoculadas com a bactéria.
- Avaliar a capacidade de colonização e promoção de crescimento de estirpes de *B. thuringiensis* em tomateiro e potencial tóxico sobre *H. armigera*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAPA - Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Relatório de produção do Algodão. Disponível <<https://www.abrapa.com.br/Paginas/Dados/Algodão%20no%20Brasil.aspx>>. Acesso em: 28 de setembro 2022.

ADAMS, G. M. Marketing and Economics. In Cotton, ed. D. D. Fang and R. G. Percy. Madison: Agronomy Monographs, 783-803, 2015.

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Acesso em 05 de outubro de 2022.

ALI, A.; CHOUDHURY, R. A. Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. Tunisian Journal of Plant Protection, 4: 99-106, 2009.

ALVARENGA, M. A. R. Tomate: Produção em Campo, Casa de Vegetação e Hidroponia. Lavras: UFLA. 455 p., 2013.

ANVISA, UFPr. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. ANVISA. Brasília, 11 de abril de 2012.

ANUÁRIO BRASILEIRO DO ALGODÃO. Benno Bernardo Kist... [et al.]. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz do Sul, 104 p., 2022.

ARAÚJO, W. L.; LACAVALA, P. T.; MARCO, J.; LIMA, A. O. S.; SOBRAL, J. K.; AZEVEDO, J. L.; PIZZARINI-KLEINER, A. P. Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. Piracicaba: Copiadora "Luiz de Queiroz", 2010.

ÁVILA, C. J.; VIVAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. Circular Técnica 23, Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS, 2013.

AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Ganguli, B. N.; Deshmukh, S. K. (eds) Fungi multifaceted microbes Anamaya, New Delhi, 189-207, 2007.

BARROS, M. A. L.; SILVA, C. R. C. D.; LIMA, L. M. D.; FARIAS, F. J. C.; RAMOS, G.A.; SANTOS, R. C. D. A review on evolution of cotton in Brazil: GM, white, and colored cultivars. Journal of Natural Fibers, 19: 209-221, 2020.

BARROSO, P. A. V.; HOFFMANN, L. V.; SUASSUNA, N. D.; FERREIRA, A. C. B. Algodoeiros transgênicos resistentes a insetos. In: Algodão no cerrado do Brasil. ABRAPA, Associação Brasileira dos Produtores de Algodão; ed. téc. Freire, E. C; ed. revisada e ampliada, 945p., 2015.

BIDESHI, D. K.; WALDROP, G.; FERNANDEZ-LUNA, M. T.; DIAZ-MENDOZA, M.; WIRTH, M. C.; JOHNSON, J. J.; PARQUE, H. W.; FEDERICI, B. A. Intermolecular

interaction between Cry2Aa and Cyt1Aa and its effect on larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. Journal of Microbiology and Biotechnology, Seoul, 23: 1107-1115, 2013.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; CAMPOS, Z. R.; CAMPOS, A. R.; VALÉRIO FILHO, W. V.; CAMPOS, O. R. *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in cotton: vertical distribution of egg masses, effects of adult density and plant age on oviposition behavior. Arquivos do Instituto Biológico, 80: 424-429. 2013.

BOLZAN, A.; PADOVEZ, F. E.; NASCIMENTO, A. R.; KAISER, I. S.; LIRA, E. C.; AMARAL, F. S.; KANNO, R. H.; MALAQUIAS, J. B.; OMOTO, C. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. Pest Management Science, 75: 2682-2689, 2019.

BORSARI, A. C. P.; VIEIRA, L. C. Mercado e perspectivas dos bioinsumos no Brasil. In: Bioinsumos na cultura da soja. Meyer, M. C. et al. editores técnicos. Brasília, DF: Embrapa, 550p. 2022.

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, 175-206, 2005.

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

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41: 423-431. 2011.

BROWN, J. K.; BIRD, J. Whitefly transmitted gemminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean basin. *Plant Disease*, Saint Paul, 76: 220-225, 1992.

BYRNE, D. N.; BELLOWS JR, T. S. Whitefly biology. *Annual Review of Entomology*, 36: 431-457, 1991.

CABRA, E. T.; HERNANDEZ FERNANDEZ, J. A. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* Colombian native strains against *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of Plant Protection Research*, 503-511, 2019.

CAMPOS, Z. R.; BOIÇA-JÚNIOR, A. L.; VALÉRIO FILHO, W. V.; CAMPOS, O. R.; CAMPOS, A. R. The feeding preferences of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton plant varieties. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 34: 125-130, 2012.

CASTRO, M.T.; MONTALVÃO, S.C.L.; MONNERAT, R.G. Control of mahogany shoot borer, *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae), with *Bacillus thuringiensis* in a systemic way. *Nativa*, 7: 426-430, 2019.

CERQUEIRA, F. B.; ALVES, G. B.; CORRÊA, R. F. T.; MARTINS, E. S.; BARBOSA, L. C. B.; DO NASCIMENTO, I. R.; MONNERAT, R. G.; RIBEIRO, B. M.; AGUIAR, R.D.S. Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with a high insecticidal activity

against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bioscience Journal*, 32: 1522-1536, 2016.

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*, 42: 669-678, 2010.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Tomate: Análise dos Indicadores da Produção e Comercialização no Mercado Mundial, Brasileiro e Catarinense. *Compêndio de Estudos Conab*, Brasília, DF, v. 21, 2019.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Safra 2022/2023: Produção de grãos pode chegar a 308 milhões de toneladas impulsionada pela boa rentabilidade de milho, soja e algodão. Disponível < ww.conab.gov.br/ultimas-noticias/4731-safra-2022-23-producao-de-graos-pode-chegar-a-308-milhoes-de-toneladas-impulsionada-pela-boia-rentabilidade-de-milho-soja-e-algodao>. Acesso em 08 de julho de 2023.

CROPLIFE BRASIL. O agronegócio está ciente da importância dos produtos biológicos. Disponível: <https://croplifebrasil.org/noticias/produtos-biologicos-e-agricultura-de-baixo-carbono/>. Acesso em 09 de agosto de 2022.

CRUZ, I.; VALICENTE, F. H.; SANTOS, I. P. dos; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A. Manual de identificação de pragas da cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 71p., 1997.

CRUZ, I. A lagarta do cartucho na cultura do milho. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. Sete Lagoas: EMBRAPA, 45 p., 1995.

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

CUNHA, T.; DORTA, S. O.; MONNERAT, R. *Bacillus thuringiensis* translocation inside citrus plants and insecticidal activity against *Diaphorina citri*, vector of HLB causal agents. In: Hemipteran-Plant Interactions Symposium. From sub-cellular hemipteran-host plant-pathogen interactions to pest/disease management: book of abstracts... Madri: ICA-CSIC, 3, 2017.

DA COSTA, F. S. S.; PRAÇA, L. B.; GOMES, A. C. M. M.; DOS SANTOS, R. C.; SOARES, C. M. S.; MONNERAT, R. G. *Bacillus thuringiensis* Effect on the Vegetative Development of Cotton Plants and the Biocontrol of *Spodoptera frugiperda*. Agronomy, 10: 1889, 2020.

DEGRANDE, P. E. Guia prático de controle das pragas do algodoeiro. Dourados: UFMS, 1998.

DE LIMA JR, I. S.; DEGRANDE, P. E.; MIRANDA, J. E.; DOS SANTOS, W. J. Evaluation of the boll weevil *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) suppression program in the state of Goiás, Brazil. Neotropical entomology, 42: 82-88, 2013.

DE MELO, L. H.; ROCHA, F. Y.; VIDAL, M. S.; DE MEDEIROS GITAHY, P.; ARRUDA, G. M.; BARRETO, C. P.; ALVES, P. B.; DE ALMEIDA RAMOS, E. T.; ROSSI, C. N.; SCHWAB, S.; SORTE, P. M. Diversity and biotechnological potential of endophytic *Bacillus*

species originating from the stem apoplast fluid of sugarcane plants. *Applied Soil Ecology*. 1: 103985, 2021.

DORTA, S. D. O.; BALBINOTTE, J.; MONNERAT, R.; LOPES, J. R. S.; DA CUNHA, T.; ZANARDI, O. Z.; DE MIRANDA, M. P.; MACHADO, M. A.; DE FREITAS-ASTÚA, J. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains in citrus and their pathogenicity to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) nymphs. *Insect science*, 27: 519-530, 2020.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Visão 2030: o futuro da agricultura brasileira. Embrapa, Brasília, DF, 212 p., 2018.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Production quantity for culture. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>>. Acesso em 09 de outubro, 2022.

FARIA, M.; MASCARIN, G. M.; BUTT, T.; LOPES, R. B. On-farm production of microbial entomopathogens for use in agriculture: Brazil as a case study. *Neotropical Entomology*, 52: 122-133, 2023.

FARIAS, J. R.; ANDOW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; SORGATTO, R. J.; FRESIA, P.; DOS SANTOS, A. C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop protection*, 64: 150-158, 2014.

FAROOQ, M.; SHAKEEL, M.; SHAHZAD, U.; KHAN, B. S.; SHAHID, M. R. Comparative Demographic Traits of the Whitefly (*Bemisia tabaci*) B Biotype against different Host Plants. *International Journal Agricultural Biology*, 25: 460- 468, 2021.

FATHIPOUR Y; NASERI B. Soybean cultivars affecting performance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). In: Ng, T. B., ed. *Soybean-Biochemistry, Chemistry and Physiology*. Rijeka: InTech., 599-630, 2011.

FILGUEIRA, F.A.R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3ª ed. Viçosa, MG: UFV, 421 p., 2008.

FLINT, M. L. Whiteflies in California: a resource for cooperative extension. California: University of California. Statewide Integrated Pest Management Project. Division of Agriculture and Natural Resources, 1995.

FONTES, E. M. G.; RAMALHO, F. S.; UNDERWOOD, E.; BARROSO, P. A. V.; SIMON, M. F.; SUJII, E. R.; PIRES, C. S. S.; BELTRÃO, N. E. M.; LUCENA, W. A. S.; FREIRE, E. C. The cotton agriculture context in Brazil, p.133-154. In: Hilbeck, A., Andow, D. A., Fontes, E. M. G. eds., *Environmental risk assessment of genetically modified organisms: methodologies for assessing Bt cotton in Brazil*, Oxfordshire, CABI Publishing, 373p. 2006.

FREIRE, E. C. F. Algodão no cerrado do Brasil. ABRAPA, 2015.

GARCÍA-SUÁREZ, R.; VERDUZCO-ROSAS, L. A.; DEL RINCÓN-CASTRO, M. C.; DÉLANO-FRIER, J. P.; IBARRA, J. E. Translocation of *Bacillus thuringiensis* in *Phaseolus*

vulgaris tissues and vertical transmission in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Applied Microbiology, 122: 1092-1100, 2017.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications, Scientifica, article id 963401, 2012.

GÓMEZ, I.; OCELOTL, J.; SÁNCHEZ, J.; LIMA, C.; MARTINS, E.; ROSALES-JUÁREZ, A.; AGUILAR-MEDEL, S.; ABAD, A.; DONG, H.; MONNERAT, R.; PEÑA, G. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry1Fa toxicity to *Spodoptera frugiperda* by domain III mutations indicates there are two limiting steps in toxicity as defined by receptor binding and protein stability. Applied and Environmental Microbiology, 84: e01393-18, 2018.

GOWDA, A.; RYDEL, T. J.; WOLLACOTT, A. M.; BROWN, R. S.; AKBAR, W.; CLARK, T. L.; FLASINSKI, S.; NAGEOTTE, J. R.; READ, A. C.; SHI, X.; WERNER, B. J. A transgenic approach for controlling *Lygus* in cotton. Nature communications, 7: 1-7, 2016.

GUEDES, J. V. C.; ARNEMANN, J. A.; PERINI, C. R.; ARRUE, A.; ROHRIG, A. Manejar ou perder. Revista Cultivar Grandes Culturas, Pelotas, edição especial, 176, 12-16, 2013.

HAJI, F. N. P.; LIMA, M. F.; FERREIRA, R. C. F.; MOREIRA, A. N.; ALENCAR, J. A. de; KIILL, L. H. P. Plantas Hospedeiras de *Bemisia tabaci* biótipo B. Avanços no Manejo da Mosca-Branca *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera, Aleyrodidae). Embrapa Semi-Árido, Petrolina, PB, 2004.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A. M.; COMPANT, S.;

CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 79: 293-320, 2015.

ICAC. International Cotton Advisory Comitee. Production of cotton season 2021/2022. Disponível:<<https://www.icac.org/DataPortal/DataPortal?Units=Production&Year=2021/22%20proj>>. Acesso em 12 de outubro de 2022.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística mensal da Produção Agrícola Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível:<<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/tomate/sp>>. Acesso em 09 de outubro de 2022.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2007. ISAAA Brief No. 37. Ithaca, NY, USA: International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, 2007.

JARAMILLO, J. et al. Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de tomate bajo condiciones protegida, 65 p., 2007.

KOUL, B.; SRIVASTAVA, S.; SANYAL, I.; TRIPATHI, B.; SHARMA, V.; AMLA, D.V. Transgenic tomato line expressing modified *Bacillus thuringiensis* cry1Ab gene showing complete resistance to two lepidopteran pests. *SpringerPlus*, 3: 1-13, 2014.

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

LAWS, B. 50 plantas que mudaram o rumo da história. Rio de Janeiro: Sextante, 224 p., 2013.

LEE, J. A.; FANG, D. D. Cotton as a world crop: origin, history, and current status. *Cotton*, 57: 1-23, 2015.

LOURENÇÃO, A. L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. *Bragantia*, Campinas, 53: 53-59, 1994.

LOURENÇÃO, A. L.; YUKI, V. A.; ALVES, S. B. Epizootics of *Aschersonia* cf. *goldiana* on *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) biotype B in the State of Sao Paulo, Brazil. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 28: 343-345, 1999.

LUCCHETTA, J. T.; PEREIRA, F. F.; FREITAS, A. F.; ALVES, D. L.; PEREIRA, H. C.; CARDOSO, C. R. G.; BARBOSA, M. S.; GUERRA, M. S.; DE LIMA PALOMBO, I. Parasitism and Development of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) in Immature *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Agricultural Science*, 14: 185-197, 2022.

LUGINBILL, P. The fall armyworm. Technical Bulletin United States Department of Agriculture, 34: 1-91, 1928.

MACHADO, R. G.; DE SÁ, E. L. S.; DAMASCENO, R. G.; HAHN, L.; ALMEIDA, D.; MORAES, T.; CAMARGO, F. A. O.; REARTES, D. S. Promoção de crescimento de *Lotus*

corniculatus L. e *Avena strigosa* Schreb pela inoculação conjunta de *Trichoderma harzianum* e rizóbio. *Ciência e Natura*, 33: 111-126, 2001.

MAMTA, K.; REDDY, R. K.; RAJAM, M. V. Targeting chitinase gene of *Helicoverpa armigera* by host-induced RNA interference confers insect resistance in tobacco and tomato. *Plant Molecular Biology*, 90: 281-292, 2016.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio: Brasil 2017/18 a 2027/28 projeções de longo prazo. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. Brasília: MAPA/ACE, 112 p., 2018.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Companhia Nacional de abastecimento. Acompanhamento da safra Brasileira de grãos - V. 5 - SAFRA 2017/18- N. 7 - Sétimo levantamento - Monitoramento agrícola. Conab, Brasília, DF, 2020.

McIROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil*, 173: 337-342, 1995.

MICHAUD, J. P. Problems inherent to augmentation of natural enemies in open agriculture. *Neotropical entomology*, 47: 161-170, 2018.

MICHEREFF FILHO, M.; SCHMIDT, F. G. V.; SOUSA, N. D. M.; SPECHT, A.; MOURA, A. D.; LOPES, L. H. R.; INOUE-NAGATA, A. K.; LIMA, M.F., GUIMARAES, J. A.; TORRES, J. B. Guia para identificação de pragas do tomateiro. Documentos 175, Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2019.

MIRANDA, J. E. Distribuição vertical de lagartas de *S. frugiperda* no Algodoeiro. Comunicado Técnico 227. Embrapa Agododão. Campina Grande, PB, 2006.

MIRANDA, J. E. Manejo integrado de pragas do algodoeiro no cerrado brasileiro. Circular Técnica 131, Embrapa Algodão, Campina Grande, 36 p., 2010.

MIRANDA, J. E.; SILVA, C. S. B. Bioinsumos no Algodão. Como o uso do controle biológico tem crescido na cultura do algodoeiro, que fatores limitam sua adoção e como a pesquisa tem trabalhado para aumentar a gama de ferramentas e tecnologias disponíveis ao produtor. Embrapa Algodão. Matéria Revista Cultivar, publicada em fevereiro de 2022.

MIRANDA, J. E.; SUASSUNA, N. D. Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro. Circular Técnica 76, infoteca-e. Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, 2004.

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L., ed. Controle biológico. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, 163-192, 2000.

MONNERAT, R.; SANTOS, R. C.; BARROS, P. C.; BATISTA, A. C.; BERRY, C. Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão. Comunicado Técnico 98, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 2003.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T. DE; MARTINS, E. S.; MELATTI, V. M.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; MORINAGA, C.; DEMO, C.; GOMES, A. C. M.; FALCÃO, R.; SIQUEIRA, C. B.; SILVA-WERNECK, S.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. *Biological Control*, 41: 291-295, 2007.

MONNERAT, R. G.; SOARES, C. M.; CAPDEVILLE, G.; JONES, G.; MARTINS, É. S.; PRAÇA, L.; BERRY, C. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* living inside of plants. *Microbial biotechnology*, 2: 512-520, 2009.

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; MACEDO, C.; QUEIROZ, P.; PRACA, L.; SOARES, C. M.; MOREIRA, H.; GRISI, I.; SILVA, J.; SOBERON, M.; BRAVO, A. Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. *PLoS One*, 10, p.e0119544, 2015.

MONNERAT, R. G.; SOARES, C. M. S.; PRAÇA, L. B.; ECKSTEIN, B. Controle Biológico de Pragas e Doenças. In: FREIRE, E.C., eds. Algodão no Cerrado do Brasil, 409-443, 2015.

MORAES, A. R. A. D.; LOURENÇÃO, A. L.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z. Resistance of conventional and isogenic transgenic maize hybrids to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bragantia*, 74:50-57, 2015.

MORAL GARCIA, F. J. Analysis of the spatiotemporal distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) in a tomato field using a stochastic approach. *Biosystems Engineering* 93: 253-259, 2006.

MOURA, A. P.; MICHEREFF FILHO, M.; GUIMARÃES, J. A.; LIZ, R. S. Manejo integrado de pragas do tomateiro para processamento industrial. Circular Técnica 129, infoteca-e. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2014.

NARANJO, S. E.; ELLSWORTH, P. C.; FRISVOLD G. B. Economic value of biological control in integrated pest management of managed plant systems. *Annual Review Entomology*, 32: 621-645, 2015.

NASCIMENTO, A. R.; FARIAS JR.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R.,J.; OMOTO, C. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. *Pest Management Science*, 72, 810-815, 2016.

NAUEM, R.; SLATER, R.; SPARKS, T. C.; ELBERT, A.; MCCAFFERY, A. IRAC: Insecticide resistance and mode-of-action classification of insecticides, in *Modern Crop Protection Compounds*, ed. Jeschke P, Witschel M, Krämer W, Schirmer U. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemanha, 995-1012 p., 2019.

NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ, E.; SÁNCHEZ-CAMPOS, E. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 219-248, 2011.

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

PACIFICO, M. G.; ECKSTEIN, B.; BETTIOL, W. Screening of *Bacillus* for the development of bioprotectants for the control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *meloidogyne incognita*. *Biological Control*, 1: 104764, 2021.

PAINEL INTERGOVERNAMENTAL SOBRE MUDANÇA DO CLIMA - IPCC. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. Disponível <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/ciencia/SEPED/clima/ciencia_do_clima/painel_intergovernamental_sobre_mudanca_do_clima.html> Acesso em: 08 de julho de 2023.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: Na Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*, 6: 3296-3325, 2014.

PAREEK, A; SOPORY, S. K.; BOHNERT, H. J.; GOVINDJEE. Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 526 p. 2010.

PARRA, J. R. P.; COELHO JR, A. Insect rearing techniques for biological control programs, a component of sustainable agriculture in Brazil. *Insects*, 13: 105, 2022.

PELAEZ, V.; SILVA, L. R.; ARAÚJO, E. B. Regulation of pesticides: A comparative analyses. *Science and Public Policy*, 40: 644-656, 2013.

PEREIRA, M. J. B.; DE ALBUQUERQUE, F. A.; BASTOS, C. S. Pragas do algodoeiro: identificação, biologia e sintomas de ataque. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas*, 10: 1073-1117, 2006.

PESSOA, R. Taxonomia e diversidade de *Encarsia* no Brasil e a biologia de *Bemisia tabaci* biótipo B e seu parasitoide *Encarsia desantisi* em algodoeiro Bt e não Bt. Tese Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 123p., 2015.

POWELL, D. A.; BELLOWS JUNIOR, T. S. Development and reproduction of two populations of *Eretmocerus* species (Hymenoptera: Aphelinidae) on *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Environmental Entomology*, 21: 651-658, 1992.

PRAÇA, L. B.; GOMES, A. C. M. M.; CABRAL, G.; MARTINS, E.; SUJII, E. H.; MONNERAT, R. G. Endophytic Colonization by Brazilian Strains of *Bacillus thuringiensis* on Cabbage Seedlings Grown *in Vitro*. *Bt Research*, 3: 11-19, 2012.

PRABHAKAR, A.; BISHOP, A. H. Effect of *Bacillus thuringiensis* naturally colonizing *Brassica campestris* var. *chinensis* leaves on neonate larvae of *Pieris brassicae*. *Journal of Invertebral Pathology*, 100: 193-4, 2009.

PRATISSOLI, D.; LIMA, V. L. S.; PIROVANI, V. D.; LIMA, W. L. Occurrence of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on tomato in the Espírito Santo state. *Horticultura Brasileira*, 33: 101-105, 2015.

QIAO, J.; YU, X.; LIANG, X.; LIU, Y.; BORRIS, R.; LIU, Y. Addition of plant-growth-promoting *Bacillus subtilis* PTS-394 on tomato rhizosphere has no durable impact on composition of root microbiome. *BMC microbiology*, 17: 1-12, 2017.

RABELO, M. M.; PAULA-MORAES, S. V.; PEREIRA, E. J. G.; SIEGFRIED, B. D. Demographic performance of *Helicoverpa zea* populations on dual and triple-gene Bt cotton. *Toxins*, 12: 551, 2020.

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

RAO, M. S.; KAMALNATH, M.; UMAMAHESWARI, R.; RAJINIKANTH, R.; PRABU, P.; PRITI, K.; GRACE, G. N.; CHAYA, M. K.; GOPALAKRISHNAN, C. *Bacillus subtilis* IHR BS-2 enriched vermicompost controls root knot nematode and soft rot disease complex in carrot. *Scientia Horticulturae*, 218: 56-62, 2017.

REVA, O. N.; SMIRNOV, V. V.; PETTERSSON, B.; PRIEST, F. G. *Bacillus endophyticus* sp. Nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 101-107, 2002.

RIBEIRO, E. B.; CASTELLANI, M. A.; SILVA, C. A. D. da; MELO, T. L; SILVA, G. dos S.; VALE, W. S. do; SANTOS, A. S. Métodos de destruição de restos de cultura do algodoeiro e sobrevivência do bicudo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 50: 993-998, 2015.

ROCHA, F. Y. O.; NEGRISOLI JÚNIOR, A. S.; DE MATOS, G. F.; GITAHY, P. D. M.; ROSSI, C. N.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. Endophytic *Bacillus* bacteria living in sugarcane plant tissues and *Telchin licus licus* Larvae (Drury) (Lepidoptera: Castniidae): the symbiosis that may open new paths in the biological control. *Frontiers in microbiology*, 12: 659965, 2021.

ROCHA, G. T.; QUEIROZ, P. R. M.; GRYNBERG, P. Biocontrol potential of bacteria belonging to the *Bacillus subtilis* group against pests and diseases of agricultural interest through genome exploration. *Antonie van Leeuwenhoek* 116: 599-614, 2023.

RODRIGUES, S. M. M.; VIVAN, L. M. A. Mosca Branca (*Bemisia tabaci* Biótipo B) no Mato Grosso. Embrapa, Circular Técnica 111, CNPA (infoteca-e), Embrapa Algodão, Campina Grande, Paraíba, Brazil. 10 p., 2007.

SALAZAR MAGALLON, J. A.; HERNANDEZ VELAZQUEZ, V. M.; ALVEAR GARCIA, A., ARENAS SOSA, I., PEÑA CHORA, G. Evaluation of industrial by-products for the production of *Bacillus thuringiensis* strain GP139 and the pathogenicity when applied to *Bemisia tabaci* nymphs. *Bulletin of Insectology*, 68: 103-109, 2015.

SANTOS, W. J. Identificação, biologia, amostragem e controle das pragas do algodoeiro. In: Algodão: tecnologia de produção. Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS, p. 197-199 p., 2001.

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. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control*, 50: 157-163, 2009.

SANTOS, K. D.; MENEGUIM, A. M.; SANTOS, W. D.; NEVES, P. M. O. J.; SANTOS, R.

D. Caracterização dos danos de *Spodoptera eridania* (Cramer) e *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) a estruturas de algodoeiro. *Neotropical entomology*, 39: 626-631, 2010.

SANTOS, R. L., TORRES, J. B. Produção da proteína Cry1Ac em algodão transgênico e controle de lagartas. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 5: 509-17, 2010.

SANTOS, W. J. Manejo das pragas do algodão, com destaque para o cerrado brasileiro. In: FREIRE, E. C. (Ed.). *Algodão no cerrado do Brasil*. 3. ed., Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, Brasília, DF, 267-364 p., 2015.

SANTOS, W. D. Manejo das pragas do algodão com destaque para o cerrado brasileiro. *Algodão no cerrado do Brasil* 2, 403-478 p., 2007.

SILVA, A. A. et al. *Tomate*. Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, Incaper, Vitória, ES: 430 p., 2010.

SILVA, D.M.D., Bueno, A.D.F., Andrade, K., Stecca, C.D.S., Neves, P.M.O.J. and Oliveira, M.C.N.D. Biology and nutrition of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different food sources. *Scientia Agricola*, 74, 18-31, 2017.

SILVA, A. C.; CARVALHO, G. A.; ALVARENGA, M. A. R. Pragas. In: Alvarenga, M. A. R. (Ed.). *Tomate: Produção em campo, casa de vegetação e hidroponia*. 2. ed. Lavras: Editora Universitária de Lavras, 359-412 p., 2013.

SILVA, R. A. D., DEGRANDE, P. E., GOMES, C. E. C., SOUZA, E. P. D.; LEAL, M. F. Phytophagous insects in cotton crop residues during the fallow period in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 53: 875-884. 2018.

SIMMONS, A. M. Settling of Crawlers of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on Five Vegetable Hosts. *Annals of the Entomological Society of America*, 95: 464-468, 2002.

SOARES, J. J.; ARAÚJO, L. H. A. Guerra à lagarta militar (*Spodoptera frugiperda*). *Revista Cultivar*, v. III, 6-8 p., 2001.

SOBERÓN, M., MONNERAT, R.; BRAVO, A. Mode of action of cry toxins from *Bacillus thuringiensis* and resistance mechanisms. *Microbial Toxins*, 1: 1-13, 2018.

SOUZA, B.; VAZQUEZ, L. L.; MARUCCI, R. C. Natural enemies of insect pests in neotropical agroecosystems. *Biological control and functional biodiversity*. Springer, Cham, 1: 546, 2019.

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

SOUZA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S. Solos e Nutrição de Plantas. Produção de mudas de tomateiro em substrato orgânico inoculado e incubado com estreptomicetos. *Bragantia*, Campinas, 68: 195-203, 2009.

STROBEL, G. A.; LONG, D. M. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. *ASM News*, 64, 263-268, 1998.

TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39:47-79. 1994.

TORRES-QUINTERO, M. C., ARENAS-SOSA, I., HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, V. M., SUÁREZ-RODRÍGUEZ, R.; PEÑA-CHORA, G. Characterization of *Bacillus thuringiensis* (Bacillaceae) strains pathogenic to *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Florida Entomologist*, 99: 639-643, 2016.

TOSCANO, L. C.; SANTOS, T. M. D.; BOIÇA JÚNIOR, A.L. Preference of *Bemisia tabaci* biotype B oviposition in cotton cultivars. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 155-160, 2003.

TURNER, T. R.; JAMES, E. K.; POOLE, P. S. The plant microbiome. *Genome Biology*, 14: 209, 2013.

USMAN, A.; KHAN, I. A.; INAYATULLAH, M.; SALJOQI, A. U. R.; SHAH, M. Appraisal of different tomato genotypes against tomato fruit worm (*Helicoverpa armigera* Hub.) infestation. *Pakistan Journal of Zoology*, 45: 113-119, 2013.

VALICENTE, F. H.; FONSECA, M. M. Susceptibilidade da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*, a diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Brasileira de Milho Sorgo*, 3: 21-29, 2004.

VALICENTE, F. H.; DE TOLEDO PICOLI, E. A.; DE VASCONCELOS, M. J. V.; CARNEIRO, N. P.; CARNEIRO, A. A.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U.G. Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis* cry1 genes from Brazilian strains effective against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Biological Control*, 53: 360-366, 2010.

VALICENTE, F. H. Entomopathogenic viruses. In: Souza, B. Vásquez, L., Marucci, R. (eds) *Natural enemies of insect Pests in Neotropical Agroecosystems*. Springer, Cham, 19: 137-150, 2019.

VELASCO, L.; RUIZ, L.; GALIPIENSO, L.; RUBIO, L.; JANSSEN, D. A Historical Account of Viruses in Intensive Horticultural Crops in the Spanish Mediterranean Arc: New Challenges for a Sustainable Agriculture, *Agronomy* 10: 860, 2020.

VILLAS BÔAS, G. L.; FRANÇA, F. H.; MACEDO, N. Potencial biótico da mosca-branca *Bemisia argentifolii* a diferentes plantas hospedeiras. *Horticultura Brasileira*, 20: 71-79, 2002.

WANG, Z.; YU, Z. X.; SOLANKI, M. K.; YANG, L. T.; XING, Y. X.; DONG, D. F.; LI, I. R. Diversity of sugarcane root-associated endophytic *Bacillus* and their activities in enhancing plant growth. *Journal Applied Microbiology*, 128: 814-827, 2019.

WITTSTOCK, U.; GERSHENZON, J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 1-7, 2002.

YANG, F.; WANG, Z.; KERNS, D. L. Resistance of *Spodoptera frugiperda* to Cry1, Cry2, and Vip3Aa proteins in Bt corn and cotton in the Americas: Implications for the rest of the world. *Journal of Economic Entomology*, 115: 1752-1760. 2022.

ZHANG, L.; HUANG, F.; ROGERS LEONARD, B.; CHEN, M.; CLARK, T.; ZHU, Y. C.; WANGLIA, D. S.; YANG, F.; NIU, Y. Susceptibility of Cry1Ab maize-resistant and susceptible strains of sugarcane 3 borer (Lepidoptera: Crambidae) to four individual Cry proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112: 267-72, 2013.

CAPÍTULO I

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL POR *Bacillus thuringiensis* EM ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.)

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL POR *Bacillus thuringiensis* EM ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.)

RESUMO

O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é um microrganismo utilizado na cultura do algodoeiro para o controle biológico de lepidópteros-praga, mas seu efeito endofítico na promoção de crescimento de plantas precisa ser mais bem estudado. A estirpe S2122 de Bt é colonizadora de plantas de algodoeiro e apresentou potencial promotor de crescimento vegetal quando utilizada no tratamento das sementes de algodão. Com o objetivo de estudar o efeito de métodos de inoculação com a estirpe S2122 de Bt sobre o crescimento das plantas de algodoeiro foram realizados três ensaios. Os métodos tiveram o tratamento de sementes (TS) semelhantes aos demais tratamentos. Foram observados os efeitos do TS sozinho, o TS + a adição do pellet bacteriano no solo no momento do semeio (TS + Pellet) e o TS + aplicação de 1 mL da suspensão no solo circundando as raízes da planta a cada sete dias. No primeiro ensaio os tratamentos foram aplicados sobre a cultivar BRS 8H e observados até 55 dias após a emergência (DAE). Os dados de crescimento foram coletados a partir da emergência (para o % de plântulas e do índice de velocidade de emergência (IVE)); a altura das plantas (cm) e o estágio fenológico de desenvolvimento foram coletados semanalmente e os dados do comprimento das raízes (cm), peso da matéria seca da parte aérea e radicular (g), comprimento total das raízes (cm) e volume das raízes (cm³) foram coletadas aos 15, 25, 35 e 55 DAE. No segundo ensaio, os métodos de inoculação foram aplicados sobre a cultivar IMA 1318 e o ensaio conduzido por 35 DAE quando foram anotados os valores em altura (cm), número de folhas, estágio fenológico, peso da matéria seca da parte aérea e radicular (g), e o comprimento da raiz (cm). Por último, foi testado o efeito do tratamento de sementes com a estirpe bacteriana sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de 10 genótipos de algodoeiro (IMA 5675 B2RF, IMA 08-3869, IMA 07-6035, IMA 2106 GTL, IMA 6035 B2RF, IMA 8405, FM 966 LL, IMA 2106, IMA 0250 GLT 05, IMA 0250 GLT 15). Para os genótipos com melhor performance foram obtidos altura (cm), comprimento da raiz (cm) e peso da matéria fresca e seca da plântula inteira (mg) aos 11 DAE. Os resultados dos ensaios com BRS 8H mostraram que o IVE de plantas com tratamento nas sementes foi superior à testemunha. A diferença entre os tratamentos com Bt para o desenvolvimento das plantas foi acentuada até os 32 DAE independentemente do método utilizado. Não houve efeito sobre a altura, porém aos 35 DAE a matéria seca da parte aérea foi aumentada em até 30% pelo uso do Bt. Ao final do ensaio, o

TS+Aplicação proporcionou aumento de 14% da matéria seca das raízes com tendência positiva para o comprimento das raízes em resposta aos métodos de inoculação e um incremento de 21% no volume das raízes para o tratamento TS. Os métodos utilizados com Bt para a cultivar IMA 1318 demonstraram plantas com desenvolvimento maior que a testemunha que por sua vez apresentava plantas em estágio iniciais. A matéria seca das raízes foi aumentada 30% em média independentemente do método. Não houve interferência sobre a altura, número de folhas, matéria seca aérea e comprimento da raiz. O tratamento de sementes com Bt demonstram que o IVE para os genótipos IMA 07-6035, IMA 2106 GTL, IMA 6035 B2RF e IMA 0250 GTL 15 foram positivamente afetados pela bactéria nas sementes. Enquanto os genótipos IMA 08-3869 e FM 966 apresentaram menores índices. Não foram verificadas diferenças entre os tratamentos com as cultivares IMA 5675 B2RF, IMA 8405 e 0250 GLT e IMA 2106. O tratamento com Bt na semente aumentou em cerca de 20% a matéria seca de plantas da cultivar IMA 6035 B2RF. Os resultados obtidos indicam que o tratamento com Bt pode interferir positivamente o desenvolvimento e crescimento das plantas e atuar no potencial germinativo das sementes de algodão.

Palavras-chave: bioestimulante, tratamento de sementes, bactéria, interação planta-microrganismo, agricultura sustentável

PLANT GROWTH PROMOTION BY *Bacillus thuringiensis* IN COTTON (*Gossypium hirsutum* L.) AND INOCULATION METHODS

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (Bt) is a microorganism used in the cotton crop for the biological control of lepidopteran-plague, but its endophytic effect on the promotion of plant growth needs to be better studied. Bt strain S2122 is a cotton plant colonizer and has potential plant growth promoter when used in the treatment of cotton seeds. In order to study the effect of inoculation methods with Bt strain S2122 on the growth of cotton plants, three tests were carried out. The methods had seed treatment (ST) similar to the other treatments. The effects of ST alone, ST + addition of the bacterial pellet in the soil at the time of sowing (ST + Pellet) and ST + application of 1 mL of the bacterial suspension in the soil surrounding the roots of the plant every seven days were observed. In the first assay, the treatments were applied on BRS 8H cultivar and noticed up to 55 days after emergence (DAE). Growth data were collected from emergence (for % of seedlings and the rate of emergence speed (RES)); the height of the plants (cm) and the phenological stage of development were collected weekly; and root length (cm), shoot and root dry matter weight (g), total root length (cm) and root volume (cm³) were collected at 15, 25, 35 and 55 DAE. In the second assay, the inoculation methods were applied on the cultivar IMA 1318 and the test conducted by 35 DAE when the values of height (cm), number of leaves, phenological stage, shoot and root dry matter weight (g), and root length (cm) were noted. Finally, the effect of seed treatment with the bacterial strain on germination and seedling development of 10 cotton genotypes (IMA 5675 B2RF, IMA 08-3869, IMA 07-6035, IMA 2106 GTL, IMA 6035 B2RF, IMA 8405, FM 966 LL, IMA 2106, IMA 0250 GLT 05, IMA 0250 GLT 15) was tested. For the genotype with the best performance, height (cm), root length (cm), dry and fresh matter weight of the entire seedling (mg) were obtained at 11 DAE. The results of the BRS 8H assays showed that the RES of plants with treatment in the seed was superior to the control. The difference of the treatments with Bt for the development of the plants was accentuated until the 32 DAE independently of the method used. There was no effect on height, however, at 35 DAE, shoot dry matter was increased by up to 30% by the use of Bt. At the end of the trial, ST + application provided a 14% root dry matter increase with a root length positive trend in response to inoculation methods and a 21% increase in root volume for ST treatment. The methods used with Bt for the cultivar IMA 1318 demonstrated plants with better development than the control that presented plants in initial stages. Root dry matter was

increased 30% on average independent of the method. There was no interference on height, number of leaves, aerial dry matter and root length. Seed treatment with Bt shows that the RES for the IMA 07-6035, IMA 2106 GTL, IMA 6035 B2RF and IMA 0250 GTL 15 genotypes was positively affected by the bacterium in the seeds. While the IMA 08-3869 and FM 966 genotypes presented lower indexes. No differences were observed between treatments with the cultivars IMA 5675 B2RF, IMA 8405 and 0250 GLT and IMA 2106. Bt treatment in the seed increased about 20% in the dry matter of plants of the cultivar IMA 6035 B2RF. The results indicate that the treatment with Bt can interfere positively in the development and growth of the plants and to act on the germinative potential of cotton seeds.

Keywords: biostimulant, seed treatment, bacteria, plant-microorganism interaction, sustainable agriculture

1 INTRODUÇÃO

Bactérias promotoras de crescimento vegetal colonizam diferentes órgãos das plantas e exercem efeitos benéficos sobre elas, podendo aumentar a produção e o rendimento das culturas em casa de vegetação e no campo, além de atuarem como componentes biológicos para proteção de plantas (Compant et al., 2010). Com esse propósito, cepas bacterianas têm sido isoladas e identificadas como bactérias promotoras de crescimento utilizando diferentes mecanismos diretos e indiretos (Kloepper e Schroth, 1981).

Dentre os principais mecanismos observados na promoção de crescimento de plantas por bactérias estão a produção de hormônios, a emissão de compostos orgânicos voláteis (VOCs), o estímulo ao aumento da superfície radicular ou ainda suprindo as suas necessidades nutricionais por mecanismos como a fixação biológica do nitrogênio e a solubilização de fosfatos (Hardoim et al., 2008; Martínez-Viveros et al., 2010). Como benefício indireto do uso de microrganismos em sementes ou plântulas pode ser citado a supressão de infecções causadas por patógenos (Harman et al., 2004, Glick, 2012; Medeiros e Bettioli, 2021; Pacífico et al., 2021; Montalvão et al., 2022), pela produção de enzimas ou indução de resistência sistêmica (Ahkami et al., 2017).

Os gêneros mais estudados de bactérias promotoras de crescimento de plantas são *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* e *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Os efeitos destes microrganismos benéficos que se associam às plantas e contribuem para o seu desenvolvimento são amplos e incluem os efeitos benéficos atuantes desde a germinação de sementes, na emergência de plântulas, no crescimento das plantas, na melhoria do desenvolvimento de raízes, na absorção de água, na produção de grãos, além de tolerância a estresses bióticos e abióticos (Lazaretti e Bettioli, 1997; Figueiredo et al. 2010; Nascente et al., 2017; Rehman et al., 2020; Hungria et al., 2021).

O gênero *Bacillus* é citado como um grupo de organismos versáteis podendo ser utilizados como bioprotetores, além de serem candidatos ideais para o desenvolvimento de produtos biológicos estáveis e eficientes devido à sua capacidade em produzir endósporos resistentes ao calor e a condições ambientais adversas (Yanez-Mendizabal et al., 2012; Setlow, 2014; O’Callaghan, 2016).

Um dos objetivos da biotecnologia é desenvolver inoculantes microbianos que aumentem a proteção e estimulem o crescimento das plantas (Adesemoye et al., 2009). O uso de agente biológico no tratamento de sementes pode trazer melhoria para proteção do cultivo, atuando desde a germinação, ao estabelecimento e desenvolvimento das fases iniciais das plantas de algodão. Pode, ainda, contribuir para minimizar os efeitos negativos sobre os agroecossistemas.

A aplicação de microrganismos benéficos nas sementes é um mecanismo eficiente para a colocação de inóculos microbianos no solo, onde estarão bem-posicionados para colonizar as raízes das plântulas e proteger contra doenças e pragas (Melo et al., 2016; O’Callaghan, 2016).

Resultados obtidos utilizando diferentes cultivares de algodoeiro inoculados com estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a insetos lepidópteros mostraram que essas estirpes são capazes de colonizar endofiticamente a planta, com potencial efeito bioestimulante, e tal atributo necessita ser mais bem explorado (da Costa et al., 2020). A cultura do algodoeiro é tradicionalmente dependente do uso de pesticidas sintéticos (Pereg e McMillan, 2015), porém seu uso excessivo impacta os custos de produção e causa desequilíbrios dos ambientes de cultivo. Por isso, o setor produtivo possui demanda por novas soluções e inovações biotecnológicas que auxiliem na proteção dos cultivos e no controle efetivo de populações de insetos-praga, com efeitos positivos para a preservação do meio ambiente, dos inimigos naturais e para a saúde humana.

Neste contexto, este trabalho pode contribuir para demais pesquisas que visam a seleção de estirpes de Bt promotoras de crescimento. O laboratório de bactérias entomopatogênicas

detém um expressivo número de bactérias em sua coleção que podem ser explorados com essa finalidade sobre genótipos de algodoeiro de importância econômica.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial germinativo de cultivares de algodão tratadas com *B. thuringiensis* nas sementes bem como avaliar o crescimento das plantas de algodão em função dos métodos de inoculação da bactéria.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa Cenargen) e no Laboratório de Genética e Biotecnologia da Embrapa Agroenergia, ambos situados em Brasília, DF.

Foram realizados três ensaios independentes utilizando a estirpe S2122 de *B. thuringiensis* no tratamento de sementes, que foi previamente selecionada pelo potencial efeito promotor de crescimento de plantas quando testados com a cultivar BRS 8H de algodoeiro (da Costa et al., 2020). Foram realizados três ensaios, sendo que no primeiro e no segundo ensaio foi verificado o efeito da utilização dos métodos de inoculação com a bactéria nos parâmetros de crescimento da planta das cultivares BRS 8H e IMA 1318. No terceiro ensaio, foi avaliado o efeito da bactéria aplicada em tratamento de sementes sobre o potencial germinativo de lotes de cultivares de algodão.

A estirpe S2122 de *B. thuringiensis* pertence à Coleção de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Cenargen. A cultivar BRS 8H de algodão foi obtida junto à Embrapa Algodão de Campina Grande, PB. As demais cultivares foram cedidas pelo Instituto Mato-Grossense do Algodão (IMAmt) de Primavera do Leste, MT.

2.1 Cultivo do material bacteriano

A estirpe bacteriana utilizada neste trabalho foi cultivada em Fermentador (Marca Xangai Biobox) com capacidade para 100 litros efetivos de suspensão bacteriana. Inicialmente, foram preparados dois erlenmeyers (2 L) contendo 600 mL do meio Embrapa (Monnerat et al., 2007) submetidos ao crescimento por 15 horas a 180 rpm e 28 °C em incubador rotativo horizontal.

O conteúdo bacteriano cultivado nestes erlenmeyers foi utilizado como pré-inóculo e transferidos de forma asséptica para o fermentador contendo meio de cultivo Embrapa, previamente esterilizado a 120 ± 2 °C por 60 min. A multiplicação das bactérias ocorreu por 48 horas a temperatura de 29 ± 2 °C, rotação de 350 rpm, 1vvm (ar), pH 7,0 ($\pm 0,2$) e em rotação variável visando manter o O₂ na ordem de 20%.

Após este período, a bactéria multiplicada foi submetida a centrifugações de 9500 rpm por 10 min (Centrífuga Hettich Zentrifugen, modelo Rotanda 460R) para coleta do pellet (concentrado bacteriano contendo esporos e cristais) e desprezando o sobrenadante (foi centrifugado cerca de 38 litros da bactéria multiplicada). Ao pellet coletado foi adicionado 100 mL de água destilada estéril, a solução foi homogeneizada e transferida de forma gradual para recipientes de vidro de liofilização (600mL de capacidade) imersos em nitrogênio líquido. Os frascos de vidro foram recobertos com papel alumínio e armazenados a -80 °C. O material seguiu para o processo de liofilização em Liofilizador Christ, modelo Alpha 2-4 LD plus por 29 horas e estocado a -2 °C.

A biomassa liofilizada foi avaliada a partir da quantificação de esporos utilizando a determinação do número de unidades formadoras de colônia por mg (UFC mg⁻¹) (Westergren e Krasse, 1978). Em capela de fluxo laminar, 5 mg da biomassa liofilizada foi diluída em 5 mL de solução de NaCl 0,9% estéril (diluição 10⁻¹). A diluição 10⁻¹ foi homogeneizada em vórtex, e para a composição da diluição 10⁻², foram acrescentadas 4,5 mL de água destilada estéril e 0,5 mL da diluição anterior e assim sucessivamente até a diluição 10⁻⁹. Foram semeados 10µL de cada diluição em triplicata em placas de Petri contendo meio Embrapa Ágar (Monnerat et

al., 2007) com auxílio de uma pipeta. As placas foram vedadas com filme PVC e colocadas em incubadora (Precision 6LMS) a 28 ± 2 °C por aproximadamente 15 horas para contagem das células.

2.2 Descrição dos métodos de inoculação com *B. thuringiensis*

Para verificar o efeito do tratamento com *B. thuringiensis* no crescimento de plantas da cultivar BRS 8H de algodoeiro foram utilizados três métodos de tratamento com a bactéria: (i) somente tratamento da semente com *B. thuringiensis* (TS); (ii) TS + adição do pellet (concentrado bacteriano) ao solo no momento do plantio (TS + Pellet); (iii) TS + aplicação de 1 mL da suspensão bacteriana no solo próximo a raiz da planta a cada sete dias (TS + Aplicação), e (iv) testemunha, tratamento utilizando água estéril em substituição à bactéria.

Tratamento de sementes: No preparo das suspensões para o tratamento das sementes, o produto bacteriano liofilizado foi adicionado a água deionizada estéril, homogeneizada em tubo Falcon (50 mL) com auxílio de pérolas de vidro para composição da suspensão na concentração 10^8 UFC mL⁻¹. As sementes foram imersas nesta suspensão em potes de vidro (200 mL) e submetidas a agitação por 20 minutos a 130 rpm em plataforma horizontal. Em seguida a suspensão foi desprezada e as sementes distribuídas em placas de Petri (90 x 15 mm) estéreis e secas em fluxo laminar.

Pellet bacteriano: uma alíquota de 5 mg do concentrado bacteriano liofilizado na concentração 10^7 UFC mg⁻¹ foi incorporada ao solo a uma distância de 1 cm da cova de semeadura e na mesma profundidade da semente (cerca de 2 cm).

Aplicação da suspensão bacteriana: a suspensão aplicada foi constituída basicamente pela homogeneização da bactéria liofilizada em água destilada estéril, obtida a concentração de 10^7 UFC mL⁻¹. Uma alíquota de 1 mL da suspensão deste preparado foi aplicada próximo à raiz da planta a cada sete dias contados a partir da emergência das plantas.

2.3 Interferência de métodos de inoculação com a estirpe S2122 de *B. thuringiensis* na promoção de crescimento de plantas de algodoeiro

2.3.1 Efeito promotor de crescimento de *B. thuringiensis* sobre a cultivar BRS 8H

Para este ensaio os dados de desenvolvimento da planta foram observados a partir da emergência até os 55 dias após a emergência das plantas (DAE). As plantas foram conduzidas em tubos polivinil clorido (PVC) de 1 m de altura e 100 mm de diâmetro, preenchidos com a mistura solo estéril adubado, misturado ao substrato (BioPlant®) na proporção 2:1. Os tubos foram posicionados verticalmente, três a três, e permaneceram presos às bancadas com amarração feita com fitilho plástico (Anexo 1).

Foram semeadas quatro sementes por tubo a uma profundidade de 2 cm. O desbaste de plantas ocorreu aos 6 DAE deixando uma planta por tubo. As plantas foram mantidas em casa de vegetação a 22-38 °C de temperatura e cerca de $43 \pm 27\%$ de umidade relativa do ar. Durante o desenvolvimento das plantas foi realizada a irrigação de acordo com a necessidade das plantas e não ocorreu aplicação de fungicidas e inseticidas.

As avaliações e aquisição dos dados foram iniciadas a partir da emergência das plantas a fim de calcular o índice de velocidade de emergência (IVE) obtido pela coleta do número de plantas emergidas diariamente até o 5° dia. A emergência das plântulas foi caracterizada pela emissão de seus cotilédones acima da superfície do solo segundo o critério de Chiavegato e Câmara (2001), e o cálculo do IVE realizado segundo a metodologia proposta por Maguire (1962): $IVE = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$, onde G_1 , G_2 e G_n representam o número de plântulas na primeira, segunda e na última contagem. Enquanto, N_1 , N_2 e N_n , o número de dias de semeadura à primeira, segunda e última contagem.

A partir destes dados obtidos, foi avaliado também o percentual de emergência das plântulas, que foi determinado considerando plantas emergidas com os cotilédones elevados acima do solo. O percentual de plantas emergidas foi calculado com uso da expressão: $PE =$

$NPE / NSS \times 100$, onde PE é a porcentagem de plantas emergidas, NPE é o número de plântulas emergidas e NSS é o número de sementes semeadas.

Os estádios de desenvolvimento das plantas de algodoeiro foram determinados por avaliação visual baseados nas escalas fenológicas estabelecidas por Marur e Ruano (2001), que divide o ciclo do algodoeiro em quatro fases: a fase vegetativa, a fase de formação de botões florais, florescimento e abertura de capulhos. Neste estudo foram observadas: a fase vegetativa (V) e a fase de formação de botões florais (B). Deste modo, a fase vegetativa compreende:

V0 - vai da emergência da plântula até o momento em que a nervura principal da primeira folha verdadeira alcança 2,5 cm de comprimento.

V1 - do final de V0 até a segunda folha alcance 2,5 cm de comprimento.

V2 - do final de V1 até que a nervura central da terceira folha atinja 2,5 cm de comprimento.

V3-Vn - segue o mesmo critério.

Para a fase de formação de botões florais:

B1 - inicia-se quando o primeiro botão floral se torna visível.

B2 - o primeiro botão floral do segundo ramo frutífero é visível.

B3 - o primeiro botão floral do terceiro ramo frutífero visível. Nesta época, o segundo botão do primeiro ramo também é visível.

B4-Bn - segue-se o mesmo critério.

Para a altura das plantas foi anotado o valor a partir do nível do solo até o ápice da planta (meristema apical) com auxílio de uma régua graduada em centímetros. O comprimento da raiz foi determinado tendo referência o colo da planta e a extremidade da raiz principal também com uma régua graduada em centímetros.

As plantas foram amostradas ao nível do solo para obtenção dos dados relativos ao peso da matéria seca. O solo contendo raízes foi cuidadosamente retirado da coluna de PVC

envolvido pelo filme de polipropileno, aberto sobre uma bancada para obtenção dos dados de comprimento da raiz principal e para a coleta das raízes da planta. As raízes foram mantidas em água e levadas ao laboratório para as análises. Para coleta dos dados, as raízes foram cuidadosamente espalhadas em uma bandeja em acrílico contendo água e digitalizadas utilizando scanner de mesa.

As imagens de raízes foram analisadas por meio do programa computacional WinRhizo®, acoplado a um sistema scanner profissional (Epson® Expression 10 000XL), para aquisição das imagens com parâmetros de 300 dpi (pontos por polegada) e o software configurado para obter a estimativa do volume das raízes.

Após as imagens serem digitalizadas, as raízes e a parte aérea foram mantidas em estufa com circulação de ar a 60 °C por aproximadamente 72 horas até a estabilização da massa seca.

A altura (cm) e o estágio fenológico das plantas foram avaliados aos 8, 13, 17, 22, 27, 32, 43 e 52 dias de emergência das plantas (DAE). As variáveis peso da matéria seca da parte aérea e radicular (g), comprimento das raízes (cm) e volume das raízes (cm³) foram analisados aos 15, 25, 35 e 55 DAE.

Para o peso da matéria seca da parte aérea e das raízes, comprimento da raiz principal e volume das raízes os dados foram obtidos a partir da média de doze plantas, exceto para a avaliação que ocorreu aos 55 DAE onde foram avaliados os valores das observações de quatro plantas por tratamento.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado contendo 60 plantas por tratamento, com quatro tratamentos correspondentes aos métodos de inoculação com o *B. thuringiensis*, incluindo o tratamento testemunha com apenas água.

2.3.2 Efeito promotor de crescimento de *B. thuringiensis* sobre a cultivar IMA 1318

Para este ensaio os parâmetros de crescimento foram anotados ao final dos 35 DAE das plantas. O semeio foi realizado em vasos de polipropileno (0,5 L) contendo a mistura de solo estéril, adubado e corrigido e substrato (Plantmax®) na proporção de 2:1. O plantio foi realizado colocando uma semente por vaso e conduzido até o final do ensaio.

As plantas foram tratadas com a estirpe S2122 de *B. thuringiensis* utilizando três métodos: 1) Tratamento na semente na concentração 10^8 UFC mL⁻¹ (TS); 2) TS e adição de um pellet bacteriano a 10^7 UFC mg⁻¹ ao solo no momento do plantio (TS + Pellet); 3) TS e aplicação de um mL da suspensão bacteriana a 10^7 UFC mL⁻¹ (TS + Aplicação) a cada semana.

Para verificação do efeito promotor de crescimento das plantas foram anotados os dados da altura (cm), estágio fenológico de desenvolvimento, peso da matéria seca da parte aérea e radicular (g), além do comprimento da raiz (cm).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com os quatro tratamentos (métodos de inoculação com *B. thuringiensis* incluindo o tratamento testemunha na ausência da bactéria) e doze repetições (plantas) para cada tratamento.

2.3.3 Potencial germinativo de sementes de algodão tratadas com *B. thuringiensis*

Neste momento foi verificado o efeito do tratamento de sementes com o *B. thuringiensis* sobre o potencial germinativo em 10 lotes de cultivares de algodoeiro.

Entre estes lotes, as sementes das cultivares IMA 5675 B2RF, IMA 08-3869, IMA 07-6035, IMA 2106 GTL, IMA 6035 B2RF, IMA 8405 e FM 966 LL não continham tratamentos com pesticidas quimicamente sintetizados, enquanto as cultivares IMA 2106, IMA 0250 GTL 05, IMA 2050 GTL 15 apresentavam tratamento com fungicidas e inseticida sintéticos (carboxamida + thiram e thiametoxam) nas doses 1 e 2,45 g do i.a. kg⁻¹ de sementes, respectivamente.

Para este ensaio foi utilizado somente o tratamento com *B. thuringiensis* nas sementes, na qual foram tratadas com a estirpe S2122 na concentração 10^8 UFC mL⁻¹. Foi adicionado água às sementes do tratamento testemunha. Após o tratamento, a suspensão bacteriana foi desprezada e a semeadura realizada em bandejas de polietileno flexível para produção de mudas (contendo 60 células) preenchidas com solo e substrato Plantmax® estéreis na proporção de 1:1. Foram semeadas duas sementes por célula para cada cultivar, 10 células receberam as sementes tratadas com *B. thuringiensis* e 10 receberam as sementes do tratamento sem a bactéria.

A partir da emergência da primeira plântula foram realizadas contagens diárias do número de plântulas emergidas até o quinto dia para cálculo do IVE. Após a última contagem das plantas emergidas foi mantida apenas uma planta por célula.

Após 11 dias da emergência, as plantas mais vigorosas foram selecionadas de acordo com a análise visual. As plantas foram, então, retiradas do substrato, lavadas e anotados os dados de altura (cm), comprimento da raiz (cm), peso da matéria fresca e seca da planta inteira (g). O peso da planta foi mensurado em balança analítica (Marte AS500C) e os dados de altura e comprimento da raiz obtidos utilizando régua graduada em centímetros.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 20 repetições (plântulas) para cálculo do IVE e dez repetições por tratamento para as demais características analisadas.

2.4 Análise estatística

Os dados referentes ao percentual de germinação foram transformados em arco sen $(x/100)^{0,5}$ para homogeneização das variâncias antes da análise. Para verificação dos efeitos dos tratamentos, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e quando houve diferenças significativas entre tratamentos as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância utilizando o software estatístico Sisvar 5.8 (Ferreira, 2018).

3 RESULTADOS

3.1 Interferência de métodos de inoculação com a estirpe S2122 de *B. thuringiensis* na promoção de crescimento de plantas de algodoeiro

3.1.1 Efeito promotor de crescimento de *B. thuringiensis* sobre a cultivar BRS 8H

3.1.1.1 Percentual de emergência e Índice de velocidade de emergência (IVE)

A emergência das plântulas nesse ensaio teve início ao quinto dia após o plantio quando foram iniciadas a coleta de dados para o cálculo do percentual de emergência e do IVE para os tratamentos.

As taxas de emergência de plântulas são apresentadas a seguir. O percentual de plântulas obtidas para o tratamento TS (88,33%) foi semelhante ao obtido para o tratamento TS + Pellet (92,5%) e para a testemunha (88,75%), não havendo, portanto, diferença significativa entre os tratamentos (Figura 1A).

Verifica-se que o tratamento TS (2,73) apresentou IVE superior à testemunha (2,133) e obteve resposta semelhante ao TS + Pellet (2,28), configurando um estímulo na velocidade de emergência das plântulas pelo uso do TS com o Bt nas sementes (ANOVA: $F = 4,548$; $P = 0,0135$) (Figura 1B).

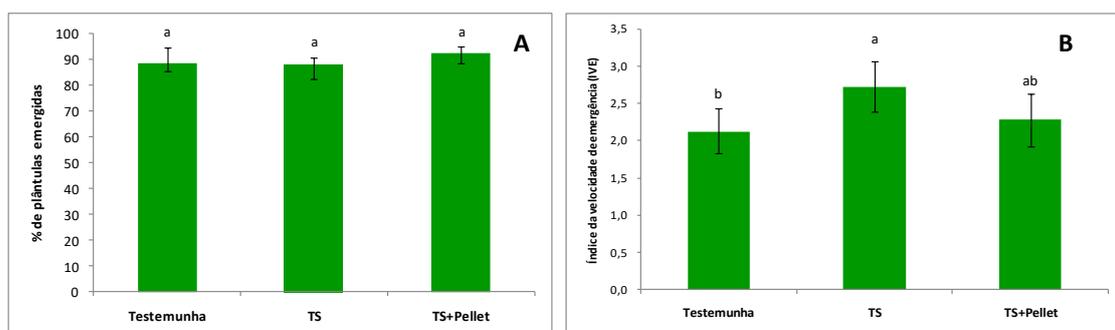


Figura 1. Percentual de plântulas emergidas (Fig. 1A) e o índice de velocidade de emergência (IVE) de plântulas (Fig. 1B) obtidos para o tratamento com *B. thuringiensis* nas sementes da

cultivar BRS 8H de algodoeiro. O tratamento TS refere-se às sementes que receberam *B. thuringiensis* somente nas sementes; o tratamento TS + Pellet recebeu *B. thuringiensis* nas sementes e adição de pellet da bactéria no solo no momento do plantio. As colunas que apresentam letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

3.1.2 Desenvolvimento vegetativo e de botões florais

Para as avaliações realizadas aos 8 DAE foram observadas plantas apresentando folhas cotiledonares, no estágio V0 e em V1 (Figura 2A); aos 13 DAE foram constatadas plantas somente no estágio de V1 e V2 (Figura 2B); aos 17 DAE havia plantas em V1, V2 e V3 (Figura 2C); aos 22 DAE as plantas estavam na fase V2, V3, V4 e V5 (Figura 3A); aos 27 DAE as plantas encontravam-se em V4, V5 e V6 (Figura 3B); aos 32 DAE havia plantas em V4, V5, V6 e B1 (Figura 3C); aos 43 DAE foram observadas plantas em B2, B3, B4 e B5 (Figura 4A) e aos 52 DAE as plantas estavam em B5, B6, B7 (Figura 4B).

Os intervalos de confiança calculados para os percentuais de plantas por estágio fenológico para os tratamentos podem ser verificados no Anexo 2.

Na avaliação realizada aos 8 DAE (Figura 2A) pode ser observado que o tratamento TS + Aplicação (98,3%) e TS + Pellet (95%) apresentaram uma maior porcentagem de plantas em V0 comparadas à testemunha (76,7%) e foram semelhantes ao TS (81,7%). O tratamento testemunha mostrou maior percentual de plantas com folhas cotiledonares (23,3%), estágio inicial de estabelecimento, comparado ao TS (5%), TS + Pellet (5%) e TS + Aplicação (1,7%). Somente o TS apresentou plantas na fase de V1 (13,3%). As figuras no Anexo 3 mostram um rápido desenvolvimento das plantas que receberam o tratamento com *B. thuringiensis* comparado ao tratamento testemunha.

Para a avaliação realizada aos 13 DAE (Figura 2B) os tratamentos com *B. thuringiensis* exibiram percentuais superiores de plantas atingindo o estágio V2 (TS - 26,7%; TS + Pellet -

31,7% e TS + Aplicação - 26,7%) quando comparadas à testemunha (8,3%). Logo, a testemunha demonstrou maior percentual de plantas contendo folhas cotiledonares (91,7%) do que os tratamentos com a bactéria (TS - 73,3%; TS + Pellet - 68,3% e TS + Aplicação - 73,3%).

Aos 17 DAE (Figura 2C) cerca de 50% das plantas do tratamento com Bt atingiram a fase de V3 (TS - 47,9%; TS + Pellet - 58,3% e TS + Aplicação - 50%) superando o percentual apresentado para a testemunha (14,6%) que apresentou um maior percentual de plantas ainda em V2. Somando-se os percentuais de plantas em V1 e V2 do tratamento testemunha (85,4%) temos uma maior quantidade de plantas, ainda, nestas primeiras etapas de estabelecimento comparados aos tratamentos com Bt: TS (52,1%), TS + Pellet (41,7%) e TS + Aplicação (50%).

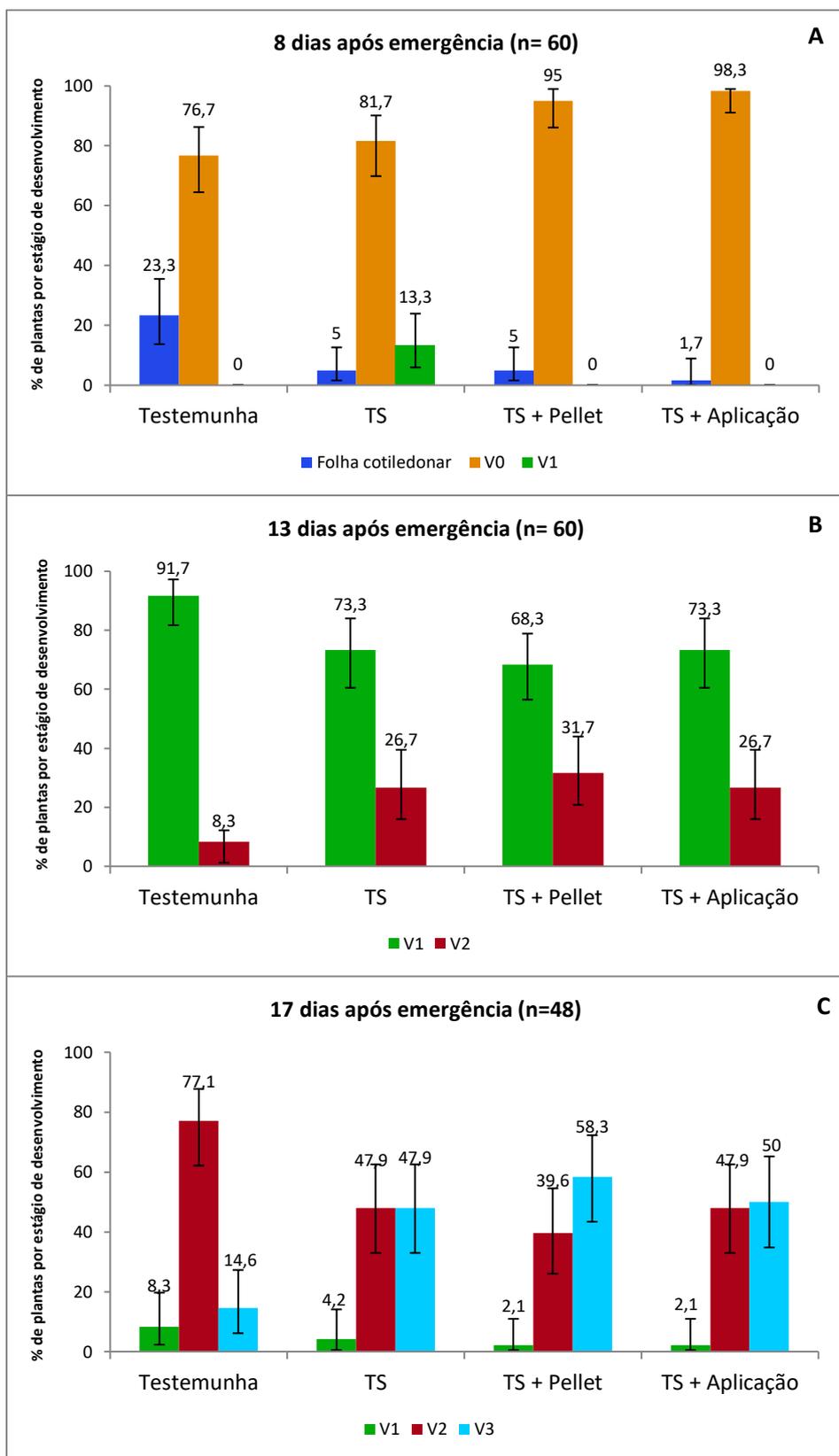


Figura 2. Percentual de plantas de algodoeiro por estágio fenológico de desenvolvimento da cultivar BRS 8H em dias após a emergência das plantas (DAE). Os tratamentos utilizaram a estirpe S2122 de *B. thuringiensis* nas sementes (TS), TS + adição do pellet bacteriano ao solo

(TS + Pellet), TS + aplicação de 1 mL da bactéria a cada sete dias (TS + Aplicação). As avaliações ocorreram aos 8 (Fig. 2A), 13 (Fig. 2B) e 17 (Fig. 2C) DAE. (n = número de plantas)

Aos 22 DAE (Figura 3A) as plantas tratadas com a estirpe bacteriana apresentaram um mesmo padrão de desenvolvimento independentemente do método de inoculação utilizado. Mais de 60% das plantas com *B. thuringiensis* estavam na fase em V3 (TS - 64,6%; TS + Pellet - 62,5% e TS + Aplicação - 68,7%) enquanto a testemunha apresentava 95,8% de plantas na mesma fase. No caso deste último tratamento, o estande restante se completava com 2,1% de plantas em V4 e ainda um percentual de 2,1% de plantas em V2. A porcentagem de plantas em V4 dos tratamentos TS, TS + Pellet e TS + Aplicação foram 31,2%, 37,5% e 29,2%, respectivamente. Somente nos tratamentos TS (4,2%) e TS + Aplicação (2,1%) havia plantas na fase V5.

Analisando os valores obtidos aos 27 DAE (Figura 3B) é possível observar que as plantas em V5 admitem intervalos percentuais semelhantes para todos os tratamentos incluindo a testemunha (Testemunha - 66,7%; TS - 66,7%, TS + Pellet - 83,3%; TS + Aplicação - 83,3%). O mesmo ocorre com as plantas no estágio V4 (Testemunha - 33,3%; TS - 20,8%, TS + Pellet - 14,6%; TS + Aplicação - 14,6%). O que diferiu nesta fase foram as plantas dos tratamentos Bt apresentando o estágio V6 de desenvolvimento (TS - 12,5%, TS + Pellet - 2,1%; TS + Aplicação - 2,1%) o que não ocorreu com a testemunha.

Aos 32 DAE os tratamentos já haviam iniciado a fase de formação de botões florais (B1). No entanto, o percentual de plantas em B1 no tratamento TS + Aplicação (66,7%) foi superior à testemunha (33,4%) e semelhante ao TS (58,3%) e TS + Pellet (61,1%). O TS e TS + Pellet obtiveram um padrão de desenvolvimento muito similar e os valores se confundiram com os intervalos percentuais dos dados obtidos para a testemunha. Somente o TS + Pellet e TS + Aplicação não exibiam mais plantas em estágio V4 nessa avaliação (Figura 3C).

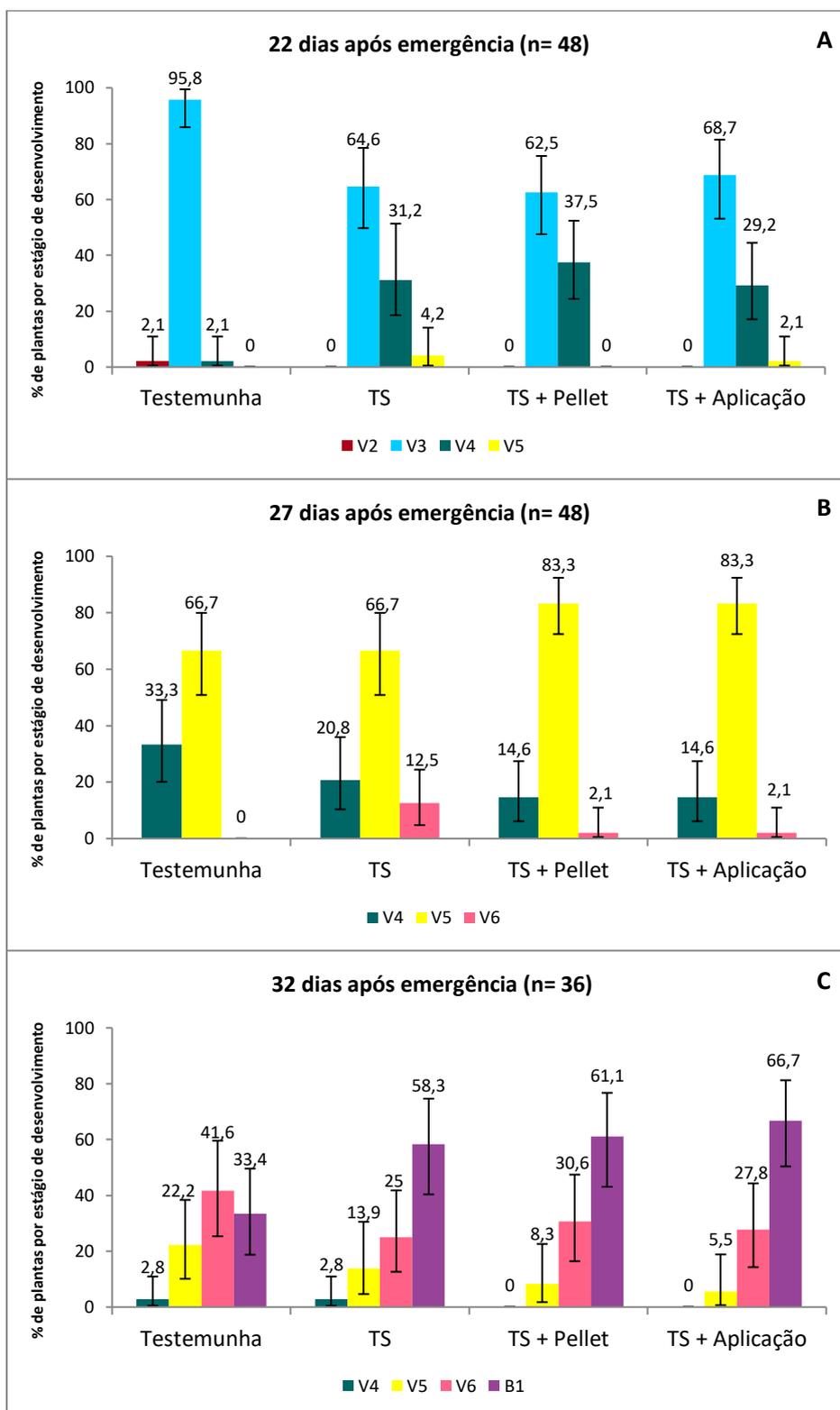


Figura 3. Percentual de plantas de algodoeiro por estágio fenológico de desenvolvimento da cultivar BRS 8H em dias após a emergência das plantas (DAE). As plantas foram tratadas com

a estirpe S2122 de *B. thuringiensis* nas sementes (TS), TS + adição do pellet bacteriano ao solo (TS + Pellet), TS + aplicação de 1 mL da bactéria a cada sete dias (TS + Aplicação). As avaliações ocorreram aos 22 (Fig. 3A), 27 (Fig. 3B) e 32 (Fig. 3C) DAE. (n=número de plantas)

A partir dos 43 DAE (Figura 4A) todos os tratamentos exibiam o estágio de botões florais. A testemunha apresentava plantas somente em B2 (41,2%) e B3 (58,3%) ao contrário dos tratamentos com a bactéria que já demonstravam o estande de plantas em B4 (TS - 25%; TS + Pellet - 16,6%; TS + Aplicação - 45,8%) inclusive o TS + Pellet com 4,2% de suas plantas na fase B5. O único tratamento com a bactéria que apresentou plantas ainda em B2 foi o TS (20,8%).

A última avaliação realizada aos 52 DAE (Figura 4B) apresentou o mesmo padrão da observação realizada anteriormente em que os tratamentos Bt (TS - 4,2%, TS + Pellet - 12,5% e TS + Aplicação - 8,3% em B7) exibiram plantas em um estágio mais avançado de desenvolvimento que a testemunha (que não havia atingido a fase B7). Somente uma planta do tratamento testemunha e uma do tratamento TS+Aplicação apresentaram a emissão da primeira flor expandida.

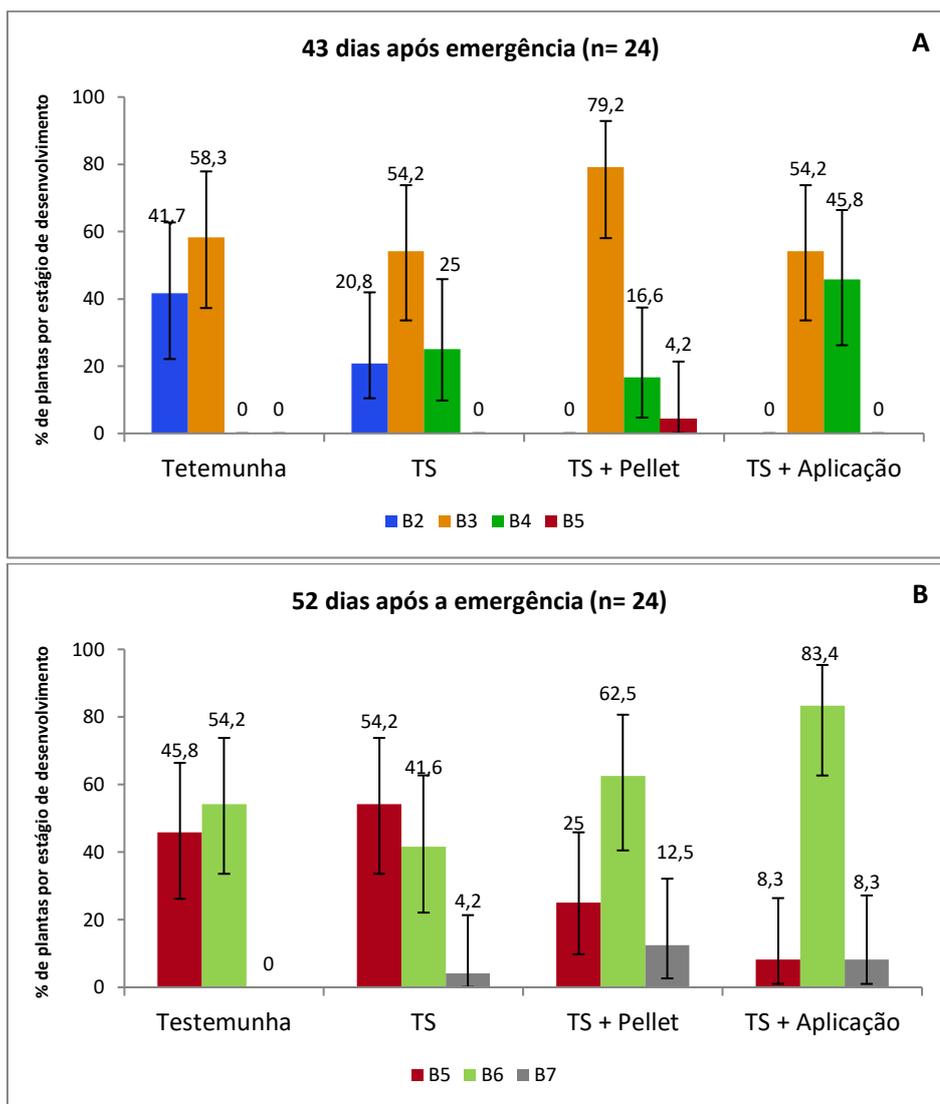


Figura 4. Percentual de plantas de algodoeiro por estágio fenológico de desenvolvimento da cultivar BRS 8H em dias após a emergência das plantas (DAE). Os tratamentos utilizaram a estirpe S2122 de *B. thuringiensis* nas sementes (TS), TS + adição do pellet bacteriano ao solo (TS + Pellet), TS + aplicação de 1 mL da bactéria a cada sete dias (TS + Aplicação). As avaliações ocorreram aos 43 (Fig. 4A) e 52 (Fig. 4B) DAE. (n = número de plantas)

3.1.3 Altura de plantas

O padrão de crescimento da cultivar BRS 8H de algodoeiro tratada com Bt utilizando métodos de inoculação com a estirpe S2122 é apresentado na Figura 5.

Para os métodos de inoculação estudados, a cultivar de algodão tratada com Bt não apresentou diferenças significativas para a altura das plantas nas avaliações realizadas ao longo do ensaio. A tabela contendo a altura média para os tratamentos obtidos nas avaliações encontra-se no Anexo 4.

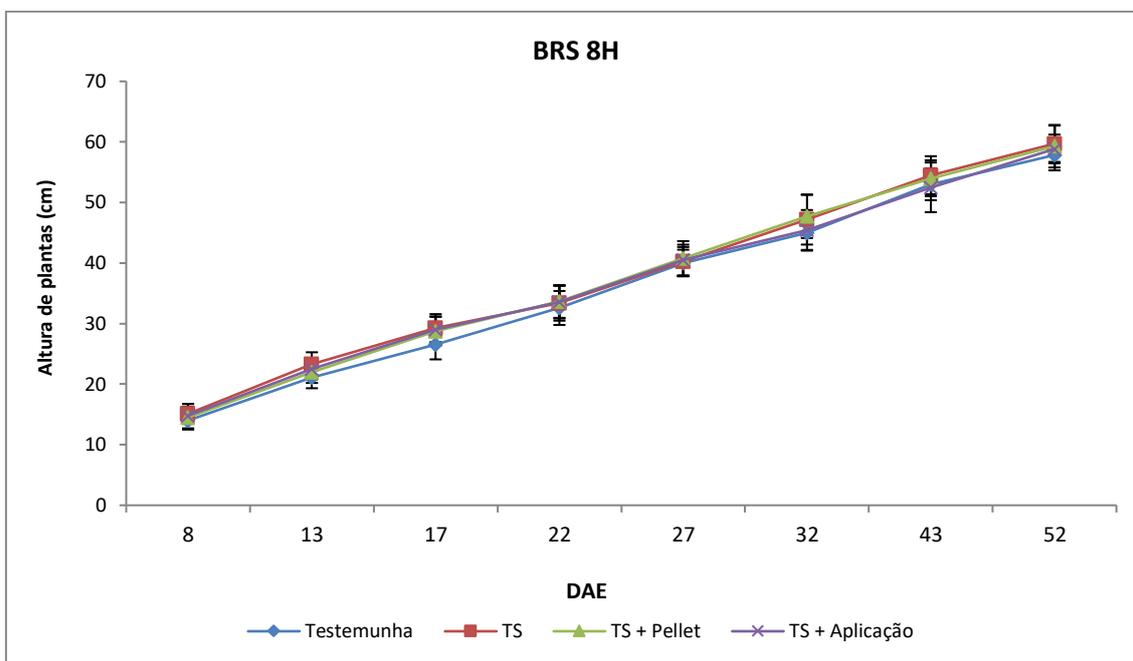


Figura 5. Altura de plantas da cultivar BRS 8H de algodoeiro submetidas ao tratamento com a estirpe S2122 de *B. thuringiensis* em dias após a emergência (DAE) das plantas. Os métodos de inoculação utilizados no ensaio foram o tratamento de sementes (TS) a 10^8 UFC mL⁻¹, TS + adição do pellet bacteriano ao solo com 10^7 UFC mg⁻¹ (TS + Pellet), TS + aplicação de 1 mL da suspensão bacteriana a 10^7 UFC mL⁻¹ no solo a cada sete dias (TS + Aplicação). O tratamento testemunha recebeu água em substituição a bactéria. (n = número de plantas)

3.1.4 Matéria seca da parte aérea

Na Tabela 1 são apresentados os valores médios da matéria seca da parte aérea obtidas para a cultivar BRS 8H tratadas utilizando inoculação com a bactéria.

Observa-se aos 15 DAE que o tratamento TS e TS + Aplicação promoveram um incremento na matéria seca foliar da ordem de 21% e 24% quando comparados com a testemunha (ANOVA: F = 9,3399; P = 0,0018) e o tratamento TS+Pellet.

O mesmo efeito foi verificado aos 35 DAE com incrementos de 20% a 30% na formação de biomassa da parte aérea proporcionado pelos métodos de inoculação do Bt quando comparados à testemunha (ANOVA: F = 4,6895; P = 0,0216). Ao final do ensaio realizado aos 55 DAE não houve diferença entre os tratamentos.

Tabela 1. Peso da matéria seca da parte aérea de plantas de algodoeiro cultivar 8H submetidas ao tratamento com *B. thuringiensis*. Os métodos incluem o tratamento de sementes (TS) na concentração 10^8 UFC mL⁻¹, TS + adição do pellet bacteriano a 10^7 UFC mg⁻¹ no solo de plantio (TS + Pellet), TS + aplicação da suspensão bacteriana no solo (10^7 UFC mL⁻¹) a cada 7 dias (TS + Aplicação). O tratamento testemunha recebeu água substituindo a bactéria. (n = número de plantas) (média ± desvio padrão).

Peso da matéria seca da porção aérea de plantas de algodoeiro tratadas com Bt (g)				
Tratamentos	(n = 12)			
	Dias após a emergência das plantas (DAE)			
	15**	25	35*	55
Testemunha	0,445 ± 0,028b	2,195 ± 0,218a	3,392 ± 0,057b	11,212 ± 0,533a
TS	0,541 ± 0,098a	2,344 ± 0,160a	4,010 ± 0,436a	11,717 ± 0,711a
TS + Pellet	0,436 ± 0,036b	2,270 ± 0,141a	4,425 ± 0,687a	11,782 ± 0,957a
TS + Aplicação	0,550 ± 0,038a	2,328 ± 0,120a	4,338 ± 0,288a	12,045 ± 0,913a

*significativo ao nível de 5% de probabilidade por Tukey

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

3.1.5 Peso da matéria seca de raízes, comprimento da raiz principal, volume de raízes

As médias obtidas para a produção de matéria seca de raízes, comprimento da raiz principal e do volume das raízes são apresentadas na Tabela 2.

Foi observado que o tratamento TS + Aplicação proporcionou um aumento de matéria seca radicular para a cultivar BRS 8H aos 15, 35 e 55 DAE. O incremento proporcionado por Bt foi de 31% aos 15 DAE (ANOVA: $F = 4,174$; $P = 0,0306$); 20% aos 35 DAE (ANOVA: $F = 2,051$; $P = 0,1604$), e de 14% aos 55 DAE (ANOVA: $F = 4,206$; $P = 0,0299$) sobre os valores médios das raízes de plantas em comparação ao tratamento sem a bactéria (Tabela 2).

Analisando a tabela que apresenta o comprimento de raízes, observa-se uma tendência de crescimento em resposta aos métodos de inoculação com Bt. Aos 15 DAE o tratamento TS superou em 12,75 cm o comprimento observado para a testemunha, e obteve valores intermediários ao TS + Pellet e TS + Aplicação (ANOVA: $F = 3,420$; $P = 0,0252$). Aos 25 DAE não foram observadas diferenças entre os tratamentos. Para a avaliação realizada aos 35 DAE houve uma diferença superior a 6 cm para o TS e TS + Pellet em relação à testemunha (ANOVA: $F = 2,4939$; $P = 0,0723$). Este mesmo padrão foi registrado ao final do ensaio (55 DAE) com os tratamentos TS + Pellet e TS + Aplicação apresentando efeitos significativos no crescimento das raízes, e repetindo os acréscimos de 6 cm nas médias dos tratamentos em relação à testemunha sem o Bt (ANOVA: $F = 4,7681$; $P = 0,0206$).

Com relação ao volume de raízes evidenciou-se efeito significativo do tratamento TS aos 55 DAE apresentando resultados positivos e proporcionando incremento de 21% sobre a testemunha e semelhante aos demais tratamentos com Bt (ANOVA: $F = 4,8592$; $P = 0,0194$).

Tabela 2. Peso da matéria seca, comprimento da raiz principal e volume das raízes das plantas de algodoeiro (BRS 8H) submetidas ao tratamento com a estirpe S2122 de *B. thuringiensis*. Os métodos de inoculação com Bt incluem o tratamento de sementes (TS) a 10^8 UFC mL⁻¹, TS + adição do pellet bacteriano a 10^7 UFC mg⁻¹ no solo de plantio (TS + Pellet), TS + aplicação de um mL da suspensão bacteriana (10^7 UFC mL⁻¹) no solo semanalmente (TS + Aplicação), a testemunha não recebeu a bactéria. (n= número de plantas) (média ± desvio padrão).

Peso da matéria seca de raízes (g)				
Tratamentos	Dias após a emergência das plantas (DAE)			
	(n = 12)			
	15*	25	35*	55*
Testemunha	0,109 ± 0,015b	0,566 ± 0,083a	1,166 ± 0,100b	4,097 ± 0,404b
TS	0,139 ± 0,015ab	0,590 ± 0,020a	1,334 ± 0,204ab	4,177 ± 0,054ab
TS + Pellet	0,126 ± 0,016ab	0,570 ± 0,028a	1,325 ± 0,111ab	4,397 ± 0,190ab
TS + Aplicação	0,141 ± 0,008a	0,581 ± 0,060a	1,403 ± 0,112a	4,682 ± 0,240a
Comprimento das raízes (cm)				
	15*	25	35*	55*
	(n = 12)			(n = 4)
Testemunha	46,958 ± 8,351b	88,541 ± 12,149a	98,833 ± 4,590b	105,250 ± 2,061b
TS	59,708 ± 6,042a	98,833 ± 7,223a	105,666 ± 6,548a	107,625 ± 1,600ab
TS + Pellet	53,125 ± 4,340ab	99,958 ± 1,935a	105,250 ± 2,872a	111,000 ± 4,690a
TS + Aplicação	52,375 ± 7,949ab	95,208 ± 3,172a	104,333 ± 2,394ab	112,375 ± 2,495a
Volume de raízes (cm³)				
	(n = 4)			
	15	25	35	55*
Testemunha	2,990 ± 0,268 a	8,950 ± 2,235a	19,311 ± 3,441a	40,752 ± 2,825 b
TS	3,676 ± 0,643 a	9,245 ± 1,521a	20,160 ± 3,121a	49,419 ± 3,842 a
TS + Pellet	2,972 ± 0,503 a	9,640 ± 1,737a	19,834 ± 3,068a	43,974 ± 3,329 ab
TS + Aplicação	3,303 ± 0,181 a	8,849 ± 1,933a	20,205 ± 4,098a	45,071 ± 3,049 ab

* significativo ao nível de 5% de probabilidade por Tukey

3.2 Promoção de crescimento vegetal por *B. thuringiensis* na cultivar IMA 1318

3.2.1 Desenvolvimento vegetativo

Na avaliação realizada nos estádios fenológicos avaliados foi observado que aos 35 DAE a cultivar IMA 1318 apresentava plantas em estádios de desenvolvimento vegetativo V3, V4 e V5 no (Figura 6). Nos tratamentos que utilizaram a bactéria as plantas haviam superado o estágio V3, enquanto a testemunha ainda apresentava 16,6 % de plantas em V3, com 66,6% em V4 e 16,6% em V5. Os tratamentos TS e TS + Aplicação apresentaram padrões de desenvolvimento semelhantes com 50% de plantas em V4 e 50% em V5. Para o tratamento TS+Pellet o índice foi de 75% de plantas amostradas em V4 e 25% em V5 (Figura 6).

O tratamento com Bt foi capaz de interferir no desenvolvimento das plantas da cultivar IMA 1318 apresentando estande de plantas mais desenvolvidas. Os intervalos de confiança para os percentuais de plantas evidenciados por cada estágio fenológico dos tratamentos podem ser observados no Anexo 5.

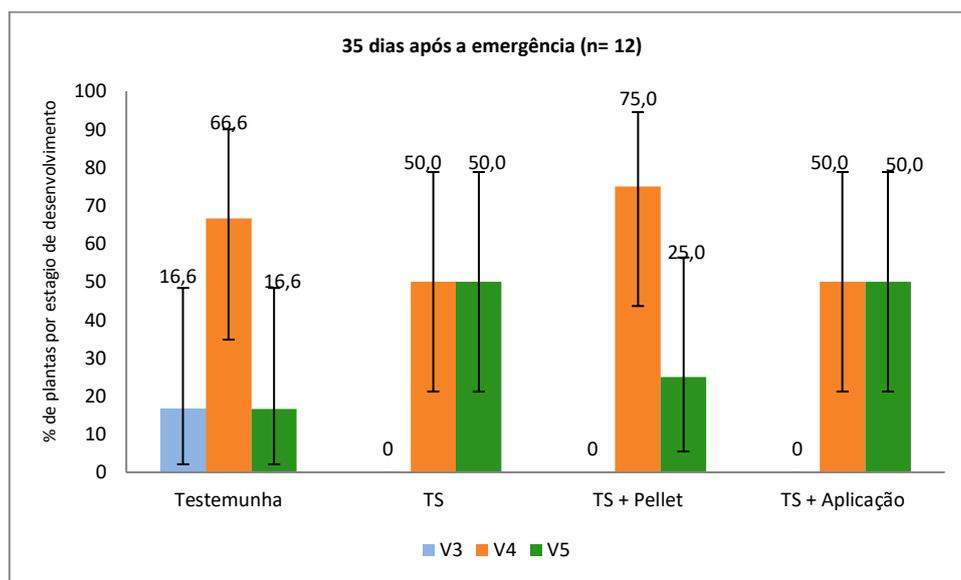


Figura 6. Percentual de plantas de algodoeiro por estágio fenológico da cultivar IMA 1318 aos 35 dias após a emergência das plantas (DAE). As plantas foram tratadas com a estirpe S 2122 de *B. thuringiensis* na semente na concentração 10^8 UFC mL⁻¹ (TS); TS e adição de um pellet

bacteriano a 10^7 UFC mg^{-1} ao solo no momento do plantio (TS + Pellet); TS e aplicação de um mL da suspensão bacteriana a 10^7 UFC mL^{-1} (TS + Aplicação) semanalmente. (n= número de plantas)

3.2.2 Altura, peso da matéria seca da parte aérea e das raízes, e comprimento de raiz

As características relativas ao crescimento da cultivar IMA 1318 de algodoeiro tratadas com Bt utilizando os diferentes métodos de inoculação são apresentados na Tabela 3. Aos 35 DAE das plantas, os dados mostram que não houve interferência do tratamento com Bt sobre a altura das plantas, peso de matéria seca da parte aérea e para o comprimento das raízes. Porém, os resultados indicam um aumento na produção de matéria seca de raízes proporcionada pelos tratamentos com Bt pelos métodos TS e TS + Aplicação, com aumentos de cerca de 27% no valor da matéria seca das raízes quando comparados à testemunha sem o Bt ($F= 7,658$; $P= 0,0003$).

Tabela 3. Avaliação de crescimento de plantas de algodoeiros da cultivar IMA 1318 submetidas a diferentes métodos de inoculação com a estirpe S2122 de *B. thuringiensis* aos de 35 DAE. (n= número de plantas) (média \pm desvio padrão).

Tratamentos	Altura (cm)	Peso matéria seca (g)		Comprimento raiz (cm)
		Parte aérea	Raiz*	
		(n=12)		
Testemunha	32,566 \pm 2,584a	2,77 \pm 0,063a	0,61 \pm 0,0677b	20,5 \pm 5,341a
TS	32,041 \pm 3,318a	2,77 \pm 0,051a	0,77 \pm 0,0510a	22,9 \pm 5,488a
TS + Pellet	32,125 \pm 3,620a	2,82 \pm 0,197a	0,81 \pm 0,1971ab	24,7 \pm 3,360a
TS + Aplicação	31,750 \pm 3,726a	2,91 \pm 0,0538a	0,77 \pm 0,0538a	23,1 \pm 3,398a

*apresentam diferença a 5% de significância por Tukey

3.3 Potencial germinativo de sementes de algodão tratadas com *B. thuringiensis*

3.3.1 Percentual de emergência e Índice de velocidade de emergência (IVE)

Os dados referentes ao percentual de plântulas emergidas e do IVE para as cultivares de algodoeiro, submetidos ao tratamento com Bt nas sementes, são apresentados a seguir. O percentual de emergência pode ser observado na Figura 7. Para essa característica o tratamento com Bt não alterou significativamente a porcentagem de plântulas emergidas de nenhum dos genótipos testados em relação à testemunha.

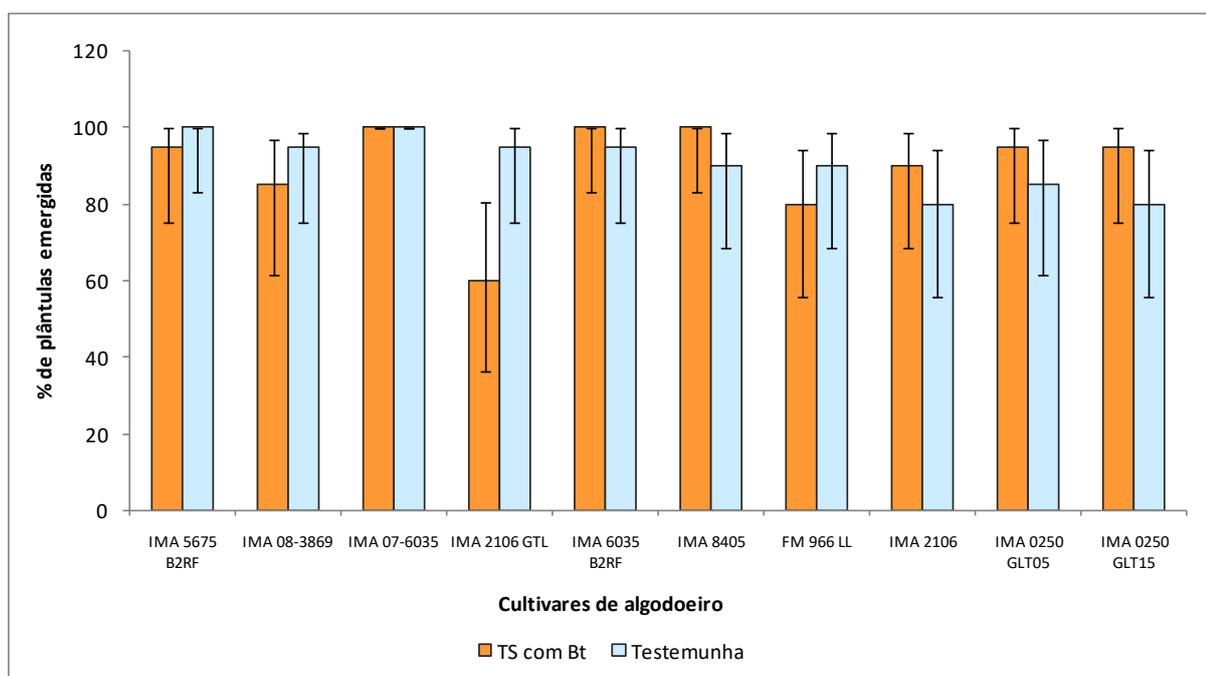


Figura 7. Percentual de emergência de plântulas de cultivares de algodoeiro tratados com a estirpe S2122 de *B. thuringiensis* (Bt) nas sementes (TS) em comparação com sementes sem o Bt (Testemunha). (n= 20 repetições).

Os dados do índice de velocidade de emergência são apresentados na Figura 8. As médias seguidas do desvio padrão são apresentados no Anexo 6. Observa-se que as cultivares IMA 07-6035, IMA 2106 GTL, IMA 6035 B2RF e IMA 0250 GTL 15 apresentaram IVE superior à testemunha quando foram tratadas com Bt. Já as cultivares IMA 08-3869 e FM 966 o IVE foi

significativamente menor que a testemunha quando tratadas com Bt. Não foram verificadas diferenças entre os tratamentos para as cultivares IMA 5675 B2RF, IMA 8405, IMA 0250 GTL 05 e IMA 2106 (Figura 8).

As cultivares IMA 0250 GTL 15 e IMA 0250 GTL 05 obtiveram resposta significativas positiva e neutra, respectivamente, ao tratamento Bt nas sementes (Figura 8).

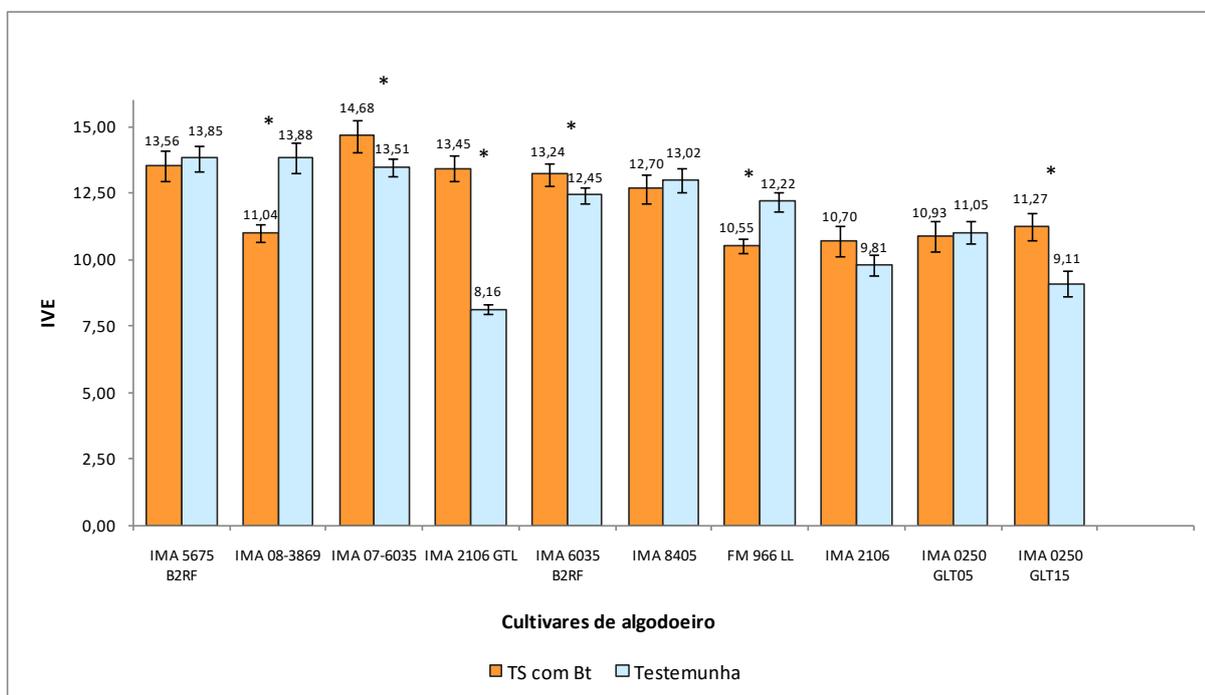


Figura 8. Índice de velocidade de emergência (IVE) de cultivares de algodoeiro tratadas (TS) com a estirpe S2122 de *B. thuringiensis* (Bt) nas sementes e não-tratadas (testemunha sem o Bt). (n= 20 repetições). As colunas acompanhadas por (*) apresentam efeito significativo ao nível de 5% de probabilidade.

3.3.2 Altura, comprimento da raiz e peso da matéria fresca e seca das plantas

Após 15 dias de realizado o plantio as cultivares IMA 6035 B2RF, IMA 8405, IMA 5675 B2RF, IMA 2106 GL foram selecionadas visualmente pelo seu vigor. Dos quatro genótipos selecionados, verificou-se que plantas do genótipo IMA 6035 B2RF tratadas com Bt obtiveram um aumento de 10% na altura ($F= 7,964$; $P= 0,0113$) e cerca de 20% para o peso da matéria seca das plantas comparado ao tratamento que não utilizou a bactéria ($F= 4,449$; $P= 0,0492$)

(Tabela 4). A análise das características de crescimento das cultivares IMA 8405, IMA 5675 B2RF e 2106 GTL não mostrou diferença do tratamento Bt em relação à testemunha (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação do crescimento de plantas das cultivares de algodoeiro tratadas com as sementes da estirpe S2122 de *B. thuringiensis* sobre os parâmetros de altura, comprimento da raiz, matéria fresca e seca da planta inteira aos 15 dias após o plantio. (n= número de plantas).

Tratamento	Altura (cm)	Comprimento Raiz (cm)	Peso	
			matéria fresca (g)	matéria seca (g)
(n=10)				
IMA 6035 B2RF				
Testemunha	9,43± 0,629	7,96± 2,362	1,750± 0,221	0,147± 0,020
TS	10,39± 0,499*	8,54± 1,044	1,890± 0,158	0,175± 0,019*
IMA 8405				
Testemunha	8,65± 0,397	8,20± 0,878	1,551± 0,176	0,152 ± 0,031
TS	9,38± 1,545	8,76± 1,615	1,613± 0,226	0,139± 0,016
IMA 5675 B2RF				
Testemunha	9,26± 0,600	10,37± 1,434	1,664± 0,265	0,170± 0,031
TS	9,01± 0,768	9,66± 0,962	1,630± 0,294	0,171± 0,042
IMA 2106 GTL				
Testemunha	8,26± 1,195	8,35± 1,123	1,861± 0,342	0,173± 0,038
TS	8,31± 0,715	7,99± 1,142	1,696± 0,342	0,167± 0,032

* médias significativas a 5% de probabilidade

4 DISCUSSÃO

Bactérias do gênero *Bacillus* são amplamente conhecidas por sua atividade rizosférica como bioprotetores contra patógenos em diversos cultivos vegetais (Parray et al., 2016; Azizoglu, 2019; Nithyapriya et al., 2021). Várias espécies são candidatas para o desenvolvimento de produtos biológicos estáveis e eficientes, devido à sua capacidade de produzir endósporos resistentes à temperatura, pela facilidade de formulação, armazenamento e maior sobrevivência em campo (Yanez-Mendizabal et al., 2012; Setlow, 2014).

Os resultados obtidos nesse trabalho em relação a velocidade de emergência, os estádios fenológicos, a parte aérea e radicular das plantas dos ciclos de crescimento do algodoeiro foram, de forma geral, afetados pelo tratamento com *B. thuringiensis*. Há evidências de que a promoção de crescimento vegetal é maior quando induzida por bactérias endofíticas do que apenas por bactérias do rizosfera, conferindo proteção contra estresses bióticos e abióticos (Tanuja et al., 2013; Le Cocq et al., 2017).

Bactérias capazes de promover o crescimento vegetal em culturas de importância econômica tem apresentado uma relevância mais ampla nos sistemas de produção agrícola (Senthilkumar et al., 2011, Rana et al., 2020). Porém, o uso especificamente de *B. thuringiensis* colonizando endofiticamente plantas em observância ao crescimento das plantas ainda é pouco relatado.

A resposta das plantas à inoculação bacteriana nos ensaios realizados foi observada pelos ganhos de biomassa expressas em peso seco radicular das duas cultivares testadas nos dois primeiros ensaios. Este ganho também foi encontrado para um genótipo observado no terceiro ensaio, entretanto o crescimento não foi percebido igualmente em todas as cultivares avaliadas. Tais resultados reafirmam as observações realizadas por da Costa et al. (2020) que propõem haver especificidades com relação às cultivares de algodoeiro e os isolados de *B. thuringiensis*. Alguns autores descrevem que as bactérias podem beneficiar a planta, dependendo do genótipo, da espécie bacteriana e do isolado observado (Vaz et al., 2011; Fernandes et al., 2013, Castro et al., 2019).

Os avanços na pesquisa indicam que as plantas são capazes de identificar o endófito e permitir a colonização por meio de monitoramento de nutrientes (Plett e Martin, 2018; Khare et al., 2018). A literatura descreve que existem interações específicas entre plantas e bactérias, especialmente relacionados a endófitos, com interferência na composição de exsudatos radiculares ricos em nutrientes incluindo açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e

metabólitos (Compant et al., 2010; Sessitsch et al., 2012). Durante a germinação e o crescimento de raízes são apresentados exsudatos que contêm muitos compostos biologicamente ativos que influenciam positivamente na colonização e no crescimento da bactéria na planta, além de protegê-la contra doenças e pragas transmitidas pelo solo (Melo et al., 2016). Um dos componentes dos exsudatos que mais varia entre as espécies é o triptofano, o principal precursor de AIA em bactérias (Spaepen et al., 2007; Giassi et al., 2016).

Os tratamentos com *B. thuringiensis* promoveram o crescimento e o acúmulo de massa pelas raízes através do aumento do comprimento, volume e peso em relação à testemunha. A modificação nas raízes obtidas em plantas inoculadas provavelmente teve influência no melhor desempenho na extração da água e nutrientes o que ocasionou aumento da biomassa (Luo et al., 2013; Hulugalle et al., 2015; Hassan et al., 2015; Zhang et al., 2017). Deste modo, a proliferação e a penetração de raiz são capazes de explorar melhor o potencial do solo sob condições de estresse hídrico, além de produzir hormônios vegetais e síntese de ácidos orgânicos e aminoácidos (Yang, 2004). Modificações de características morfológicas radiculares expressas no peso seco estão positivamente relacionados ao crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas (Yang et al., 2008; Chu et al. 2014; Hulugalle et al., 2015).

Alguns trabalhos relatam tais interferências de bactérias no crescimento de plantas cultivadas. Assim, resultados foram alcançados no aumento da produção de arroz (*Oryza sativa* L.) que receberam o tratamento de sementes com a bactéria endofítica *Achromobacter xylooxidans* (Joe et al., 2012). Do mesmo modo, a inoculação de sementes de milho com isolados bacterianos endofíticos proporcionou aumento no peso seco das plântulas (Montanez et al., 2012). Isolados de *Bacillus amyloliquefaciens* inoculados em plântulas de arroz e pepino (*Cucumis sativus* L.) aumentaram significativamente o crescimento das plantas e a qualidade das mudas em comparação às plantas não tratadas (Silveira et al., 2004; Shahzad et al., 2016).

O seu uso pode também ser ampliado para a área florestal, tendo em vista que isolados endofíticos de *Bacillus altitudinis* (19RS3 e T5ST4) foram usados como inóculos para mudas de *Ilex paraguariensis* St. Hil e mostraram-se excelentes no desenvolvimento e obtenção de biomassa seca de erva-mate (Lackeski et al., 2020). Chanway (1995) reportou que o isolado PW2 de *Bacillus polymyxa* resultou na colonização de plantas e em aumentos significativos na emergência de uma espécie de pinus (*Tsuga heterophylla* Raf.). Otieno et al. (2015) verificaram a capacidade de estirpes endofíticas de *Pseudomonas* sp. na estimulação do crescimento de plantas de *Pisum sativum* L. Da mesma forma que a inoculação com a bactéria também endofítica de *Bacillus pumilus* ES4 proporcionou um aumento na biomassa nos ciclos de crescimento de mudas de algaroba (*Prosopis articulata* S.), importante na recomposição de áreas degradadas (Pereira et al., 2016). Tais plantas com maior lignificação dos seus tecidos são capazes de responder à interação com as bactérias com resultados na incorporação de carbono ao solo (Otieno et al., 2015; Pereira et al., 2016).

A interferência benéfica de bactérias no estímulo ao crescimento de plantas de algodão foi reportada por Egamberdiyeva e Höflich, (2004), utilizando a inoculação de *Bacillus polymyxa* BcP26 que permitiu aumento significativo do crescimento de raízes e brotos de algodoeiro e em plantas de ervilha (*Pisum sativum* L.). O tratamento de sementes de algodoeiro com *Bacillus fusiformis* S10 (AY548956) e *Pseudomonas aeruginosa* Z5 (AY548952) contribuiu para a melhoria de características de crescimento e na produtividade de algodão em campo (Yasmin et al., 2013).

Tais microrganismos de importância agrícola e colonizadores possuem capacidade de aumentar o crescimento das plantas através de uma série de mecanismos (Vassilev et al., 2006; Avis et al., 2008; Compant et al., 2010; Pérez-Garcia et al., 2011). Os principais mecanismos de promoção de crescimento de plantas incluem biocontrole, aumento da disponibilidade de nutrientes e a fitoestimulação por síntese de hormônios vegetais (Bhattacharya e Jha, 2012,

Cassán et al., 2014). Alguns autores afirmam que a produção de hormônios reguladores possui o principal mecanismo envolvido na promoção de crescimento de plantas (Compant et al., 2010; Szentes et al., 2013; Oliveira et al., 2014).

O efeito promotor do crescimento de plantas através da associação com *B. thuringiensis* pode compreender a a estímulos da bactéria na produção e liberação do AIA com consequente aumento da síntese de auxinas. As estirpes de *B. thuringiensis* utilizadas nesse trabalho foram investigadas quanto a capacidade de produção de AIA a partir de metabólitos secundários, e a quantidade produzida variou de 1,17 a 7,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em ensaios *in vitro* na presença de triptofano (Caixeta et al., 2015). Diferentes isolados bacterianos de *Bacillus* spp. foram capazes de produzir AIA que variaram entre 0,96 e 29,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na presença de triptofano (Silveira, 2008). Outra pesquisa também destacou a produção de AIA *in vitro* com quantidades que variaram entre 1,53 e 9,71 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para isolados de *B. thuringiensis* (Radaddi et al., 2008).

O ácido indol acético (AIA) é a molécula classificado como auxina, um dos principais fitormônios produzidos por plantas e bactérias. O AIA é um dos mais prevacentes ativos em sistemas biológicos, capazes de induzir habilidades de desenvolvimento das plantas como diferenciação do tecido vascular, estímulo da divisão celular, resposta na expressão de genes, germinação de sementes, iniciação e alongamento de caule e raízes, respostas trópicas e sobre a fotossíntese (Teale et al., 2006; Cassán et al., 2013; Rehaman et al., 2020).

Neste trabalho pressupõe-se que o efeito promotor do crescimento em plantas de algodoeiro esteja associado a produção de AIA. As estirpes de *B. thuringiensis* colonizadoras de plantas estudadas por da Costa et al. (2020) no efeito de crescimento do algodão também foram analisadas quanto a produção e expressão de genes relacionados à síntese deste fitormônio. As estirpes produziram metabólitos secundários da ordem de 2,74 a 4,93 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na produção de auxinas, e foram positivas para genes *ipdC*, *iam1* e *iam2*, codificadores de biossíntese deste hormônio vegetal. Porém a interação benéfica e de potencial efeito

fitoestimulante nas plantas foi observada somente para a estirpe S2122 de *B. thuringiensis* (produziu 3,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Caixeta et al., 2015).

Conjugar resultados de análises *in vitro*, bioquímicos e moleculares, com observações *in vivo* é de grande importância, pois proporciona a obtenção de ativos para fins de bioprospecção. Alguns trabalhos descrevem que o isolado capaz de expressar uma maior quantidade de AIA *in vitro* não possui necessariamente correlação com o desenvolvimento vegetal (Araújo e Guerreiro, 2010; Smyth et al., 2011; Rodrigues et al., 2016), pois existem fatores como custos metabólicos para a planta, sinalizações a estímulos internos e externos que devem ser considerados para expressão de genes que codificam as enzimas da rota de biossíntese de AIA (Beneduzi et al., 2008; Goes et al., 2012, Caixeta et al., 2015; Wang et al., 2019).

O microrganismo *Azospirillum* spp. é considerado um dos mais representativos microrganismos promotores de crescimento vegetal e, portanto, modelo experimental para compreensão do papel fisiológico e molecular de auxinas nas interações entre plantas e microrganismos (Cassán et al., 2016). São descritas pelo menos quatro rotas envolvendo a biossíntese de AIA para *Azospirillum*, dentre elas, o envolvimento da expressão do gene *ipdC* ou via IPyA (indol-3piruvado descarboxilase) e da enzima *iam* na via indol acetamida, como principais responsáveis pela regulação e produção de AIA, ambas dependentes do triptofano (Bar e Okon, 1993; Vande Broek et al., 1999, Ona et al., 2005; Raddad et al., 2008, Cassán et al., 2014). Esta capacidade de produção de AIA e estimulação da expressão do gene *ipdC* tem sido reportado nos genomas de *B. thuringiensis* ssp. *konkukian* e *Bacillus cereus* sugerindo que esses organismos, originalmente de solo, possam ter desenvolvido uma relação benéfica na interferência do equilíbrio hormonal da planta ao longo do tempo (Rasko et al., 2004; Raddad et al., 2008).

Em contraponto, com as elevadas taxas de auxinas obtidas por *Azospirillum* descritas na literatura que variaram entre 5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ conforme as condições de cultivo e da estirpe, foi

possível observar que as quantidades de AIA obtidas por *B. thuringiensis* estão próximas às produzidas pela bactéria promotora de crescimento *Pseudomonas putida* GR12-2 (Patten e Glick, 2002; Martinez -Morales et al., 2003; Radadad et al. 2008).

Outro aspecto importante observado por Costa et al. (2014) nos ensaios de promoção de crescimento de plantas de algodão, foram que plantas inoculadas com *B. thuringiensis* e plantas não inoculadas apresentaram diferentes teores do elemento zinco (Zn) em sua composição. O Zn é elemento essencial a síntese de triptofano, precursor de AIA atuando na síntese de carboidratos (Cerigioli, 2005; Cassán et al., 2014; Adeleke et al., 2021). Isso pode indicar que a estirpe S2122 de *B. thuringiensis* avaliada neste trabalho pode assimilar o triptofano dos exsudados de raízes, e então produzir AIA para induzir a transcrição de fatores de resposta a auxina, promovendo o crescimento das plantas de algodão. Araújo et al., 2005 também observaram respostas em relação à produção de AIA nos exsudados de raízes de plantas de soja (*Glycine max* L.) com interação de *B. subtilis*.

A estirpe S2122 de *B. thuringiensis* além de produzir e abrigar genes necessários em duas das principais rotas para a produção de AIA, também apresenta determinantes genéticos para a enzima fosfatase ácida e para a síntese de sideróforos (Caixeta et al., 2015) o que indica a capacidade de hidrolisar fosfatos e na captação e produção de ferro do ambiente (Raddad et al., 2008). Alguns estudos apresentaram isolados endofíticos de *B. thuringiensis* atuando positivamente na promoção de crescimento em plantas arroz e amendoim e atribuem tal fator a capacidade de estímulo na produção de AIA e solubilização de fósforo (Mbai et al., 2013; Wang et al., 2013; Rana et al., 2020).

Neste estudo, os resultados obtidos até cerca dos 30 DAE das plantas, o efeito do tratamento TS foi interessante para que se perceba os efeitos no desenvolvimento das plantas pelo tratamento com a estirpe bacteriana. A aplicação de microrganismos benéficos às sementes é um mecanismo eficiente para a colocação de inóculos microbianos no solo (O'Callaghan,

2016). Uma das vantagens de uso do método do tratamento de sementes é requerer menores quantidades de produto que outros métodos de aplicação (Wilson e Jackson, 2013).

Uma alternativa sugerida para beneficiar o microrganismo para que ele expresse seu efeito promotor por maior período, poderia estar na utilização de diferentes nanomateriais em suspensões bacterianas ou aplicados ao tratamento das sementes, bem como o uso de formulações encapsuladas contendo a bactéria promotora de crescimento. São possibilidades de utilização de ferramentas que dispõem de partículas adequadas que garantem a liberação progressiva das células e podem estimular o desempenho e garantir a eficácia do microrganismo na interação com as plantas cultivadas (do Espírito Santo Pereira et al., 2021; Balla et al., 2022). Isto porque aos 40 DAE o tratamento TS + Aplicação demonstrou potencial para no desenvolvimento das plantas de algodão. No entanto, a prática de aplicações com maior frequência visando favorecer o efeito da colonização da planta pode se apresentar mais onerosa.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram uma correlação positiva de uso da estirpe de *B. thuringiensis* no desenvolvimento e crescimento de plantas de algodão, além de oferecer boa oportunidade de uso e desenvolvimento de bioinoculantes em plantas de algodão e por ser fonte não danosa ao meio ambiente contribuindo para a consolidação de sistemas agrícolas sustentáveis.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELEKE, B.S.; AYANGBENRO, A.S.; BABALOLA, O.O. Genomic analysis of endophytic *Bacillus cereus* T4S and its plant growth-promoting traits. *Plants*, 10: 1776, 2021.

ADESEMOYE, A.O.; TORBERT, H.A.; KLOEPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial ecology*, 58: 921-929, 2009.

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University Science* 26: 1-20, 2014.

AHKAMI, A.H.; WHITE III, R.A.; HANDAKUMBURA, P.P.; JANSSON, C. Rhizosphere engineering: enhancing sustainable plant ecosystem productivity. *Rhizosphere*, 3: 233-243, 2017.

ARAUJO, F.F.; HUNGRIA, M.; HENNING, A.A. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 1639-1645, 2005.

ARAUJO, F.F.; GUERREIRO, R.T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. *Ciências e Agrotecnologia*, 34: 837-844, 2010.

AVIS, T.J.; GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R.J. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 1733-1740, 2008.

AZIZOGLU, U. *Bacillus thuringiensis* as a biofertilizer and biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of Bt. *Current Microbiology*, 76: 1379-1385, 2019.

BHATTACHARYYA, P.N.; JHA, D.K. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World of Journal Microbiology and Biotechnology* 28: 1327-1350, 2012.

BALLA, A.; SILINI, A.; CHERIF-SILINI, H.; CHENARI BOUKET, A.; ALENEZI, F.N.; BELBAHRI, L. Recent Advances in Encapsulation Techniques of Plant Growth-Promoting Microorganisms and Their Prospects in the Sustainable Agriculture. *Applied Sciences*. 12: 9020, 2022.

BAR, T.; OKON, Y. Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Canadian Journal of Microbiology*, 39: 81-86, 1993.

BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L. K.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; PASSAGLIA, L. M. P. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing Bacilli isolated from rice fields in south Brazil. *Applied Soil Ecology*, 39: 311-320, 2008.

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

CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry*, 103: 117-130, 2016.

CASSÁN, F., VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33: 440-459, 2014.

CASTRO, M.T.; MONTALVÃO, S.C L.; MONNERAT., R.G. Control of mahogany shoot borer, *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae), with *Bacillus thuringiensis* in a systemic way. *Nativa*, 7: 426-430, 2019.

CERIGIOLI, M.M. Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade de São Carlos, São Carlos. 1:1-132, 2005.

CHIAVEGATO, E. J.; CÂMARA, G. M. S. Algodão: Origem, planta e perspectivas para a cultura. In: CÂMARA, G. M.; CHIAVEGATO, E. J. (Org.). O agronegócio das plantas oleaginosas: Algodão, Amendoim, Girassol e Mamona. Piracicaba. ESALQ, 51-73, 2001.

CHU, G.; CHEN, T.; WANG, Z.; YANG, J.; ZHANG, J. Reprint of morphological and physiological traits of roots and their relationships with water productivity in water-saving and drought-resistant rice. *Field Crops Research*, 165: 36-48, 2014.

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*, 42: 669-678, 2010.

COSTA, F. S. S. *Bacillus thuringiensis* como endofíticos em algodão: avaliação na promoção de crescimento e controle de *Spodoptera frugiperda*. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília, Brasília, DF, 99 p., 2014.

DA COSTA, F. S. S.; PRAÇA, L. B.; GOMES, A. C. M. M.; DOS SANTOS, R. C.; SOARES, C. M. S.; MONNERAT, R. G. *Bacillus thuringiensis* Effect on the Vegetative Development of Cotton Plants and the Biocontrol of *Spodoptera frugiperda*. *Agronomy*, 10: 1889, 2020.

DO ESPIRITO SANTO PEREIRA, A.; CAIXETA OLIVEIRA, H.; FERNANDES FRACETO, L.; SANTAELLA, C. Nanotechnology potential in seed priming for sustainable agriculture. *Nanomaterials*, 11: 267, 2021.

EGAMBERDIYEVA, D.; HÖFLICH, G. Effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of cotton and pea in a semi-arid region of Uzbekistan. *Journal of Arid Environments*, 56: 293-301, 2004.

FERNANDES, R. H.; LOPES, E. A.; VIEIRA, B. S.; BONTEMPO, A. F. Controle de *Meloidogyne javanica* na cultura do feijoeiro com isolados de *Bacillus* spp. *Revista Trópica*, 7: 76-81, 2013.

FERREIRA, D. F. Sisvar versão 5.8. Programa para análise estatísticas e ensino. Uiversidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2018.

FIGUEIREDO, M. D.; SELDIN, L.; ARAUJO, F. F.; MARIANO, R. D. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. In: Plant growth and health promoting bacteria. Springer, Berlin, Heidelberg, 21-43, 2010.

GIASSI, V.; KIRITANI, C.; KUPPER, K.C. Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. Microbiological Research, 190: 46-54, 2016.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica, 11: article id 963401, 2012.

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

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

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease, 84: 377-393, 2002.

HASSAN, M. U.; MAQSOOD, M.; WAJID, S. A.; AND RANJHA, A. M. Rooting pattern and nitrogen use efficiency in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) under moisture stress conditions. Journal of Animal Plant Sciences. 25: 1429-1440, 2015.

HULUGALLE, N. R.; BROUGHTON, K. J.; TAN, D. K. Y. Fine root production and mortality in irrigated cotton, maize and sorghum sown in vertisols of northern New South Wales, Australia. *Soil and Tillage Research*, 146: 313-322, 2015.

HUNGRIA, M.; RONDINA, A. B. L.; NUNES, A. L. P.; ARAUJO, R. S.; NOGUEIRA, M. A. Seed and leaf-spray inoculation of PGPR in brachiarias (*Urochloa* spp.) as an economic and environmental opportunity to improve plant growth, forage yield and nutrient status. *Plant and Soil*, 463: 171-186, 2021.

JOE, M. M.; ISLAM, M. R.; KARTHIKEYAN, B.; BRADEEPA, K.; SIVAKUMAAR, P. K.; SA, T. Resistance responses of rice to rice blast fungus after seed treatment with the endophytic *Achromobacter xylosoxidans* AUM54 strains. *Crop protection*, 42: 141-148, 2012.

KHARE, E.; MISHRA, J.; ARORA, N.K. Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and prospects. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2732, 2018.

KOUL, B.; SRIVASTAVA, S.; SANYAL, I.; TRIPATHI, B.; SHARMA, V.; AMLA, D.V. Transgenic tomato line expressing modified *Bacillus thuringiensis* cry1Ab gene showing complete resistance to two lepidopteran pests. *SpringerPlus*, 3: 1-13, 2014.

KUMAR, K.; GAMBHIR, G.; DASS, A.; TRIPATHI, A.K.; SINGH, A.; JHA, A.K.; YADAVA, P.; CHOUDHARY, M.; RAKSHIT, S. Genetically modified crops: current status and future prospects. *Planta*, 251:91, 2020.

KUMAR, H.; KUMAR, V. Tomato expressing Cry1A(b) insecticidal from *Bacillus thuringiensis* protected against tomato fruit borer, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) damage in the laboratory, greenhouse and field. *Crop Protection*, 23: 135-139, 2004.

LAZZARETI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado a base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. *Scientia Agrícola*, 54: 89-96, 1997.

LE COCQ, K.; GURR, S.J.; HIRSCH, P.R.; MAUCLINE, T.H. Exploitation of endophytes for sustainable agricultural intensification. *Molecular Plant Pathology*, 18: 469-73, 2017.

LUO, L.; MEI, H.; YU, X.; LIU, H.; FENG, F. Water-saving and drought-resistance rice and its development strategy. *Chinese Science*, 56: 804-811, 2011.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2: 176-177, 1962.

MARTÍNEZ-MORALES, L.; SOTO-URZUA, L.; BACA, B.; SANCHEZ-AHEDO, J. Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters* 228: 167-173, 2003.

MARTÍNEZ-VIVEROS, O.; JORQUERA, M. A.; CROWLEY, D. E.; GAJARDO, G. M. L. M.; MORA, M. L. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10: 293-319, 2010.

MARUR, C. J.; RUANO, O. A reference system for determination of developmental stages of upland cotton. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas*, 5: 313-317, 2001.

MBAI, F.N.; MAGIRI, E.N.; MATIRU, V.N.; NGANGA, J.; NYAMBATI, V.C.S., Isolation and characterization of bacterial root endophytes with potential to enhance plant growth from Kenyan Basmati rice. *American International Journal of Contemporary Research*, 3: 25-40, 2013.

MEDEIROS, C. A.; BETTIOL, W. Multifaceted intervention of *Bacillus* spp. against salinity stress and *Fusarium wilt* in tomato. *Journal of Applied Microbiology*, 131: 2387-401, 2021.

MELO, J.; CAROLINO, M.; CARVALHO, L.; CORREIA, P.; TENREIRO, R.; CHAVES, S.; RAMOS, A. C. Crop management as a driving force of plant growth promoting rhizobacteria physiology. *SpringerPlus*, 5: 1574, 2016.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T. DE; MARTINS, E. S.; MELATTI, V. M.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; MORINAGA, C.; DEMO, C.; GOMES, A. C. M.; FALCÃO, R.; SIQUEIRA, C. B.; SILVA-WERNECK, S.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. *Biological Control*, 41: 291-295, 2007.

MONTALVÃO, S. C.; DE CASTRO, M. T.; BLUM, L. E.; MONNERAT, R. G. *Bacillus*-Based Products to Control *Meloidogyne incognita* Races 3 and 4 in Cotton and Compared Histopathology Using *B. methylotrophicus*. *Journal of Agricultural Science*, 14: 103-124, 2022.

MONTANEZ, A.; BLANCO, A. R.; BARLOCCO, C.; BERACOCHEA, M.; SICARDI, M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Applied Soil Ecology*, 58: 21-28, 2012.

NASCENTE, A. S.; DE FILIPPI, M. C. C.; LANNA, A. C.; DE SOUZA, A. C. A.; DA SILVA LOBO, V. L.; DA SILVA, G. B. Biomass, gas exchange, and nutrient contents in upland rice plants affected by application forms of microorganism growth promoters. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 2956-2965, 2017.

NITHYAPRIYA, S.; LALITHA, S.; SAYYED, R. Z.; REDDY M. S.; DAILIN, D. J.; ENSHASY, H. E. E.; SURIANI, N. L.; HERLAMBANG, S. Production, Purification, and Characterization of Bacillibactin Siderophore of *Bacillus subtilis* and Its Application for Improvement in Plant Growth and Oil Content in Sesame. *Sustainability*, 13: 5394, 2021.

O'CALLAGHAN, M. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Applied microbiology and biotechnology*, 100: 5729-46, 2016.

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

ONA, O.; VAN IMPE, J.; PRINSEN, E.; VANDERLEYDEN J. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiology Letters*, 246: 125-132, 2005.

PACIFICO, M. G.; ECKSTEIN, B.; BETTIOL, W. Screening of *Bacillus* for the development of bioprotectants for the control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Meloidogyne incognita*. *Biological Control*, 1: 104764, 2021.

PARRAY, J.A.; JAN, S.; KAMILI, A.N.; QADRI, R. A.; EGAMBERDIEVA, D.; AHMAD, P. Current Perspectives on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Journal Plant Growth Regulation*, 35: 877-902, 2016.

PATTEN C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 3795-3801, 2002.

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

PLETT, L. M.; MARTIN, F. M. Know your enemy embrace your friend: using omics to understand how plants respond differently to pathogenic and mutualistic microorganisms. *The Plant Journal*, 93: 729-746, 2018.

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

RANA, K. L.; KOUR, D.; KAUR, T.; DEVI, R.; YADAV, A. N.; YADAV, N.; DHALIWAL, H. S.; SAXENA, A. K. Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting

mechanisms and potential applications for agricultural sustainability. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113: 1075-1107, 2020.

RASKO D.A., RAVEL J., OKSTAD O.A., HELGASON E., CER R.Z., JIANG L., SHORES K.A., FOUTS D.E., TOURASSE N.J., ANGIUOLI S.V., KOLONAY J., NELSON W.C., KOLSTO A.B., FRASER C.M., READ, T.D. The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. *Nucleic Acids Research*, 32: 977- 988, 2004.

REHMAN, F.; KALSOOM, M.; ADNAN, M.; TOOR, M. D.; ZULFIQAR, A. Plant Growth Promoting Rhizobacteria and their Mechanisms Involved in Agricultural Crop Production: A Review. *Sun Text Review of Biotechnology*, 1: 110, 2020.

RODRIGUES, A. A.; FORZANI, M. V.; SOARES, R. D. S.; SIBOV, S. T.; VIEIRA, J. D. G. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 46: 149-158, 2016.

SESSITSCH, A.; HARDOIM, P.; DÖRING, J., WEILHARTER, A.; KRAUSE, A.; WOYKE, T.; MITTER, B.; HAUBERG-LOTTE, L.; FRIEDRICH, F.; RAHALKAR, M.; HUREK, T. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Molecular Plant Microbe Interactation*, 25: 28-36, 2012.

SENTHILKUMAR, M.; ANANDHAM, R.; MADHAIYAN, M.; VENKATESWARAN, V.; SA, T. Endophytic bacteria: perspectives and applications in agricultural crop production, In:

D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*, vol. XII, Springer, 61-96, 2011.

SETLOW, P. Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *Journal of Bacteriology*, 196: 1297-1305, 2014.

SHAHZAD, R.; WAQAS, M.; KHAN, A. L.; ASAF, S.; KHAN, M. A.; KANG, S. M.; KANG, S. M.; LEE, I. J. Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 106, 236-243.

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

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

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. (2007) Indole- 3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31: 425-448, 2007.

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

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

TEALE, W.; PAPONOV, I.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7: 847-859, 2006.

VANDE BROEK, A., LAMBRECHT, M., EGGERMONT, K., VANDERLEYDEN, J. Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 181: 1338-1342, 1999.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; NIKOLAEVA, I. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 137-144, 2006.

VAZ, M. V.; CANEDO, E. J.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, B. S.; LOPES, E. A. Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*. *Perquirere*, 8: 203-212, 2011.

WANG, Z.; YU, Z. X.; SOLANKI, M. K.; YANG, L. T; XING, Y. X.; DONG, D. F.; LI, I. R. Diversity of sugarcane root-associated endophytic *Bacillus* and their activities in enhancing plant growth. *Journal of Applied and Microbiology*, 128: 814-827, 2019.

WANG, S., WANG, W., JIN, Z., DU, B., DING, Y., NI, T. AND JIAO, F., 2013. Screening and diversity of plant growth promoting endophytic bacteria from peanut. *African Journal of Microbiology Research*, 7: 875-884, 2013.

WESTERGRENN, G.; KRASSE, B. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 7: 82-83, 1978.

WILSON, M. J.; JACKSON, T.A. 2013. Progress in the commercialization of bionematicides. *BioControl*, 58: 715-722, 2013.

YÁNEZ-MENDIZABAL, V.; VIÑAS, I.; USALL, J.; CAÑAMÁS, T.; TEIXIDÓ, N. Endospore production allows using spray-drying as a possible formulation system of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8. *Biotechnology letters*, 34: 729-735, 2012.

YANG, L.; WANG, Y.; KOBAYASHI, K.; ZHU, J.; HUANG, J.; YANG, H.; WANG, Y.; DONG, G.; LIU, G.; HAN, Y.; SHAN, Y. Seasonal changes in the effects of free-air CO₂ enrichment (FACE) on growth, morphology and physiology of rice root at three levels of nitrogen fertilization. *Glob. Change Biology*. 14: 1844-1853, 2008.

YASMIN, S.; HAFEEZ, F. Y.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. Plant-beneficial rhizobacteria for sustainable increased yield of cotton with reduced level of chemical fertilizers. *Pakistan Journal of Botany*, 45: 655-662, 2013.

ZHANG, H.; KHAN, A.; TAN, D. K.; LUO, H. Rational water and nitrogen management improves root growth, increases yield and maintains water use efficiency of cotton under mulch drip irrigation. *Frontiers in plant science*, 8: 912, 2017.

CAPÍTULO II

INOCULAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* EM PLANTAS DE ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.) E EFEITO SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) E *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)

INOCULAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* EM PLANTAS DE ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.) E EFEITO SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) E *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)

RESUMO

Microrganismos benéficos podem ser aplicados no solo ou em contato com sementes e são capazes de produzir proteção contra insetos-pragas ou patógenos em plantas. Porém pouco se sabe a respeito dos mecanismos envolvidos no controle de pragas advindos desta interação com o organismo benéfico. Com o objetivo de investigar o efeito desta interação foi avaliado o desenvolvimento de *S. frugiperda* alimentadas na sua fase larval em plantas de algodoeiro endofiticamente colonizadas com a estirpe S2122 de *B. thuringiensis* utilizando três métodos de inoculação da bactéria (somente tratamento de sementes com Bt (TS a 10^8 UFC mL⁻¹), TS + adição de um *pellet* (concentrado bacteriano a 10^7 UFC mg⁻¹) ao solo, TS + Aplicação de 1 mL da suspensão bacteriana (10^7 UFC mL⁻¹) no solo próximo a raiz da planta a cada sete dias; e testemunha, tratamento utilizando água estéril) e também verificar o comportamento de oviposição do inseto-praga. Ainda neste trabalho foi testada a capacidade de aquisição do Bt por *B. tabaci* em plantas inoculadas com a bactéria marcada com *GFP* (*Green Fluorescent Protein*) e testada a oviposição entre plantas tratadas e não tratadas. Os resultados mostraram que as plantas tratadas com Bt não influenciaram negativamente na duração e na viabilidade dos estágios imaturos e adulto de *S. frugiperda*. Na fase adulta o tratamento TS + Aplicação aumentou em quatro dias a duração de fêmeas, mas não diferiu no número de ovos nos tratamentos. Após 72 horas, plantas do tratamento testemunha foram mais ovipositadas que plantas contendo o tratamento com Bt. Nos ensaios realizados com *B. tabaci*, permitiu constatar a colonização e translocação do Bt na planta com capacidade de aquisição por ninfas e adultos do inseto. Plantas tratadas com a estirpe S1806 apresentaram menor número de ovos de *B. tabaci* do que plantas que receberam somente água estéril.

Palavras-chave: insetos, plantas de algodão, antibiose, bactéria entomopatogênica, inoculação

INOCULATION OF *Bacillus thuringiensis* IN COTTON PLANTS (*Gossypium hirsutum* L.) AND EFFECT ON *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) AND *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)

ABSTRACT

Beneficial microorganisms can be applied to soil or in contact with seeds being able to produce protection against insect-pests or pathogens in plants. However, little is known about the mechanisms involved in pest control arising from this interaction with the beneficial organism. In order to investigate the effect of this interaction, it was evaluated the development of *S. frugiperda* fed in their larval phase in endophytic cotton plants colonized with *B. thuringiensis* strain S2122 using three methods of bacterial application: (only seed treatment with Bt (ST), ST + addition of a pellet (bacterial concentrate at 10^7 CFU mg⁻¹) to the soil, ST + application of 1 mL of the bacterial suspension (10^7 CFU mg⁻¹) in the soil near to root of the plant every seven days; and control, treatment using sterile water) and also to verify the oviposition behavior of the insect-plague. Also in this work, the ability of *B. tabaci* to acquire Bt in plants inoculated with bacteria labeled with GFP (Green Fluorescent Protein) and the oviposition between treated and untreated plants were tested. The results showed that plants treated with Bt did not negatively influence the duration, viability of the immature and adult stages of *S. frugiperda*. In the adult phase, the TS + application treatment increased the duration of females in four days but did not differ in the number of eggs in the treatments. After 72 hours, plants from the control treatment were more oviposited than plants containing the Bt treatment. Regarding the tests carried out with *B. tabaci*, it was possible to verify the colonization and translocation of Bt in the plant with capacity of acquisition by nymphs and adults of the insect. Plants treated with strain S1806 presented lower numbers of *B. tabaci* eggs than plants that received only sterile water.

Keywords: insects, cotton plants, antibiosis, entomopathogenic bacteria, inoculation

1 INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria entomopatogênica encontrada em várias partes do mundo e que tem a capacidade de produzir cristais durante a fase estacionária de crescimento. Esses cristais são toxinas compostas por proteínas ativas contra uma ampla variedade de fases imaturas de insetos-praga. As toxinas do Bt têm sido usadas como bioinseticidas por décadas no controle de insetos especialmente da ordem Lepidoptera.

Uma alternativa para o emprego do Bt é através da forma endofítica, que pode proteger da sensibilidade da bactéria aos raios ultravioleta e reduzir as chances de lavagem direta provocada pela água da chuva. Estudos anteriores demonstraram a possibilidade de sucesso de uso desta tecnologia tendo em vista a habilidade da bactéria em ser adquirida e colonizar tecidos de algodão e couve, disponibilizando-a endofiticamente para aquisição por insetos que se alimentam do tecido vegetal, tais como *S. frugiperda* e *P. xylostela*, respectivamente (Monnerat et al., 2009). Em outros estudos, Praça et al. (2012) demonstraram que a utilização da tecnologia de uso do Bt apresentou controle de *P. xylostella* em plantas de repolho. A ação sistêmica de Bt em mudas de citros também foi verificada e apresentou efeito tóxico sobre ninfas de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Dorta et al., 2020) e controle sobre *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) em mudas de mogno (Castro et al., 2019).

Estudos anteriores sugerem que existe uma estreita relação entre a estirpe de Bt e a cultivar de algodão testada, e que a bactéria é capaz de colonizar endofiticamente as plantas atuando simultaneamente na promoção do crescimento vegetal e como potencial controlador de insetos (da Costa et al., 2020).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento de *S. frugiperda* alimentadas em sua fase larval com plantas de algodoeiro endofiticamente colonizadas com Bt, e verificar o comportamento de oviposição dos adultos do inseto. Adicionalmente, objetivou-

se testar a capacidade de aquisição do Bt por *Bemisia tabaci* e verificar a preferência de oviposição em plantas inoculadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratórios de Bactérias Entomopatogênicas, no Laboratório de Microscopia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa Cenargen) em Brasília-DF.

As estirpes bacterianas de Bt utilizadas neste estudo são pertencentes à Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Cenargen. A cultivar de algodão BRS 8H foi obtida junto à Embrapa Algodão em Campina Grande-PB.

2.1 Condições experimentais dos ensaios com *S. frugiperda*

Foi utilizada a estirpe S2122 de *B. thuringiensis* selecionada por se apresentar mais promissora tanto na promoção do crescimento vegetal como no potencial controlador de *S. frugiperda* e a cultivar BRS 8H de algodão.

2.1.1 Cultivo do material bacteriano

A estirpe bacteriana utilizada neste trabalho foi cultivada pelo uso de Fermentador (Marca Xangai Biobox) com capacidade para 100 litros efetivos de suspensão bacteriana. Inicialmente, foram preparados dois erlenmeyers (2 L) contendo 600 mL do meio Embrapa (Monnerat et al., 2007) e submetidos ao crescimento por 15 horas a 180 rpm e 28 ± 2 °C em incubador rotativo horizontal (início da fase vegetativa da bactéria).

O conteúdo bacteriano cultivado nestes erlenmeyers foi utilizado como pré-inóculo e transferidos de forma asséptica para o fermentador contendo meio de cultivo Embrapa, previamente esterilizado a 120 ± 2 °C por 60 min. A multiplicação das bactérias ocorreu por 48

horas a temperatura de 29 ± 2 °C, rotação de 350 rpm, 1 vvm (ar), pH 7,0 ($\pm 0,2$) e em rotação variável visando manter o O₂ na ordem de 20%.

Após este período, a bactéria multiplicada foi submetida a centrifugações de 9500 rpm por 10 min (Centrífuga Hettich Zentrifugen, modelo Rotanda 460R) para coleta do pellet (concentrado bacteriano contendo esporos e cristais) e desprezado o sobrenadante. Ao pellet foi adicionado 100 mL de água destilada estéril, sendo a solução homogeneizada transferida gradualmente para garrafas de vidro (600mL) enquanto imersa em nitrogênio líquido até completar o volume final. Os frascos de vidro foram recobertos com papel alumínio e armazenados a -80 °C. O material seguiu para o processo de liofilização em Liofilizador Christ, modelo Alpha 2-4 LD plus por 29 horas e estocado a -2 °C.

A biomassa liofilizada foi avaliada a partir da quantificação dos esporos utilizando a determinação do número de unidades formadoras de colônia por mg (UFC mg⁻¹) (Westergren e Krasse, 1978). Sob capela de fluxo laminar, 0,005 g da biomassa liofilizada foi diluída em 5 mL de solução de NaCl 0,9% estéril (diluição 10⁻¹) e, a esta diluição homogeneizada em vórtex, foram acrescentadas 4,5 mL de água destilada estéril e 0,5µL da diluição anterior para se obter a diluição de 10⁻², e assim sucessivamente até a diluição 10⁻⁹. Foram semeados 10µL de cada diluição em triplicata em placas de Petri contendo meio Embrapa Ágar (Monnerat et al., 2007) com auxílio de uma pipeta. As placas foram vedadas com filme PVC e colocadas em incubadora (Precision 6LMS) a 28 ± 2 °C por aproximadamente 15 horas para contagem das células.

2.1.2 Preparo do material vegetal

A semeadura foi realizada em vasos de poliestireno com 17,5 cm de altura x 9 cm de diâmetro de abertura e 6,5 cm de diâmetro na base com capacidade para 0,7 L preenchidos com 0,5 Kg da mistura solo estéril, corrigido e adubado adicionado de substrato BioPlant® na proporção 2:1. Os vasos foram colocados sobre recipientes do mesmo material com 8,5 cm de

diâmetro de base e mantidos sobre bancadas em casa de vegetação à temperatura de 30 ± 12 °C e umidade relativa de $47 \pm 21\%$.

O plantio foi realizado em "backups" com o cuidado em garantir a obtenção de plantas de mesma idade e em quantidade adequadas para a alimentação das lagartas até o estágio de pupas. A adubação de plantio foi feita de acordo com as necessidades da cultura e não ocorreu aplicação de inseticidas ou de fungicidas.

2.1.3 Descrição dos métodos de inoculação

- a) Tratamento de semente: imersão das sementes em suspensão bacteriana na concentração 10^8 UFC mL⁻¹ e a agitação a 130 rpm por 20 minutos em plataforma horizontal. Em seguida a suspensão foi desprezada e as sementes secas em fluxo laminar.
- b) Pellet bacteriano: uma alíquota com cerca de 0,005 mg do concentrado bacteriano liofilizado na concentração 10^7 UFC mL⁻¹ foi incorporada ao solo a uma distância de 1cm da cova de semeadura e na mesma profundidade da semente (cerca de 2 cm).
- c) Aplicação de suspensão bacteriana: composta basicamente pela homogeneização da bactéria liofilizada em água destilada estéril, obtida a concentração de 10^7 UFC mL⁻¹. Foi aplicado uma suspensão de 1 mL próximo à raiz da planta a cada sete dias contados a partir da emergência das plantas.

Os tratamentos estudados foram constituídos por tratamento com Bt nas sementes, variando-se a metodologia e a frequência de aplicação deste organismo. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 28 repetições.

Os tratamentos foram assim constituídos: (i) somente tratamento de sementes com Bt (TS), (ii) TS + adição de um *pellet* (concentrado bacteriano) ao solo (TS + Pellet), (iii) TS + inoculação de 1 mL da suspensão bacteriana no solo próximo a raiz da planta a cada sete dias

(TS + Aplicação), e (iv) testemunha, tratamento utilizando somente água estéril em substituição à bactéria.

2.1.4 Criação de *S. frugiperda*

Foram utilizadas lagartas provenientes da criação massal de *S. frugiperda* mantidas na Plataforma de Criação de Insetos da Embrapa Cenargen sob condições de 28°C de temperatura, 12 horas de fotoperíodo e 60% de umidade relativa. A alimentação de *S. frugiperda* foi baseada em dieta artificial composta de feijão, levedo de cerveja, germe de trigo, vitaminas e sais minerais (Schmidt et al., 2001).

2.1.5 Desenvolvimento de *S. frugiperda* alimentadas na fase larval em plantas de algodoeiro colonizadas por *B. thuringiensis*

2.1.5.1 Fase larval e de pupas

Para esse ensaio cada parcela foi constituída por uma planta de algodoeiro e uma lagarta (repetição), que permaneceram confinadas em uma gaiola durante todo o período larval. As gaiolas foram confeccionadas utilizando recipientes plásticos com capacidade para 2 L, 14 cm de diâmetro e 16,5 cm de altura contendo abertura de 8,5 cm de diâmetro no ápice da gaiola, com abertura nas laterais e revestida internamente com tecido “voile” (Figura 1A e 1B). Foram utilizadas lagartas neonatas para evitar qualquer condicionamento ao alimento. Para avaliação das características biológicas da espécie referente à fase larval, plantas com 22 dias de emergidas receberam duas lagartas recém-emergidas que foram depositadas no último par de folhas expandidas. Uma lagarta foi retirada de cada repetição após 48 horas da exposição, permanecendo apenas uma lagarta por planta que foi observada até a fase de pupa. Na base das gaiolas foi colocada uma tampa plástica que serviu como vedação do recipiente. Nesta tampa plástica foi realizado, previamente, uma abertura no centro de 2,5 cm de diâmetro para

confinamento da planta (que ocorreu aos 18 dias após a emergência da planta), vedada com algodão hidrófilo para evitar o contato direto do inseto com o solo.



Figura 1. Parcelas constituídas por gaiolas contendo lagartas de *S. frugiperda* em plantas de algodão inoculadas com *B. thuringiensis* e mantidas em ambiente de casa de vegetação (Fig. A e B). Os insetos permaneceram confinados durante todo seu período larval e foram expostos à alimentação contendo tratamento com *B. thuringiensis* nas sementes (TS) na concentração 10^8 UFC mL⁻¹; TS + adição de um *pellet* bacteriano (10^7 UFC mg⁻¹) adicionado ao solo (TS + Pellet); TS + aplicação de 1 mL da suspensão bacteriana a 10^7 UFC mL⁻¹ próximo a raiz das plantas no intervalo de sete dias (TS + Aplicação); e o tratamento testemunha conduzido na ausência da bactéria.

As plantas foram substituídas a cada sete dias para garantir a qualidade e a continuidade do alimento, com cuidado em oferecer plantas com a mesma idade e provenientes do mesmo tratamento até que as lagartas chegassem ao estágio de pupa.

As pupas obtidas foram coletadas, pesadas e sexadas de acordo com Butt e Cantu (1962). Em seguida, elas foram destinadas a recipientes plásticos (50 mL de capacidade), vedados com tampas de acrílico, e observadas até a emergência dos adultos. Mediante a emergência, os adultos foram avaliados em relação à presença de deformidades. Foram considerados

deformados, os adultos com asas defeituosas e com incapacidade de se desprender da pupa (Ng et al. 1985).

As características biológicas observadas foram: peso (mg) e comprimento médio (mm) das lagartas, duração média da fase larval (dias), viabilidade da fase larval (%), peso de pupas com 24 horas de formação (mg), duração da fase de pupas (dias), viabilidade das pupas (%), duração do período de lagarta a adulto (dias).

A pesagem das lagartas e pupas foi realizada em balança de precisão com quatro casas decimais (Denver M-310) e para o comprimento das lagartas foi utilizado paquímetro digital com duas casas decimais (DIGIMES 100.171).

2.1.5.2 Fase adulta de *S. frugiperda*

Na avaliação das características biológicas referentes à fase adulta, para cada tratamento foram construídas 10 gaiolas (repetições) contendo um casal de adultos normais cada uma, provenientes de lagartas que se alimentaram de plantas com Bt, e mantidas a 28 ± 2 °C, 12 horas de fotoperíodo e 60% de umidade relativa. As mariposas foram confinadas nestas gaiolas confeccionadas por recipientes plásticos com 14 cm de diâmetro e 16,5 cm de altura de capacidade para 2 L. A parte superior das gaiolas foi recoberta por papel toalha e vedada com tampa em material plástico contendo abertura de 12 cm de diâmetro. Para alimentação dos adultos, mantida no fundo da gaiola, dois recipientes (5mL) contendo um chumaço de algodão hidrófilo, um embebido em solução aquosa de mel a 5% (50 mL de mel + 950 mL de água destilada) e outro embebido em água estéril foram utilizados. O revestimento interno foi feito com papel sulfite e as soluções substituídas diariamente. Uma folha de algodoeiro, coletada da planta contendo o mesmo tratamentos correspondente ao tratamento em que a lagarta se desenvolveu, foi oferecida no fundo do recipiente como substrato de oviposição.

Foram realizadas avaliações diárias a partir da emergência dos adultos até sua morte, anotando-se o número de ovos presentes em cada gaiola para obtenção do número em dias gastos na oviposição. As massas de ovos foram retiradas a cada dias e, em seguida, a gaiola foi novamente revestida internamente com papel sulfite. A contagem de ovos foi feita de acordo com metodologia de Leuck e Perkins (1972), onde o número total de ovos da camada superior é multiplicado pelo número de camadas existentes na postura, somando-se os ovos contados nas bordas das camadas subseqüentes. As massas de ovos foram mantidas em placa de Petri (9,5 cm de diâmetro) e observadas diariamente durante cinco dias para verificar sua capacidade de emergência das larvas.

As características biológicas analisadas nesta fase foram: número médio e total de ovos/fêmea, período de oviposição (dias), viabilidade dos ovos (%), longevidade de machos e fêmeas (dias) e o porcentual de adultos deformados.

2.1.6 Comportamento de oviposição de *S. frugiperda* em plantas de algodão colonizadas por *B. thuringiensis*

2.1.6.1 Preparo do material vegetal

Para obtenção das plantas para este ensaio as sementes foram semeadas em vasos de material plástico de 2 L preenchidos com a mistura de solo autoclavado adubado e misturado ao substrato BioPlant® na proporção de 2:1. Os vasos foram colocados sobre pratos com 19,5 cm de diâmetro e mantidos em casa de vegetação a 30 ± 12 °C e umidade relativa de 47 ± 21 %.

Inicialmente, as pupas dos insetos foram sexadas, sendo mantidos 6 casais por gaiola constituída por material plástico com capacidade para 2L (14 cm de diâmetro e 16,5 cm de altura). A superfície interna foi forrada com papel sulfite branco e o recipiente da gaiola recoberto com papel toalha, sendo que a tampa continha abertura de 12 cm e internamente foi adicionado um recipiente de 50 mL contendo um chumaço de algodão hidrófilo embebido em

água estéril visando manter a umidade. Próximo à emergência dos adultos, um segundo recipiente de 50 mL contendo algodão embebido em solução aquosa de mel a 5% foi adicionado para alimentação dos adultos. Após 24 horas do início da oviposição, os adultos estavam prontos para serem liberados nas gaiolas contendo as plantas com Bt.

O ensaio de oviposição com chance de escolha foi realizado em gaiolas confeccionadas em cano PVC, revestidas com tecido tipo "tule", nas dimensões de 80 cm x 100 cm x 100 cm e contendo tiras de velcro na parte frontal em formato de "C" invertido para facilitar o manuseio. Plantas com 22 dias de emergidas foram dispostas dentro da gaiola de maneira equidistantes ao centro e foram randomizadas após cada avaliação para evitar o condicionamento do inseto na planta. As gaiolas foram colocadas sobre bancadas em casa de vegetação a uma distância de 2 metros na horizontal e de 1,7 metros uma da outra (Figura 2).

Os insetos foram liberados no centro da gaiola em número de 10 a 12 casais no período entre as 17 e 18 horas do dia evitando horários mais quentes permanecendo até a avaliação final. Após 24 horas da liberação, foi realizada a primeira leitura anotando-se o número de posturas por planta. Este procedimento se repetiu após 48 e 72 horas de iniciada a liberação dos insetos.

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso, com 10 repetições por tratamento constituídos por: (i) somente tratamento de sementes com Bt (TS), (ii) TS + adição de um *pellet* (concentrado bacteriano) ao solo (TS + Pellet), (iii) TS + inoculação de 1 mL da suspensão bacteriana no solo próximo a raiz da planta a cada sete dias (TS + Aplicação), e (iv) testemunha, tratamento utilizando somente água estéril em substituição à bactéria.



Figura 2. Gaiolas utilizadas no teste de não-preferência para oviposição com chance de escolha, confeccionada por tubos de PVC e revestidas por tecido tipo “tule” com abertura na parte frontal e fechamento com tiras de velcro. No interior foram confinadas plantas contendo os tratamentos com *B. thuringiensis* expostas à oviposição por *S. frugiperda*.

2.2 Condições experimentais dos ensaios com *B. tabaci* biótipo B

2.2.1 Criação de manutenção de *B. tabaci*

A população inicial de moscas brancas foi proveniente da Embrapa Arroz e Feijão - Goiânia-GO, pertencentes à colônia mantida por Dr. Josias Faria e Dr. Francisco Aragão, previamente identificada como *B. tabaci* biótipo B.

A colônia foi mantida em plantas de couve *Brassica oleracea* var. *acephala* (ISLA), e a criação foi realizada em gaiolas construídas por canos de PVC e tecido tipo “voile”, contendo 8 plantas, conduzidas em casa de vegetação a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura e $60 \pm 10\%$ de umidade relativa do ar. O manuseio na parte interna da gaiola foi possível erguendo-se o tecido das laterais que permaneceram fixos à mesa com auxílio de barras de madeira presas nas extremidades do tecido. As plantas foram irrigadas e substituídas conforme a necessidade para manutenção da sua qualidade nutricional.

2.2.2 Teste de aquisição de *Btk-gfp* por *B. tabaci* em plantas de algodeiro

Para o preparo do material vegetal foram utilizados 4 vasos contendo 3 plantas de algodão (BRS 8H após 18 dias da sementeira). As plantas foram cultivadas em vasos de polietileno nas dimensões 20 x 32 cm e preenchidos com 500 g da mistura solo e substrato BioPlant® estéreis na proporção 2:1.

A bactéria utilizada foi a estirpe que codifica o gene GFP, Btk-*gfp* (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* - *green fluorescent protein*) multiplicada em meio líquido suplementado com eritromicina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 48 horas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e 200 rpm em incubador rotativo (Monnerat et al., 2007). Um volume de 5 mL da suspensão bacteriana obtida foi inoculado no solo envolvendo o sistema radicular de cada planta. Dois vasos foram usados para inocular a bactéria contendo a proteína fluorescente e para o controle negativo foi utilizado somente água estéril.

Para a observação da capacidade de aquisição do Btk-*gfp* por *B. tabaci*, cinco dias após a realização da inoculação, 35 adultos não-sexados foram expostos e confinados nas plantas de algodoeiro por 48 horas permitindo a alimentação e oviposição. A gaiola foi confeccionada com tecido tipo "voile" e um aro em arame. O solo foi recoberto com papel alumínio para evitar o contato dos insetos. Após este período os adultos foram coletados com auxílio de um aspirador bucal e as plantas contendo as ninfas foram transferidas para gaiolas de 0,3 x 0,8 x 0,3 m de dimensão e recobertas com "voile". As plantas e ninfas permaneceram por 11 dias após o término da exposição dos adultos e cerca de 80 indivíduos (obtidos de folhas cotiledonares e do 1º nó de folhas verdadeiras), foram coletados para verificar a capacidade em adquirir a bactéria.

Os insetos foram coletados, desinfetados superficialmente com álcool 70%, hipoclorito 2%, água destilada estéril por 10 segundos em cada solução (Loureiro e Moino, 2006) e macerados na presença de NaCl 0,9%. Uma alíquota de 25 μL da amostra foi semeada em triplicata em placas de Petri contendo meio Embrapa ágar seletivo (eritromicina na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e incubadas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas a 200 rpm (Monnerat et al.,

2007). Após este período, e com auxílio de uma alça descartável estéril de um μL , foi coletada uma porção da bactéria infectante dos insetos, e no escuro suas colônias foram visualizadas por microscopia de fluorescência em microscópio Axiophot Zeiss (Jena, Germany) utilizando filtro 475-550 nm para detecção do *GFP* nas células vegetativas. O mesmo processo foi realizado para ninfas, mas sem que houvesse necessidade de desinfecção.

2.2.3 Teste de oviposição de *B. tabaci* em plantas de algodoeiro inoculadas com *B. thuringiensis*

Para realização deste ensaio foi instalada uma nova gaiola semelhante à obtida para manutenção e criação para *B. tabaci* (item 2.2.1), contendo seis plantas de couve e infestadas com adultos do inseto. A gaiola foi mantida em casa de vegetação a temperatura de 28 ± 2 °C e umidade relativa do ar a $60 \pm 10\%$.

Para o ensaio de oviposição, plantas de algodão foram conduzidas em recipientes (80 mL) contendo a mistura solo e substrato Bioplant® estéreis na proporção 2:1. Após o período de 15 dias da emergência as plantas estavam prontas para o ensaio.

Os isolados de Bt utilizados neste teste foram selecionados aleatoriamente a partir de diferentes sorotipos, de estirpes testadas na promoção de crescimento de plantas e contra *S. frugiperda* (Praça et al., 2012; da Costa et al, 2020). Foram testadas dez estirpes: S456 (*B. thuringiensis* subsp. *entomocidous*), S546 (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*), S599 (*B. thuringiensis* subsp. *kenyae*), S655 (*B. thuringiensis* subsp. *alesti*), S907 (*B. thuringiensis* subsp. não determinada), S1166 (*B. thuringiensis* subsp. *muju*), S1450 (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) (Btk), S1806 (*B. thuringiensis* subsp. *japonensis*), S1905 (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) e S2122 (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*).

A estirpe S1450 HD1 (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) foi obtida da Coleção de *B. thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus* do Instituto Pasteur, França. As demais estirpes da Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Cenargen.

Para o preparo do inóculo bacteriano uma tira de papel filtro (armazenada na coleção de bactérias) foi inoculada em erlenmeyer contendo 15 mL de meio Embrapa, multiplicada por 72 hs a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e 200 rpm em incubador rotativo (Monnerat et al., 2007). O crescimento foi acompanhado por microscópio ótico de contrastaste de fases para verificação das estruturas da bactéria na formação de esporos e cristais.

As plantas de algodão foram inoculadas com 5 mL da suspensão bacteriana de cada uma das estirpes inundando o solo próximo às raízes e aguardado um período de 48 horas antes da exposição aos insetos. Após a inoculação, as plantas não receberam mais água para irrigação. As plantas que receberam o inóculo foram organizadas em fileiras no interior da gaiola para realização do bioensaio a fim de que as plantas inoculadas ficassem entre as plantas infestadas com os insetos adultos. O sistema foi mantido por um período de 12 horas para que a oviposição ocorresse e, findo esse período de exposição, as plantas foram cuidadosamente retiradas das gaiolas para contagem dos ovos utilizando uma lupa Leica Microsystems (Germany) a 40x de magnificação.

Foram avaliadas cinco repetições para cada estirpe em delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos controles foram constituídos por plantas tratadas somente com água estéril e por plantas inoculadas com o meio Embrapa sem a bactéria.

2.3 Análise estatística

Os dados originais de médias de peso na fase larval e pupal de *S. frugiperda* foram transformados em $x^{1/2}$ antes das análises e, em seguida, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância

usando o programa estatísticos Assistat Versão 7.7 beta (Silva & Azevedo, 2016). Para os dados provenientes dos ensaios realizados com *B. tabaci* a ANOVA seguida do teste Tukey a 5% foi realizada empregando-se o software Sisvar Versão 5.8 (Ferreira, 2018).

3 RESULTADOS

3.1 Desenvolvimento de *S. frugiperda* em plantas de algodoeiro colonizadas por *B. thuringiensis*

3.1.1 Fase larval e pupal

As variáveis relativas ao desenvolvimento larval e de pupas de *S. frugiperda* desenvolvendo-se em plantas de algodão colonizadas por Bt estão representadas na Tabela 1. Observa-se que não houve diferenças significativas para nenhuma das características avaliadas.

A média do peso de larvas obtida para os métodos de tratamentos com Bt (49,03 mg) foi semelhante à obtida para a testemunha (53,18 mg) sem a bactéria. As médias variaram entre 41,78 e 56,85 mg nos tratamentos com Bt. O mesmo ocorreu com o comprimento das larvas com 14,67 mm para a média de larvas obtidas nos tratamentos com Bt, que variou de 13,44 e 15,65 mm de comprimento, contra 15,50 mm para a testemunha.

A duração média da fase larval foi de 27,3 dias nos tratamentos com Bt e de 27 dias para a testemunha, sendo que estes resultados não diferiram entre si significativamente.

O peso médio das pupas foi de aproximadamente 199,59 mg (194,94 e 203,57 mg) nos tratamentos com Bt e de 193,40 mg para o tratamento testemunha sem a bactéria (Tabela 1). A duração da fase de pupa foi cerca de 9 dias para todos os tratamentos incluindo a testemunha.

Para o período de larva a adulto foi observado um período com média de 36 dias (entre 35 e 37 dias) para os tratamentos com Bt, enquanto para a testemunha esse período foi de 35 dias (Tabela 1).

Tabela 1. Características da fase larval e de pupas observadas para *S. frugiperda* alimentadas em plantas da cultivar BRS 8H de algodoeiro tratadas com a estirpe S2122 de *B. truringiensis* utilizando os métodos de tratamento das sementes na concentração 10^8 UFC mL⁻¹ (TS), TS e adição de um pellet bacteriano ao solo (10^7 UFC mg⁻¹) no plantio (TS + pellet), TS e aplicação da suspensão bacteriana (10^7 UFC mL⁻¹) no solo a cada sete dias (TS + Aplicação). Para o tratamento testemunha foi utilizado água em substituição à bactéria. (média ± desvio padrão) (n=número de repetições)

Tratamento	Peso de larvas com 13 dias de idade (n=28)	Comprimento de larvas com 13 dias de idade (n=28)	Peso de pupas com 24 horas (n=23)	Duração da fase larval (n=26)	Duração da fase de pupa (n=23)	Período de larva a adulto (n=23)
	(mg)	(mm)	(mg)	-----	(dias)	-----
Testemunha	53,18 ± 14,22a	15,507 ± 1,964a	193,40 ± 22,74a	27,0 ± 2,56a	9 ± 1,10 a	35 ± 2,26 a
TS	48,47 ± 27,05a	14,920 ± 2,938a	200,75 ± 22,57a	27,5 ± 3,46a	9 ± 2,21 a	37 ± 3,77 a
TS + Pellet	56,85 ± 24,02a	15,657 ± 2,532a	194,45 ± 26,51a	26,0 ± 3,11a	9 ± 1,71 a	35 ± 3,02 a
TS + Apl.	41,78 ± 25,58a	13,446 ± 3,561a	203,57 ± 33,50a	28,5 ± 3,01a	9 ± 1,51 a	37 ± 2,81 a

Médias seguidas de mesmas letras nas colunas são apresentam diferença a 5% de significância pelo teste Tukey. Para análise os dados foram transformados em $x^{1/2}$.

Não houve mortalidade das larvas nos tratamentos com Bt, porém foi verificado um amarelecimento acentuado destas larvas nos primeiros dias de exposição nas plantas tratadas (Anexo 7). Aos 13 dias após o início da exposição ainda foi possível perceber que larvas alimentadas em plantas submetidas ao tratamento TS + Aplicação estavam debilitadas e com coloração amarelada, e apresentavam menor mobilidade. As larvas apresentaram uma desuniformidade em relação aos tamanhos constatada pelo elevado desvio padrão da média entre os tratamentos com Bt. Tal observação podem ser visualizadas no Anexo 8 após 22 dias de exposição nas plantas com larvas ainda apresentando coloração mais amareladas no tratamento com a bactéria.

Cerca de 18% das larvas que se alimentaram em plantas contendo o tratamento TS + Aplicação apresentavam comprimentos menores que 10 mm, algo que não foi verificado nos demais tratamentos com Bt ou no tratamento controle sem a bactéria. Observou-se que enquanto estas larvas não se alimentavam nas folhas jovens da planta submetidas ao tratamento TS + Aplicação, elas se alimentaram indiscriminadamente nas plantas do tratamento testemunha.

No tratamento TS + Pellet as larvas foram observadas mais comumente se alimentando em folhas mais velhas da planta (no primeiro e segundo par de folhas verdadeiras). Já o tratamento em que ocorreu somente o TS foi verificado a alimentação das lagartas nas folhas jovens. As lagartas no tratamento TS + Aplicação não se alimentaram nas folhas mais jovens do brotamento terminal da planta e apresentavam amarelecimento, textura mais amolecida e estavam menos móveis. No início do ensaio, larvas de *S. frugiperda* de instares iniciais apresentavam tendência em se alimentar nas bordas do limbo foliar (Anexo 7). Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas para estas características, essas observações podem ser de importância para ensaios futuros visando avaliar a preferência alimentar de insetos-pragas nas plantas em virtude da interação com a bactéria.

3.1.2 Fase adulta de *S. frugiperda*

Os valores referentes aos parâmetros biológicos da fase adulta de *S. frugiperda* alimentadas em plantas de algodão colonizadas por Bt estão representados na Tabela 2.

Foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para a fase adulta de fêmeas. Nesta fase, a longevidade das fêmeas adultas no tratamento TS + Aplicação (13,5 dias) foi aumentada em cerca de quatro dias em relação a testemunha (9,5 dias) ($F= 1,2643$; $P= 0,3012$). Os tratamentos TS e TS + Pellet não diferiram da testemunha sem a aplicação da bactéria e tão pouco do tratamento contendo TS + Aplicação (Tabela 2).

A fase adulta dos machos foi semelhante entre todos os tratamentos. Ainda quanto à longevidade dos adultos, verificou-se que as fêmeas foram mais longevas do que os machos (aproximadamente 11,8 dias), em média 2,6 dias a mais do que os machos (Tabela 2).

Apesar da fase adulta das fêmeas ter sido alterada no tratamento TS + Aplicação do Bt, este aumento de longevidade não se refletiu no aumento da fecundidade, tendo em vista que o número total de ovos de *S. frugiperda* nos tratamentos foi semelhante entre todos os tratamentos (Tabela 2).

O período de oviposição não apresentou diferença significativa entre os tratamentos avaliados. Foram registrados uma média de 3,9 dias de oviposição para o tratamento TS, 6,0 dias para o TS + Pellet e 5,9 dias para o TS + Aplicação, correspondendo a 35,4%, 54,5 e 43,7%, respectivamente, do período gasto para oviposição na fase adulta. Este período de oviposição correspondeu a média de 5,2 dias, aproximadamente 54,7% da fase adulta, para o tratamento em que não ocorreu a aplicação com Bt.

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos em relação ao número total de ovos por fêmea de *S. frugiperda* (Tabela 2). O número total de ovos por fêmea nos tratamentos TS, TS + Pellet e TS + Aplicação foram 986,1 ovos; 896,3 ovos e 1029,2 ovos. No tratamento testemunha foram registrados 1121,1 ovos totais por fêmea.

O número médio de ovos por fêmea nos três primeiros dias após o início da oviposição também não diferiu estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 2). Os tratamentos com Bt apresentaram médias com valores de 223,66 para o TS, de 188,85 para o TS+Pellet e 238,26 para o TS + Aplicação. Para a testemunha esta média nos três primeiros dias de oviposição foi de 273,58 ovos por fêmea (Tabela 2).

Foi verificada a emergência de larvas obtidas das massas de ovos coletadas a partir da oviposição de adultos em plantas tratadas com Bt. Para o percentual de viabilidade do total de ovos obtidos na oviposição foi registrado 81,8% para o tratamento TS; 72,4% para TS + Pellet

e 69,0% para TS + Aplicação. O tratamento testemunha exibiu o percentual de 76,6% de viabilidade (Tabela 2).

Foi observada a ocorrência de um adulto deformado para o tratamento TS (4,34%) e dois adultos deformados encontrados no tratamento TS + Aplicação (8,69%) para um total de 23 indivíduos avaliados por tratamento. Para o tratamento testemunha e para o TS + Pellet não foi verificado adulto apresentando deformidades.

As fêmeas de *S. frugiperda* apresentaram um mesmo padrão de oviposição nos tratamentos, sendo que as posturas foram depositadas em maior quantidade nos três primeiros dias para todos os tratamentos (Figura 3). O tratamento TS apresentou período de oviposição somente até o sexto dia (Figura 3).

Tabela 2. Características biológicas da fase adulta de *S. frugiperda* desenvolvendo-se sobre plantas de algodão (cultivar BRS 8H) colonizadas pela estirpe S2122 de *B. thuringiensis*. Os métodos utilizados foram o tratamento de sementes na concentração 10^8 UFC mL⁻¹ (TS), TS e adição de um pellet bacteriano (10^7 UFC mg⁻¹) adicionado ao solo no plantio (TS + Pellet), TS e aplicação da suspensão bacteriana (10^7 UFC mL⁻¹) no solo a cada sete dias (TS + Aplicação). Para o tratamento testemunha foi utilizado água em substituição a bactéria. (média ± desvio padrão) (n=número de repetições)

Tratamento	Fase adulta do macho	Fase adulta da fêmea*	Período de oviposição	Nº médio de ovos/fêmea/dia	Nº total de ovos/fêmea	Nº médio de ovos nos 3 primeiros dias	% de ovos viáveis no período
	dias						
n = 10							
Testemunha	8,5 ± 2,24a	9,5 ± 1,95b	5,2 ± 1,82a	204,84 ± 74,26a	1122,1 ± 518,73a	273,58 ± 107,16a	76,61
TS	10,2 ± 2,60a	11,0 ± 4,30ab	3,9 ± 2,22a	212,42 ± 92,11a	986,1 ± 575,08a	223,66 ± 129,26a	81,85
TS + Pellet	8,7 ± 1,73a	11,0 ± 4,58ab	6,0 ± 1,95a	151,83 ± 79,69a	896,3 ± 515,35a	188,85 ± 105,85a	72,43
TS + Apl.	8,8 ± 1,53a	13,5 ± 2,76a	5,9 ± 2,17a	172,91 ± 86,95a	1029,2 ± 546,45a	238,26 ± 124,42a	69,00

*médias seguidas de mesmas letras nas colunas apresentam diferença a 5% de significância pelo teste Tukey.

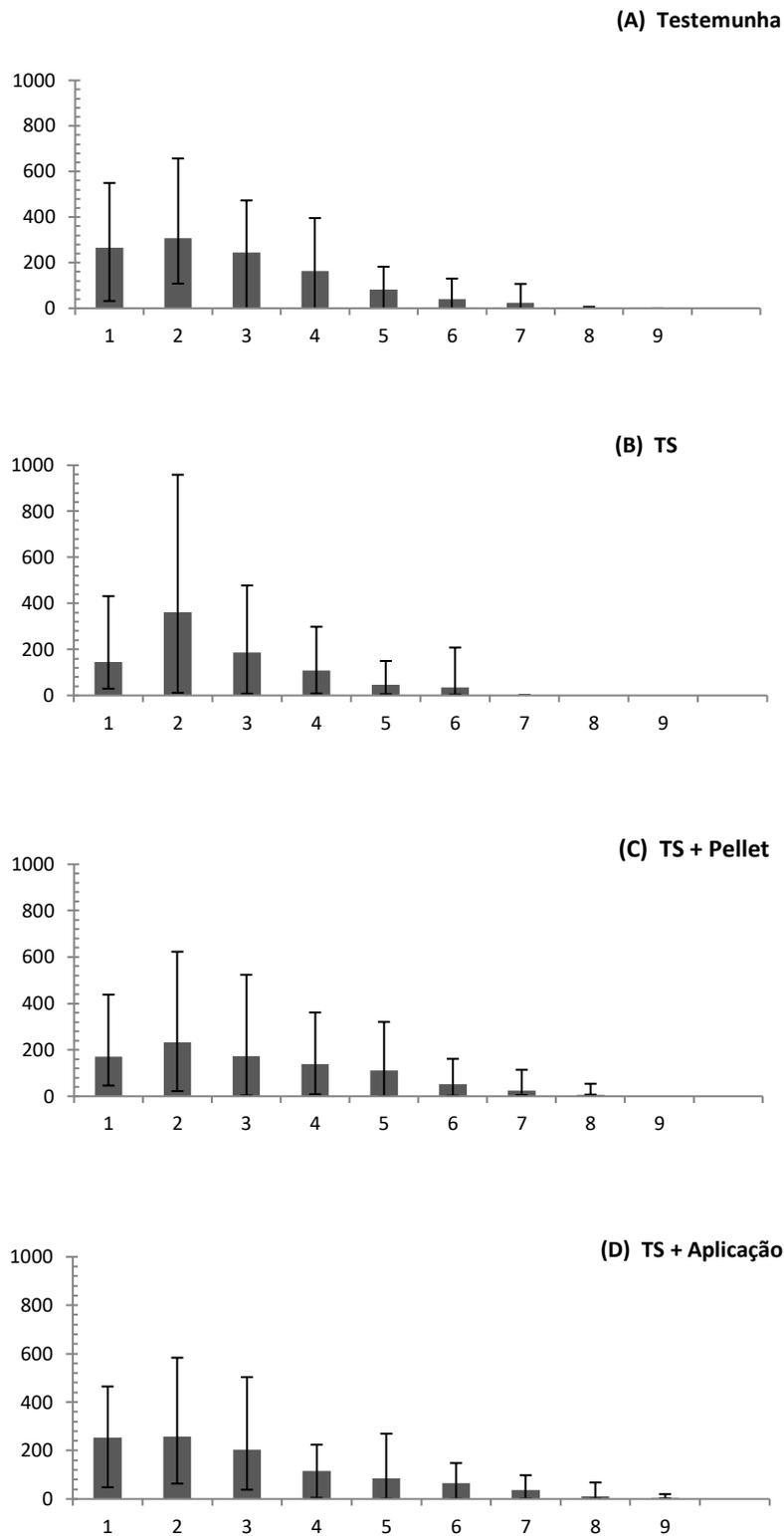


Figura 3. Padrão temporal de oviposição de *Spodoptera frugiperda* na cultivar BRS 8H com *B. thuringiensis* (Bt) utilizando os métodos de aplicação da bactéria: Testemunha sem o Bt (Fig. 3A), Tratamento na semente (TS) (Fig. 3B), TS + adição de pellet da bactéria no solo de plantio (Fig. 3C) e TS +Aplicação da bactéria semanalmente (Fig. 3D).

3.1.3 Comportamento de oviposição de *S. frugiperda* em plantas de algodão colonizadas por *B. thuringiensis*

No estudo de oviposição com chance de escolha, não houve diferença quanto ao número de oviposições encontradas entre os tratamentos decorridas 24 e 48 horas do início da exposição dos adultos (Figura 4).

Nota-se, contudo, que após 72 horas da exposição, esse padrão não foi mais observado e o tratamento Testemunha apresentou maior número médio de oviposições (6,9) comparado aos tratamentos TS + Pellet (2,6) e TS + Aplicação (3,7), porém foi semelhante ao TS (4,3) ($F=3,0983$, $P=0,4113$).

Foi observada postura de *S. frugiperda* na gaiola, porém as posturas contidas fora da planta não foram consideradas nas avaliações.

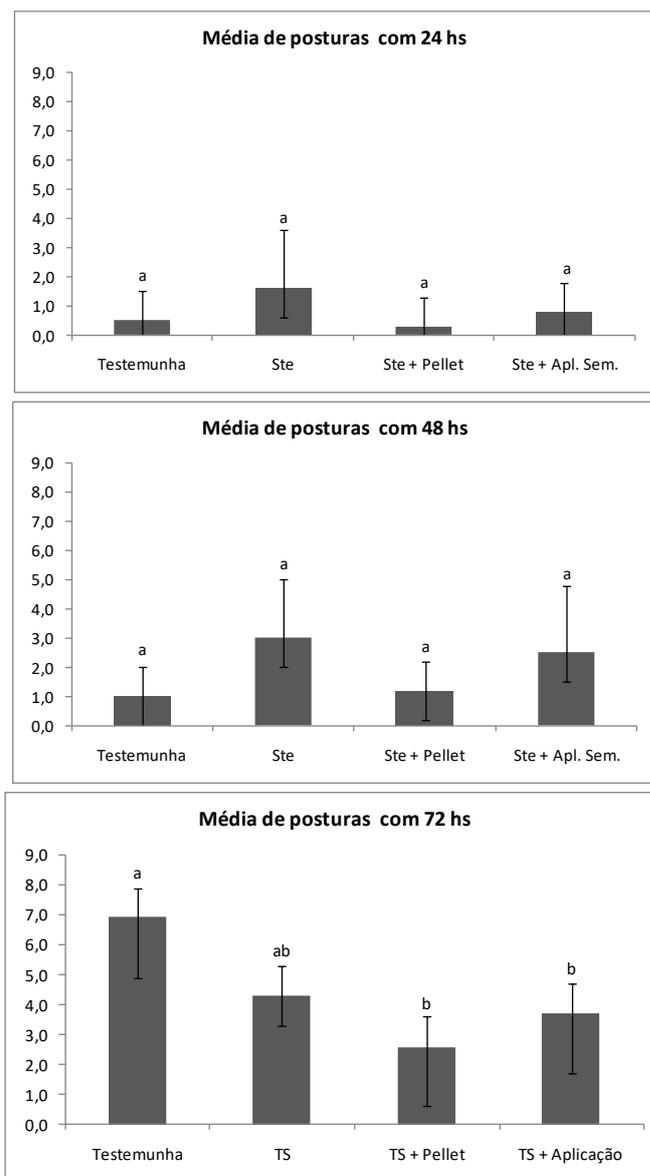


Figura 4. Média do número de ovos de *S. frugiperda* em plantas de algodoeiro tratadas com a estirpe S2122 de *B. thuringiensis*. Os gráficos apresentam o número médio de posturas observadas as decorridas 24, 48 e 72 horas do início da exposição das plantas aos adultos. Tratamento nas sementes de concentração 10^8 UFC mL⁻¹ (TS), TS e adição de um pellet a 10^7 UFC mg⁻¹ no solo de plantio (TS + Pellet), TS e aplicação da suspensão bacteriana com 10^7 UFC mL⁻¹ no solo a cada sete dias (TS + Aplicação), água (Testemunha). (n= 10; número de gaiolas)

3.2 Teste de aquisição de *Btk-gfp* por *B. tabaci* biótipo B em plantas de algodoeiro

O crescimento bacteriano obtido a partir do macerado de adultos (Figura 5) e ninfas (Figura 6) de *B. tabaci* alimentando-se em plantas de algodoeiro inoculadas com Bt estão representados nas figuras. O conteúdo bacteriano recuperado de adultos e ninfas foi observado sob luz epifluorescente e mostrou que as células expressavam a proteína fluorescente utilizada para inocular as plantas.

Os resultados demonstram que as raízes das plantas de algodão têm capacidade em absorver a bactéria inoculada no solo, e pela movimentação ascendente do Bt, que a bactéria foi capaz de chegar aos tecidos foliares e estar disponível para alimentação por adultos e imaturos de *B. tabaci* (Figuras 5 e 6).

Não foi observado crescimento bacteriano a partir do macerado de adultos e ninfas de *B. tabaci* alimentados em plantas do tratamento controle (sem a bactéria).

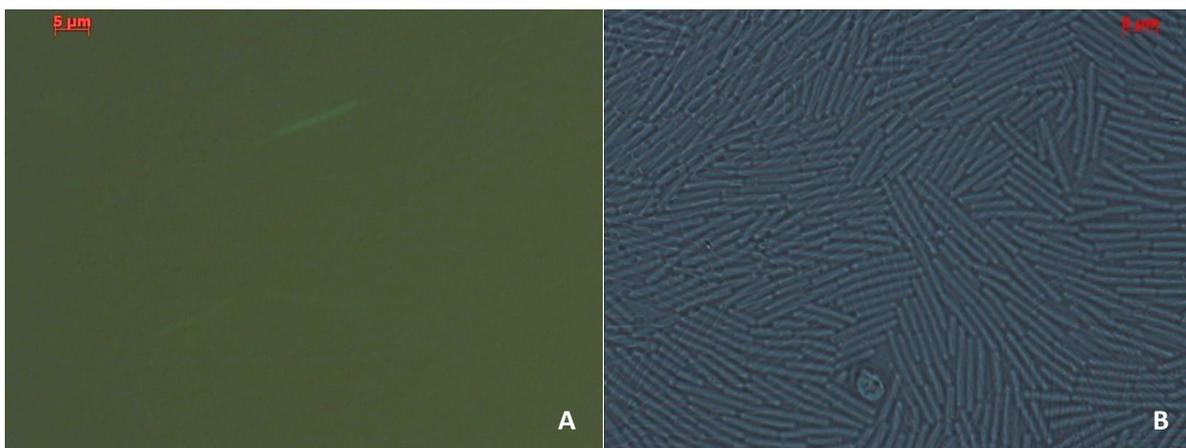


Figura 5. Fotomicrografias fluorescentes de células bacterianas isoladas de adultos de *B. tabaci* expostos a alimentação por 48 horas em plantas de algodoeiro tratadas com *Btk-gfp* no solo. As imagens foram obtidas em microscópio Axiophot (Zeiss) equipado com iluminação epifluorescente no comprimento de onda de 475 - 550 nm, no escuro (Fig. 5A); com exposição somente à luz branca (Fig. 5B).

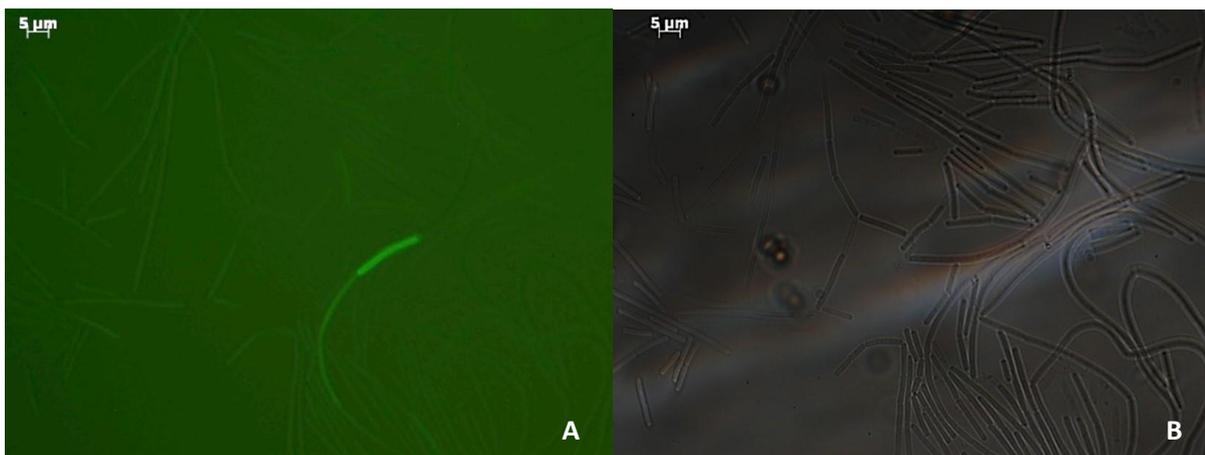


Figura 6. Fotomicrografias fluorescentes de células bacterianas isoladas de ninfas de *B. tabaci* coletadas em plantas de algodoeiro tratadas com *Btk-gfp* que contém o gene codificador da proteína fluorescente. As imagens demonstram a capacidade da bactéria em colonizar a planta a partir das raízes e ainda estarem disponíveis a ninfas aderidas às folhas. Imagem obtida em microscópio equipado com iluminação epifluorescente no comprimento de onda de 475 - 550 nm, no escuro (Fig. 6A); imagem obtida sob exposição à luz branca (Fig. 6B).

3.2 Teste de oviposição de *B. tabaci* em plantas de algodoeiro inoculadas com *B. thuringiensis*

Após 12 horas de infestação de *B. tabaci* em plantas de algodoeiro inoculadas com Bt, foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos contendo os isolados testados (Tabela 3).

A estirpe S1806 apresentou um menor número de ovos de *B. tabaci* em relação à testemunha que utilizou somente água e as estirpes S456 e S1166 ($F= 1,794$; $P= 0,08145$). Entretanto, esta estirpe foi semelhante aos demais isolados testados e a testemunha que utilizou o meio de cultivo utilizado para inocular as raízes das plantas.

As plantas contendo inóculo com as estirpes S1166, S1450 e S655 apresentaram uma maior densidade de ovos com respectivamente 511,4; 453,0 e 336,6 ovos por planta. As menores quantidades de ovos foram observadas para S1806 com 108,8 ovos e S907 com 197,6

ovos por planta (Tabela 3). O tratamento contendo as estirpes S599, S1905, S2122, S456, S546 e a testemunha com meio Embrapa apresentou quantidade variável de ovos entre 223,8 e 296,2 ovos por planta.

Tabela 3. Número médio de ovos por planta após infestação por *Bemisia tabaci* 12 horas em plantas inoculadas com *B. thuringiensis*. (média \pm desvio padrão)

Tratamento	Nº médio de ovos após 12 horas
Testemunha (água)	410,2 \pm 222,77b
Testemunha (meio Embrapa)	285,4 \pm 205,51ab
S456	289,6 \pm 97,99 b
S546	296,2 \pm 147,22 ab
S599	223,8 \pm 130,42 ab
S655	336,6 \pm 184,13 ab
S907	197,6 \pm 94,50 ab
S1166	511,4 \pm 314,13 b
S1450	453,0 \pm 296,17 ab
S1806	108,8 \pm 53,42a
S1905	240,8 \pm 96,96 ab
S2122	259,6 \pm 128,14 ab

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Proteínas inseticidas de Bt são usadas como componentes ativos de biopesticidas e como protetores incorporados à planta em cultivos transgênicos. Um dos atributos mais relevantes dessas tecnologias inseticidas à base de proteína Bt é sua alta especificidade, que garante a ausência de efeitos prejudiciais sobre insetos não-alvo, vertebrados e o meio ambiente (Jurat-Fuentes & Crickmore, 2017).

Há muitos relatos do uso de *B. thuringiensis* como produto inseticida ou da utilização das suas toxinas para inserção em plantas resistentes a insetos suscetíveis (Silva et al., 2016; Bravo et al., 2017; Soberón et al., 2018; Liu et al., 2018; Dorta et al., 2020). É reconhecido ainda o papel de *Bacillus* spp. como antagonista a fitopatógenos e promotor do crescimento de plantas (Dong-Jun et al., 2012; Gomis-Cebolla e Berry, 2022; Peterson et al., 2023). Porém pouco se sabe a respeito de como a bactéria colonizadora de plantas atua sobre insetos danosos que delas se alimentam quando presente e naturalmente adquirida no tecido das plantas.

Existe a possibilidade da existência de uma forma metabolicamente ativa de *B. thuringiensis* no filoplano (Bizzarri e Bishop, 2008; Monnerat et al., 2009). Uma hipótese melhor aceita é a de que a ingestão da bactéria em quantidades passíveis de provocar intoxicação no invertebrado suscetível durante a alimentação na planta (Melatti et al., 2010; Praça et al., 2012; García-Suárez et al., 2017). Outra hipótese é a de que existe a produção de compostos ligados a indução da resistência sistêmica, que podem ser estimulados na planta colonizada por Bt durante a alimentação do inseto-praga (Pierterse et al., 2014; Pangesti et al., 2016).

Há relatos de que *B. thuringiensis* ao ser introduzido no solo, coloniza e se estabelece na planta de forma transitória. No entanto, há evidências circunstanciais de que o *B. thuringiensis* pode se estabelecer de forma replicativa na superfície foliar (Belousova et al., 2021; Melatti et al., 2010; Monnerat et al., 2003; Damgaard et al., 1997; Smith e Barry, 1998). De acordo com Bisht et al. (2013) o fato do *B. thuringiensis* poder translocar-se endofiticamente na planta, favorece seu uso no controle de insetos-praga sejam eles insetos mastigadores, sugadores, pragas de solo ou vetores de fitopatógenos.

Os trabalhos conduzidos por Bizzarri e Bishop (2008) descrevem ainda a capacidade de *B. thuringiensis* em colonizar e multiplicar no filoplano de plantas de trevo (*Trifolium hybridum*) sendo encontrado tanto os esporos quanto as formas vegetativas do *B. thuringiensis*,

apresentando a toxina cry possuidora de genes da δ -endotoxina que é tóxica a insetos suscetíveis.

Prabhakar e Bishop (2009) estudaram o efeito de folhas de *Brassica campestris* var. *chinensis* colonizada por *B. thuringiensis* inoculadas no solo contra larvas neonatas de *Pieris brassicae* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pieridae) e observaram mortalidade de 35% da população. Porém o percentual de insetos sobreviventes não mostrou efeitos nocivos durante o tempo de estudo.

A capacidade de multiplicação e translocação do *B. thuringiensis* em plantas também foram relatadas por Cunha (2018), García-Suárez et al. (2017), e Praça et al. (2012). A confirmação da efetiva colonização de plântulas por *B. thuringiensis* demonstrou ainda que esta bactéria pode ser usada endofiticamente para controlar *P. xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), uma praga críptica que causa injúria em espécies de brássicas (Praça, 2012).

O potencial da estirpe HD-73 de *B. thuringiensis* em colonizar plantas também foi demonstrada por García-Suárez et al. (2017). Plantas de feijão inoculadas com a bactéria na rizosfera foram capazes de apresentar toxinas da bactéria contendo atividade inseticida nos tecidos internos das plantas. A toxicidade das plantas tratadas foi maior do que as das plantas do tratamento controle quando submetidas a bioensaio com larvas de *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Os resultados demonstraram que 48% das larvas de primeiro instar de *T. ni* morreram nas plantas tratadas enquanto 23% de mortalidade foi observada nas plantas controle. Em *Arabidopsis thaliana*, foi apresentada a transmissão vertical da estirpe de *B. thuringiensis* marcada com a proteína GFP.

O peso das larvas de *S. frugipeda* foi negativamente impactado pela alimentação em folhas das plantas de gramíneas tratadas com *Bacillus* spp. As larvas pesaram até 40% menos que larvas que se alimentaram em plantas do tratamento controle. Porém não houve efeito negativo no desenvolvimento larval até a formação de pupas (Murphey Coy et al., 2017). Tais

fatores levantam questões relativas ao papel desempenhado por *B. thuringiensis* dentro da planta e como propriamente desencadeia seu mecanismo sobre insetos-alvo.

Neste trabalho não foi observada interferência negativa da planta de algodão tratada com *B. thuringiensis* sobre a fase larval e adulta de *S. frugiperda*. Porém não se conhece o efeito desta interação na sucessão das larvas, pois neste trabalho não foram realizadas avaliações sobre a progênie.

Um fator importante é que as plantas sejam capazes de detectar e permitir a entrada do microrganismo benéfico e diferenciar as lesões causadas por herbívoros a fim de que o mecanismo de defesa seja acionado. Acredita-se que o ácido jasmônico desempenha um papel vital no estabelecimento e na regulação destas interações (Yan e Xie, 2015). Sua atuação se dá através da ativação de expressão de genes relacionados à defesa e produção de substâncias químicas secundárias tóxicas e geração de compostos orgânicos voláteis (COVs) (Pieterse et al. 2009; Bonaventure et al., 2011; Erb et al., 2012; Campos et al., 2014).

A estirpe S2122 de *B. thuringiensis* mostrou ser capaz de promover o crescimento e desenvolvimento em plantas de algodoeiro. O trabalho conduzido por Nagle (2012) mostrou que *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) foi capaz de distinguir entre plantas de algodão tratadas com bactérias promotoras de crescimento e plantas não tratadas. Mais precisamente, o tratamento contendo bactérias do gênero *Bacillus* influenciaram no comportamento de oviposição de *S. exigua*.

É interessante entender os níveis de transcrição de genes e a atividade enzimática relacionada à defesa e emissão de compostos orgânicos voláteis (COVs) em plantas colonizadas e danificadas por *S. frugiperda*. Existem respostas de sinalização tardia em glândulas de *Spodoptera* spp. associadas a alimentação que induzem defesas nas plantas atacadas, regulando a atividade enzimática ligada à biossíntese do ácido jasmônico e à produção de terpenos voláteis (COVs) (Zebelo et al., 2014). Estas informações de sinalização aliada a expressão de genes

envolvidos na defesa podem ser importantes para entender a o papel e a interação de *B. thuringiensis* na planta com o inseto-praga.

Van Oosten et al. (2008) no estudo com inoculantes microbiano encontraram um impacto negativo sobre *S. exigua* desenvolvendo-se em *Arabidopsis*, mas não observaram impacto negativo sobre *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae). O tratamento de *Arabidopsis* com *Pseudomonas syringae* não aumentou a atratividade de *S. exigua* para as plantas. Entretanto, a inoculação com *P. syringae* foi capaz de induzir ácido jasmônico e os voláteis de plantas em condições de casa de vegetação (van Oosten et al. 2008).

A mistura contendo espécies de *Bacillus* promotoras de crescimento elevou os níveis de gossipol e de ácido jasmônico em folhas de algodão, causandoredução na alimentação e no peso de larvas de *S. exigua* (Zebelo et al., 2016).

O efeito da resistência induzida por microrganismos em plantas sobre insetos varia muito com relação aos resultados obtidos, uma vez que os estudos anteriores utilizam diferentes hospedeiros, diferentes plantas, insetos e inoculantes microbianos, além de interagirem com os fatores abióticos prevalentes (van Oosten et al., 2008; Stout et al., 2006). Portanto, é possível que sejam encontradas respostas de toxicidade diferentes das encontradas para insetos-praga na interação com a planta tratada com bactérias, incluindo o *B. thuringiensis*.

O peso e o desenvolvimento de *S. frugiperda* em plantas de algodão não foram afetados pelo tratamento com *B. thuringiensis* neste trabalho. No entanto, plantas tratadas e não tratadas foram ovipositados diferentemente após 72 horas de exposição.

Determinar quais os mecanismos que foram responsáveis pela diferença de oviposição ainda parece prematuro. Porém podemos verificar que os herbívoros são capazes de utilizar os voláteis de plantas para a localização de seus hospedeiros (Dicke & van Loon, 2000) e plantas de algodão tratadas com bactérias promotoras de crescimento são capazes de modificar o perfil de voláteis (Ngumbi, 2011). Considerando os efeitos desses voláteis em plantas tratadas com a

bactéria benéfica, as fêmeas durante sua procura para oviposição, buscam colocar seus ovos em plantas que são de melhor qualidade para o desenvolvimento da progênie (Vendramin et al., 2009; Lynch, 1984).

Deste modo, foi observado que fêmeas da broca do milho, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae), diferenciaram entre plantas tratadas com bactérias e plantas não tratadas, e depositaram menos ovos em plantas com tratamento contendo uma única cepa de *Bacillus pumilus* (Disi et al., 2018). Porém, o peso larval não foi afetado pelo tratamento com a bactéria. Observou-se ainda que o tratamento induziu diferenças qualitativas e quantitativas nos perfis de voláteis (COVs) das plantas de milho interferindo na interação da planta com o inseto. Estes efeitos sugerem que a bactéria pode afetar diferentemente as fases adultas e larvais de insetos herbívoros em função da produção de compostos voláteis em plantas colonizadas com o microorganismo.

Neste trabalho foi demonstrado também a movimentação sistêmica do Bt, a capacidade de disponibilização bacteriana nas estruturas foliares e de aquisição pelo estágio adulto e imaturo de *B. tabaci*. Os adultos ovipositaram em menor quantidade em plantas de algodão tratadas com S1806 de *B. thuringiensis* comparadas a plantas tratadas somente com água.

É possível que a bactéria inoculada tenha sido absorvida pelas raízes e transportada para a parte aérea da planta pelos vasos do xilema, e que este transporte poderia ocorrer também pelo floema da planta, já que o floema é o local preferencial de alimentação de *B. tabaci*, apesar da espécie também realizar picadas de prova nos vasos do xilema (Moreno-Delafuente et al., 2013). Resultados de estudos anteriores sugerem que estirpes e proteínas de *B. thuringiensis* possuem efeito de atividade tóxica sobre alguns hemípteros (Salazar-Magallon et al., 2015; Torres-Quintero et al.; Sánchez et al., 2019; Torres Cabra e Hernandez Fernandez, 2019).

A estirpe de *B. subtilis* quando inoculada em plantas reduziu o número de mosca branca encontrado sobre plantas tratadas com a bactéria (Hanafi et al., 2007). Outros estudos

observaram que o tratamento com *B. subtilis* promoveu o crescimento de plantas de tomate, reduziu a preferência e a densidade dos estágios iniciais de *B. tabaci*. A resposta de resistência sistêmica da planta inoculada com a cepa de *Bacillus* promotora de crescimento na supressão do inseto teve como elicitador o ácido jasmônico, quando comparada a plantas inoculadas com a bactéria não promotora de crescimento ou planta com adição somente de água (Valenzuela-Soto et al., 2010).

Ao contrário, o tratamento com *Pseudomonas fluorescens* WCS417r induziu a alimentação no floema em *A. thaliana*. O tratamento com *P. fluorescens* WCS417r afetou positivamente o ganho de peso e o crescimento do pulgão *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae), mas não obteve efeito sobre o pulgão *Brevicoryne brassicae* Linnaeus (Hemiptera: Aphididae) (Pineda et al., 2012).

Em bioensaios em que se realizou a inoculação bacteriana diretamente no substrato de mudas de laranjeira (*Citrus sinensis*), observou-se que a estirpe *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 provocou supressão e mortalidade de 38% das ninfas de *D. citri* após 24 horas da aplicação. Ademais, a capacidade de aquisição de *B. thuringiensis* por *D. citri* foi demonstrado marcando a bactéria com *GFP* (Cunha et al., 2017).

Resultados semelhantes foram relatados por Gadhave et al., (2016) que verificaram que o tratamento de plantas de brócolis com inoculação individual ou em mistura com *B. cereus*, *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* afetaram negativamente o crescimento e desenvolvimento do pulgão *B. brassicae*. Em contraponto, as ninfas de *B. tabaci* desenvolveram-se mais rapidamente e apresentaram maior sobrevivência após se alimentarem de plantas de tomateiro que foram inoculadas com *P. fluorescens* WCS417r (Shavit et al., 2013).

Os resultados obtidos neste trabalho não indicaram efeito tóxico das plantas tratadas com *B. thuringiensis* sobre *S. frugiperda*. Contudo, foram feitas observações como amarelecimento, diminuição da mobilidade e estrutura amolecida nas lagartas do tratamento com a bactéria que

também foram observados por da Costa et al., (2020). Foram observadas ainda larvas menores do que 10 mm nos tratamentos com *B. thuringiensis* nas sementes e adição da suspensão bacteriana semanalmente. Lagartas com essas características podem estar mais suscetíveis a serem mais facilmente controladas por outras estratégias de controle.

Os resultados aqui discutidos apresentam a possibilidade de haver diferentes respostas da interação entre plantas com *B. thuringiensis* sobre diferentes ordens de inseto-pragas. Este fato sugere a capacidade de se explorar novas cepas do *B. thuringiensis* promotoras de crescimento de plantas a fim de alcançar efeito de proteção e defesa da planta, ou algum grau de controle que aumente a suscetibilidade da praga.

É interessante explorar a possibilidade de uso da estirpe de *B. thuringiensis* como um todo, ou seja, como colonizador de plantas. Diferentemente da forma como atualmente é utilizada, através da pulverização em lavouras ou da introdução de proteínas inseticidas expressas em plantas geneticamente modificadas, a inoculação na semente pode proporcionar outros ganhos que essas formas de uso atual não exploram. Uma única estirpe de *B. thuringiensis* apresenta uma diversidade de proteínas e compostos bioativos que podem desempenhar efeito benéfico na promoção do crescimento da planta e ação de controle sobre insetos. A exploração de interações benéficas entre plantas e microorganismos são essenciais na natureza a fim de assegurar uma agricultura mais sustentável.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELOUSOVA, M. E.; MALOVICHKO, Y. V.; SHIKOV, A. E.; NIZHNIKOV, A. A.; ANTONETS, K. S. Dissecting the environmental consequences of *Bacillus thuringiensis* application for natural ecosystems. *Toxins*, 13: 355, 2021.

BISHT, S. C.; MISHRA, P. K. Ascending migration of endophytic *Bacillus thuringiensis* and assessment of benefits to different legumes of NW Himalayas. *European journal of soil biology*, 56: 56-64, 2013.

BIZZARRI, M. F.; BISHOP, A. H., The ecology of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane: colonization from soil, plasmid transfer, and interaction with larvae of *Pieris brassicae*. *Microbial Ecology*, 56: 133-139, 2008.

BONAVENTURE, G.; VANDOORN, A.; BALDWIN, I. T. Herbivore-associated elicitors: FAC signaling and metabolism. *Trends Plant Sci.* 16: 294-299, 2011.

BRAVO, A.; PACHECO, S.; GÓMEZ, I.; GARCIA-GÓMEZ, B.; ONOFRE, J.; SOBERÓN, M. Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and their mechanism of action. *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus: Characterization and Use in the Field of Biocontrol*, 53-66, 2017.

BUTT, B. A.; CANTU, E. Sex determination of lepidopterous pupae. United States Department of Agriculture, Washington, 7: 33-75, 1962.

CAMPOS, M.L.; KANG, J.H.; HOWE, G.A. Jasmonate-triggered plant immunity. *Journal of Chemical Ecology*, 40: 657–675, 2014.

CASTRO, M. T.; MONTALVÃO, S. C. L.; MONNERAT, R. G. Control of mahogany shoot borer, *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae), with *Bacillus thuringiensis* in a systemic way. *Nativa*, 7: 426-430, 2019.

COSTA, F. S. S. *Bacillus thuringiensis* como endofíticos em algodão: avaliação na promoção de crescimento e controle de *Spodoptera frugiperda*. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília, Brasília, 99 p., 2014.

CUNHA, T.; DORTA, S. O.; MONNERAT, R. *Bacillus thuringiensis* translocation inside citrus plants and insecticidal activity against *Diaphorina citri*, vector of HLB causal agents. In: Hemipteran-Plant Interactions Symposium, 3., 2017, Madri. From sub-cellular hemipteran-host plant-pathogen interactions to pest/disease management: book of abstracts... Madri: ICA-CSIC, 2017, 2017.

DA COSTA, F. S. S.; PRAÇA, L. B.; GOMES, A. C. M. M.; DOS SANTOS, R. C.; SOARES, C. M. S.; MONNERAT, R. G. *Bacillus thuringiensis* Effect on the Vegetative Development of Cotton Plants and the Biocontrol of *Spodoptera frugiperda*. *Agronomy*, 10: 1889, 2020.

DAMGAARD, P. H.; HANSEN, B. M.; PEDERSEN, J. C.; EILENBERG, J. Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cabbage foliage and in insects associated with cabbage crops. *Journal of Applied Microbiology*, 82: 253-258, 1997.

DICKE, M.; VAN LOON, J. J. A. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 97: 237-249, 2000.

DISI, J. O.; ZEBELO, S.; KLOEPPER, J. W.; FADAMIRO, H. Seed inoculation with beneficial rhizobacteria affects European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) oviposition on maize plants. *Entomological Science*, 21: 48-58, 2018.

DONG-JUN, S.; NGUYEN, D. M. C.; SONG, Y. S.; JUNG, W. J. Induction of defense response against *Rhizoctonia solani* in cucumber plants by endophytic bacterium *Bacillus thuringiensis* GS1. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 22: 407-15, 2012.

DORTA, S. D. O.; BALBINOTTE, J.; MONNERAT, R.; LOPES, J. R. S.; DA CUNHA, T.; ZANARDI, O. Z.; DE MIRANDA, M. P.; MACHADO, M. A.; DE FREITAS-ASTÚA, J. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains in citrus and their pathogenicity to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) nymphs. *Insect science*, 27: 519-530, 2020.

ERB, M.; MELDAU, S.; HOWE, G. A. Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends Plant Sci.* 17: 250-259, 2012.

FERREIRA, D. F. Sisvar versão 5.8. Programa para análise estatísticas e ensino. Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2018.

GADHAVE, K. R.; FINCH, P.; GIBSON, T. M.; GANGE, A. C. Plant growth-promoting *Bacillus* suppress *Brevicoryne brassicae* field infestation and trigger density-dependent and density-independent natural enemy responses. *Journal of pest science*, 89: 985-992, 2016.

GARCÍA-SUÁREZ, R.; VERDUZCO-ROSAS, L. A.; DEL RINCÓN-CASTRO, M. C.; DÉLANO-FRIER, J. P.; IBARRA, J. E. Translocation of *Bacillus thuringiensis* in *Phaseolus*

vulgaris tissues and vertical transmission in *Arabidopsis thaliana*. Journal of applied microbiology, 122: 1092-1100, 2017.

GOMIS-CEBOLLA J.; BERRY, C. *Bacillus thuringiensis* as a biofertilizer in crops and their implications in the control of phytopathogens and insect pests. Pest Management Science, 18, 2022.

HANAFI, A.; TRAORE, M.; SCHNITZLER, W.H.; M. WOITKE. Induced resistance of tomato to whiteflies and *Phytophthora* with the PGPR *Bacillus subtilis* in a soilless crop grown under greenhouse conditions. In A. Hanafi and W.H. Schnitzler (eds.), Proceedings of VIIIth IS on protected cultivation in mild winter climates. Acta Horticulturae, 747: 315-322, 2007.

ISLAM, M. N.; ALI, M. S.; CHOI, S. J.; HYUN, J. W.; BAEK, K. H. Biocontrol of citrus canker disease caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* using an endophytic *Bacillus thuringiensis*. Plant Pathology Journal, 35:486-97, 2019.

JURAT-FUENTES, J. L.; CRICKMORE, N. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. Journal of Invertebrate Pathology, 142: 5-10, 2017.

LEUCK, D. B.; PERKINS, W. D. A method of estimating fall armyworm progeny reduction when evaluating control achieved host-plant resistance. Journal of Economic Entomology, 65: 482-483, 1972.

LIU, Y.; WANG, Y.; SHU, C.; LIN, K.; SONG, F.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; ZHANG, J., Cry64Ba and Cry64Ca, two ETX/MTX2-type *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins

active against hemipteran pests. *Applied and Environmental Microbiology*, 84: e01996-17. 2018.

LYNCH, R. E. Effect of coastal bermudagrass fertilization levels and age of regrowth on fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larval biology and adult fecundity. *Journal of Economic Entomology*, 77: 948-953, 1984.

MELATTI, V. M.; PRAÇA, L. B.; MARTINS, E. S.; SUJII, E.; BERRY, C.; MONNERAT, R. G. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains toxic against cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). *BioAssay*, 5: 1-4, 2010.

MONNERAT, R. G.; SOARES, D. M.; CAPDEVILLE, G.; JONES, G.; MARTINS, E. S.; PRAÇA, L.; CORDEIRO, B. A.; BRAZ, S. V.; DOS SANTOS, R. C.; BERRY, C. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* bacteria living inside of plants. *Microbial Biotechnology*, 2: 512-520, 2009.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T. de; MARTINS, É. S.; MELATTI, V. M.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; MORINAGA, C.; DEMO, C.; GOMES, A. C. M.; FALCÃO, R.; SIQUEIRA, C. B.; SILVA-WERNECK, S.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. *Biological Control*, 41: 291-295, 2007.

MONNERAT R, CAVALCANTI DOS SANTOS R, CARVALHO BARROS P, CARDOSO BATISTA A, BERRY C. Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis*

endofíticas de algodão. Comunicado Técnico 98, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 2003.

MORENO-DELAFUENTE, A., GARZO, E., MORENO, A. AND FERERES, A. A plant virus manipulates the behavior of its whitefly vector to enhance its transmission efficiency and spread. PloS one, 8: p.e61543, 2013.

MURPHEY COY, R.; HELD, D. W.; KLOEPPER, J. W. Bacterial Inoculant Treatment of Bermudagrass Alters Ovipositional Behavior, Larval and Pupal Weights of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). Environmental entomology, 46: 831-838, 2017.

NANGLE, K. W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) treatment of cotton on the oviposition behavior of *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Ph.D. dissertation, Auburn University, 2012.

NG, S.; DAVIS, F.M.; WILLIAMS, W. P. Survival, growth, and reproduction of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) as affected by resistant corn genotypes. Journal of Economic Entomology, 78: 967-971, 1985.

NGUMBI, E. Mechanisms of olfaction in parasitic wasps: analytical and behavioral studies of response of a specialist (*Microplitis croceipes*) and a generalist (*Cotesia marginiventris*) parasitoid to host-related odor. Ph.D. dissertation, Auburn University, 2011.

PANGESTI, N.; PINEDA, A.; DICKE, M.; VAN LOON, J. J. A. Variation in plant-mediated interactions between rhizobacteria and caterpillars: potential role of soil composition. *Plant Biology*, 17: 474-483, 2015.

PANGESTI, N., REICHEL, M., VAN DE MORTEL, J.E., KAPSOMENOU, E., GERSHENZON, J., VAN LOON, J.J., DICKE, M. AND PINEDA, A., 2016. Jasmonic acid and ethylene signaling pathways regulate glucosinolate levels in plants during rhizobacteria-induced systemic resistance against a leaf-chewing herbivore. *Journal of Chemical Ecology*, 42: 1212-1225, 2016.

PETERSON, S. D. O.; DE MEDEIROS, F. H.; DE OLIVEIRA, T. S.; DE ALMEIDA ZAGO, J. R.; BETTIOL, W. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* promote tomato growth. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54: 397-406, 2023.

PINEDA, A.; ZHENG, S. -J.; VAN LOON, J.J.; DICKE, M. Rhizobacteria modify plant-aphid interactions: a case of induced systemic susceptibility. *Plant Biology*, 14: 83-90, 2012.

PIETERSE, C.M.; LEON-REYES, A.; VAN DER ENT, S.; VAN WEES, S.C. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5: 308-316, 2009.

PIETERSE, C. M.; ZAMIOUDIS, C.; BERENDSEN, R. L.; WELLER, D. M., VAN WEES, S. C.; BAKKER, P. A. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52: 347-375, 2014.

PRABHAKAR, A.; BISHOP, A. H. Effect of *Bacillus thuringiensis* naturally colonising *Brassica campestris* var. *chinensis* leaves on neonate larvae of *Pieris brassicae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100: 193-194, 2009.

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

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. Tese (Doutorado em Agronomia), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária Universidade de Brasília, Brasília, 158 p., 2012.

SALAZAR MAGALLON, J. A.; HERNANDEZ VELAZQUEZ, V. M.; ALVEAR GARCIA A.; ARENAS SOSA, I.; PEÑA CHORA, G. Evaluation of industrial by-products for the production of *Bacillus thuringiensis* strain GP139 and the pathogenicity when applied to *Bemisia tabaci* nymphs. *Bulletin of Insectology* 68: 103-109, 2015.

SANCHÉZ, E. R.; RAMÍREZ, A. G.; RAMÍREZ, A. R.; ÂNGULO, M. G.; SUÁREZ, J. M. T.; ALEJO, J. C. Biological activity of *Bacillus thuringiensis* culture supernatant on *Bemisia tabaci* and its parasitoid *Eretmocerus eremicus*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 22: 213-218, 2019.

SCHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R.; BORGES, M.; CARVALHO, R. Metodologia de criação de Insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos e semioquímicos. Circular Técnica 9, Embrapa, 1516-4349, 2001.

SHAVIT, R.; OFEK-LALZAR, M.; BURDMAN, S.; MORIN, S. Inoculation of tomato plants with rhizobacteria enhances the performance of the phloem-feeding insect *Bemisia tabaci*. *Frontiers in Plant Science*, 4: 306, 2013.

SILVA, C. R., MONNERAT, R., LIMA, L. M., MARTINS, É. S., MELO FILHO, P. A., PINHEIRO, M. P.; SANTOS, R. C. Stable integration and expression of a cryII a gene conferring resistance to fall armyworm and boll weevil in cotton plants. *Pest management science*, 72: 1549-1557, 2016.

SILVA, F. D. A. S.; DE AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *African Journal of Agricultural Research*, 11: 3733-3740, 2016.

SMITH, R. A.; BARRY, J. W. Environmental persistence of *Bacillus thuringiensis* spores following aerial application. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71: 263-267, 1998.

SOBERÓN, M.; MONNERAT, R., BRAVO, A. Mode of action of cry toxins from *Bacillus thuringiensis* and resistance mechanisms. *Microbial toxins*, 1:1-13, 2018.

STOUT, M. J.; THALER J.S.; THOMMA, B. P. J. J. Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods. *Annual Review Entomology*, 51: 663-689, 2006.

TORRES CABRA, E.; HERNANDEZ FERNANDEZ, J. A. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* Colombian native strains against *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of Plant Protect Research*, 59: 503-511, 2019.

TORRES QUINTERO, M. C.; ARENAS SOSA, I.; HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ, V. M.; SUÁREZ RODRÍGUEZ, R.; PEÑA CHORA, G. Characterization of *Bacillus thuringiensis* (Bacillaceae) strains pathogenic to *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Florida Entomology*, 99: 639-643, 2016.

VALENZUELA-SOTO, J. H.; ESTRADA-HERNÁNDEZ, M. G.; IBARRA-LACLETTE, E.; J. P. DE´LANOFRIER. Inoculation of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) with growth promoting *Bacillus subtilis* retards whitefly *Bemisia tabaci* development. *Planta*, 231: 397-410, 2010.

VAN OOSTEN, V. R.; BODENHAUSEN, N.; REYMOND P.; VAN PELT J. A.; VAN LOON, L. C.; DICKE, M.; PIETERSE, C. M. J. Differential effectiveness of microbially induced resistance against herbivorous insects in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 21: 919-930, 2008.

VENDRAMIM, J. D.; de Souza, A. P.; Ongarelli, M. D. G. Comportamento de oviposição da mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) biótipo B em tomateiro. *Neotropical Entomology*, 38: 126-132, 2009.

YAN, C.; XIE, D. Jasmonate in plant defence: sentinel or double agent? *Plant Biotechnology Journal*, 13: 1233-1240, 2015.

ZHANG, L.; ZHANG, F.; MELOTTO, M.; YAO, J.; HE, S. Y. Jasmonate signaling and manipulation by pathogens and insects. *Journal of Experimental Botany*, 68: 1371-1385, 2017.

ZEBELO, S.; PIORKOWSKI, J.; DISI, J.; FADAMIRO, H. Secretions from the ventral eversible gland of *Spodoptera exigua* caterpillars activate defense-related genes and induce emission of volatile organic compounds in tomato, *Solanum lycopersicum*. *BMC Plant Biology*, 14: 140, 2014.

ZEBELO, S.; SONG, Y.; KLOEPPER, J. W.; FADAMIRO, H. Rhizobacteria activates (+) - δ - cadinene synthase genes and induces systemic resistance in cotton against beet armyworm (*Spodoptera exigua*). *Plant, Cell and Environment*, 39, 935-943, 2016.

CAPÍTULO III

**EFEITO DA COLONIZAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* NO
CRESCIMENTO VEGETAL DO TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L.)
E SOBRE *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)**

EFEITO DA COLONIZAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* NO CRESCIMENTO VEGETAL DO TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L.) E SOBRE *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)

RESUMO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) é uma das olerícolas mais produzidas no Brasil e possui grande importância socioeconômica e nutricional. Os microrganismos endofíticos, dentre eles o gênero *Bacillus*, têm sido explorados nas aplicações biotecnológicas. Para este trabalho, estirpes de *Bacillus thuringiensis* (Bt) tóxicas a lepidópteros e endofíticas de plantas foram testadas em tomateiro a fim de se avaliar os efeitos desta interação na capacidade promotora de crescimento vegetal e sobre *H. armigera*. Raízes de tomateiro (Santa Clara) com 21 dias de semeio foram inoculadas com as estirpes S1450, S1905, S2122 e S2124 de Bt na concentração $1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Decorridos 11 dias da inoculação, foram realizadas as avaliações de crescimento anotando-se a altura da planta e o diâmetro do caule a cada semana. Ao final do ensaio, com 27 dias, foi determinada a fitomassa da parte aérea e radicular. Para detectar a presença de Bt nos tecidos internos, foram realizados ensaios de isolamento e microscopia eletrônica de varredura nos tecidos das raízes, do caule e das folhas. Após 35 dias da inoculação, cinco larvas de *H. armigera* de 1º instar foram confinadas por 10 dias nas plantas tratadas com a bactéria. O peso e o comprimento das larvas foram anotados após 72 horas e 7 dias de alimentação quando foram retiradas das plantas, as fezes foram coletadas para isolamento de Bt, e os insetos foram observados até a formação de pupas. As pupas foram pesadas e verificada ocorrência de deformidades. Como resultado, não foram observadas diferenças entre os tratamentos com as estirpes para as características de altura, diâmetro do caule, massa da matéria seca e fresca tanto da parte aérea como da parte radicular das plantas. Foi possível recuperar o Bt da planta inoculada com a estirpe S1450 ($2,0 \times 10^5$ UFC g⁻¹ de raiz; $2,0 \times 10^3$ UFC g⁻¹ do caule; $2,0 \times 10^3$ UFC g⁻¹ de tecido de folha) e somente das raízes da estirpe S2122 ($3,0 \times 10^4$ UFC g⁻¹ de raiz). A microscopia de varredura confirmou a translocação e colonização por Bt nos tecidos das plantas. Foi verificado 13,3% de mortalidade das larvas de *H. armigera* com Bt, mas não foi visualizado sintomas de intoxicação pela bactéria e não foi possível recuperar Bt das fezes.

Palavras-chave: endofítico, tomate, colonização, bioensaio, inseto-praga

EFFECT OF COLONIZATION OF *Bacillus thuringiensis* ON PLANT GROWTH OF TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.) AND ON *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)

ABSTRACT

The tomato (*Solanum lycopersicum* L. Solanaceae) is one of the most produced vegetables in Brazil and has great socioeconomic and nutritional importance. Endophytic microorganisms, among them the genus *Bacillus*, have been exploited in biotechnological applications. For this work, strains of *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxic to lepidoptera and endophytic of plants were tested in tomato to evaluate the effects of this interaction on plant growth promoter capacity and against *H. armigera*. Tomato (Santa Clara) roots with 21 days of sowing were inoculated with the strains S1450, S1905, S2122 and S2124 of Bt at concentration $1,0 \times 10^8$ CFU mL⁻¹. After 11 days of inoculation, the growth evaluations were carried out by noting the height of the plant and the diameter of the stem each week. At the end of the trial, at 27 days, the shoot and root biomass were determined. To detect the presence of Bt in the internal tissues, isolation tests and scanning electron microscopy of the tissues of roots, stem and leaves were performed. After 35 days of inoculation, five 1st instar *H. armigera* larvae were confined for 10 days in plants treated with the bacteria. The weight and length of the larvae were recorded after 72 hours and 7 days of feeding when they were removed from the plants, the feces were collected for isolation of Bt, and the insects were observed until pupae formation. The pupae were weighed, and the occurrence of deformities was verified. As a result, no differences were observed between the treatments with the strains for the characteristics of height, stem diameter, dry and fresh matter mass of both the aerial part and the root part of the plants. It was possible to recover the Bt of the inoculated plant with the strain S1450 ($2,0 \times 10^5$ CFU g⁻¹ root; $2,0 \times 10^3$ CFU g⁻¹ stem; $2,0 \times 10^3$ CFU g⁻¹ leaf tissue) and only of the roots with S2122 strain ($3,0 \times 10^4$ CFU g⁻¹ root). The scanning microscopy confirmed Bt translocation and colonization in plant tissues. There were 13,3% mortality of *H. armigera* larvae with Bt, but no symptoms of bacterial intoxication were observed, and it was not possible to recover Bt from feces.

Keywords: endophytic, tomato, colonization, bioassay, insect pest

1 INTRODUÇÃO

Dentre as hortaliças cultivadas no Brasil, o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) é uma das mais importantes, sobretudo considerando os aspectos socioeconômicos, já que é cultivada em todos os estados do país, em uma área de aproximadamente 51,9 mil hectares, com produção de 3,6 milhões de toneladas e com rendimento médio de 70,8 toneladas por hectare (IBGE, 2021).

Cerca de aproximadamente 20% da produção nacional é proveniente do estado de Goiás, seguido pelos estados de São Paulo com 18%, Minas Gerais com cerca de 14% e Bahia com 9% (IBGE, 2021). Assim, a sua ampla utilização em diversas regiões do país deve-se, principalmente, às suas qualidades organolépticas e ao seu valor como alimento funcional em vista das propriedades antioxidantes do licopeno (Chitarra & Chitarra, 2005).

O ciclo do tomateiro pode ser dividido em três fases distintas: a primeira por ocasião da produção de mudas para o transplante, em seguida do início do florescimento até o período da colheita dos frutos (Brito et al., 2015; Schmidt et al., 2017).

Apesar da grande expressão da tomaticultura no mundo, a espécie pode ser considerada uma das mais suscetíveis ao ataque de artrópodes-praga, devido à extensa área foliar e ao microclima gerado, propício ao desenvolvimento de organismos fitófagos, os quais causam prejuízos à produtividade e reduzem seu valor de mercado (Alvarenga, 2013; Moura et al., 2014).

Existe um grande número de artrópodes-praga que ocorrem em cultivos de tomate desde a sementeira, após o transplante das mudas até a colheita dos frutos, com destaque para *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (Pratissoli et al., 2015). As medidas de controle que são realizadas para mitigar os problemas fitossanitários na cultura tem enfocado, em grande parte, o uso de pesticidas sintéticos (Moura et al., 2014; Michereff Filho et al., 2019). Assim, é essencial que se busque novas oportunidades de controle ambientalmente

amigáveis que, além de contribuir com a crescente demanda pela produção de tomates, permitam que a obtenção de alimento livre de contaminantes, com menor impacto ao ambiente, e preservando a saúde do consumidor e do trabalhador rural (Moura et al., 2014). Uma das alternativas para o controle de artrópodes-praga é o uso de microrganismos, como bactérias e fungos.

Os microrganismos têm sido extensivamente explorados quanto ao potencial de uso biotecnológico (Hardoim et al., 2015). Nesse aspecto, destaca-se as bactérias promotoras de crescimento pela sua importância em apresentar importantes funções na promoção do desenvolvimento vegetal, como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos, produção de sideróforos e de fitohormônios como a auxina, além da produção de compostos orgânicos voláteis que favorecem o crescimento das plantas e atuam na proteção contra patógenos e insetos-pragas (Araújo e Guerreiro, 2010; Martins et al., 2014; Hardoim et al., 2015).

A bactéria *Bacillus thuringiensis* é amplamente utilizada no manejo do controle de lepidópteros-praga e foi demonstrada a capacidade de colonização sistêmica por isolados de *B. thuringiensis* em plantas (Praça et al., 2012; Castro et al., 2019; da Costa et al., 2020). Para a cultura do tomateiro, *B. thuringiensis* também é o agente de controle biológico mais utilizado para o controle de lagartas, incluindo *H. armigera* (Moura et al., 2014). Existem também linhagens de plantas do tomateiro com respostas de eficiência na resistência a insetos lepidópteros (Koul et al., 2014; Kumar et al., 2020).

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de colonização de *B. thuringiensis* em plantas de tomateiro, avaliar o efeito da inoculação com estirpes de *B. thuringiensis* na capacidade de promoção de crescimento das plantas e o seu efeito sobre *H. armigera*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação e no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas (LBE), da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF.

Foram utilizadas três estirpes de *B. thuringiensis*: S1905, S2122 e S2124 pertencentes à Coleção de Bactérias de Invertebrados hospedadas na Embrapa, e a estirpe S1450 - *Bacillus thuringiensis* subespécie *kurstaki* (Btk) - HD 1, obtida da Coleção de *Bacillus thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus* do Instituto Pasteur de Paris. Estas estirpes foram testadas e são colonizadoras de plantas do algodoeiro e tóxicas a *H. armigera*, conforme ensaios preliminares conduzidos no LBE (Caixeta et al., 2015; da Costa et al., 2020).

O material vegetal utilizado foi a cultivar de tomate Santa Clara empregada nas avaliações de colonização por *B. thuringiensis*, na promoção de crescimento vegetal, e no efeito sobre o inseto-praga.

2.1 Condições gerais ao ensaio

2.1.1 Cultivo do material bacteriano

As estirpes foram cultivadas em meio Embrapa (Monnerat et al., 2007) a 28 °C, por 72 horas a 180 rpm em Fermentador Microferm New Brunswick, modelo MF 214. Após 72 horas, os multiplicados foram visualizados em microscópio óptico de contraste de fases com aumento de 1000x para a observação dos esporos e cristais. Para cada estirpe multiplicada foram realizadas centrifugações por 30 minutos a 9500 rpm (Centrífuga Hettich Zentrifugen, modelo Rotanda 460R). O sobrenadante foi desprezado e foram coletados os esporos e cristais. Os esporos e os cristais foram recuperados, homogeneizados em água destilada estéril, e o material preparado para liofilização (Liofilizador Christ, modelo Alpha 2-4 LD plus). Após a

liofilização, os materiais bacterianos foram dispostos em tubos de centrifugação (Falcon de 50 mL) e armazenados a -2 °C.

2.1.2 Preparo das suspensões bacterianas

O produto liofilizado foi utilizado para determinação das unidades formadoras de colônia (UFC mg⁻¹) em solução salina (NaCl a 0,9%) conforme a metodologia descrita por Westergren e Krasse (1978). Uma alíquota de 10µL de cada uma das diluições foi semeada em triplicata em placas de Petri (9 cm) contendo meio Embrapa Ágar (Monnerat et al., 2007). As placas foram vedadas com papel filme e incubadas (Precision 6LMS) a 28 ± 2 °C por 15 horas quando ocorreram as leituras para contagem das células. Após a quantificação, o inóculo estava pronto para formar a suspensão.

2.1.3 Condições gerais de cultivo

O plantio ocorreu em sementeira de poliestireno (60 células) na razão de três sementes por célula, preenchida com substrato Plantmax®.

Após 21 dias do plantio, cada planta foi transplantada para um vaso de 0,5 L, momento em que ocorreu a inoculação com a bactéria. Cada vaso foi preenchido com a mistura contendo substrato e solo não-estéril adubado na proporção de 1:1, que foram mantidos até o final do ensaio, aos 27 dias após a inoculação. A irrigação foi realizada conforme a necessidade das plantas.

2.1.4 Inoculação das raízes de tomateiro

O produto bacteriano liofilizado foi utilizado no preparo das suspensões. A estirpe liofilizada foi pesada, misturada com água destilada estéril e homogeneizadas em tubos de

centrifugação (Falcon de 50 mL) e vórtex para obtenção da suspensão na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

Plantas com um par de folhas verdadeiras, aos 21 dias do semeio, foram retiradas do substrato com cuidado, lavadas em água corrente, seguida de água estéril, e secas em papel absorvente. Em seguida, as raízes foram imersas em recipientes de vidro (100 mL) contendo a solução com a bactéria. Os tratamentos permaneceram em plataforma agitadora por 40 minutos a 160 rpm e em temperatura ambiente. Após ocorrida a inoculação, as plantas foram transplantadas para vasos de polietileno e mantidas a 30 ± 7 °C de temperatura e $43 \pm 20\%$ umidade relativa até o momento das avaliações finais em casa de vegetação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos contendo as quatro estirpes de *B. thuringiensis* e a testemunha na ausência da bactéria.

2.2 Avaliação da indução de crescimento de tomateiro por *B. thuringiensis*

Para análise do efeito dos tratamentos com *B. thuringiensis* sobre o crescimento do tomateiro foram observadas as seguintes características: o diâmetro do caule (mm) e a altura de planta (cm) semanalmente a partir do 11º dias após a inoculação das raízes e o transplântio das plantas. Para isto foram coletados dados de 14 plantas. O diâmetro caulinar foi determinado a 2 cm do colo das plantas com auxílio de um paquímetro digital, e a altura das plantas foi mensurada pela determinação da distância entre o coleto e o ápice da planta utilizando régua graduada em milímetros (Costa, 2003).

Ao final do ensaio de crescimento, 27 dias após a inoculação nas plantas, nove plantas foram coletadas para determinação da fitomassa da parte aérea (g) e radicular (g). Para os valores de matéria seca da parte aérea e das raízes, as plantas foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa a 70° C até atingir o peso constante (aproximadamente 70 horas).

2.3 Root Printing

O ensaio foi realizado para avaliar a capacidade de crescimento bacteriano obtidos por seções de raízes de plantas tratadas com *B. thuringiensis*. "Root printing" ou "impressão da raiz" é um termo usado para o processo de plaqueamento em meio Embrapa ágar de seções de raízes de plantas inoculadas. Para o ensaio, duas plantas foram removidas do solo aos 7 dias após a inoculação. Elas foram lavadas com água estéril e cortadas em seções de 2 cm de comprimento e plaqueadas em meio Embrapa Ágar com cuidado para que todas as partes estivessem em contato com o meio de cultivo. As placas foram incubadas a 28 ± 2 °C e observadas por 24 a 72 horas. O crescimento bacteriano foi obtido usando evidência fotográfica.

2.4 Isolamento de *B. thuringiensis* das raízes, caule e folhas das plantas de tomateiro

Após 29 dias da inoculação das raízes, seções de três plantas dos tratamentos avaliados foram coletadas para realizar o isolamento de *B. thuringiensis* utilizando a metodologia descrita por Barreti et al. (2008) com modificações. As plantas foram cuidadosamente retiradas do solo e lavadas em água corrente. Em seguida, foram pesados 2 g da raiz, do caule e das folhas, transferidos para recipientes contendo solução tampão fosfato-potássio 0,03 M estéril a pH 7,0 e submetidas à agitação vigorosa em agitador orbital por uma hora. Essa operação foi repetida por quatro vezes, após a troca da solução tampão fosfato-potássio. Em seguida, ocorreu a desinfestação superficial com álcool 50% por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos, seguida de três lavagens em solução tampão fosfato-potássio estéril. Para desalojar da superfície do material vegetal as bactérias epifíticas remanescentes, as raízes foram transferidas para novos recipientes contendo solução tampão fosfato-potássio e submetidas a banho de ultrassom por 10 minutos. Uma nova desinfestação superficial dos segmentos das plantas foi feita utilizando hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos, seguida por 3 lavagens em solução

tampão fosfato-potássio estéril. O material foi novamente submetido ao banho de ultrassom por 10 minutos e uma nova solução tampão fosfato-potássio foi adicionada.

A maceração dos segmentos das plantas foi realizada utilizando almofariz e pistilo estéreis, seguida da adição de 2 mL da solução tampão fosfato-potássio e distribuição de 1 mL da amostra em tubo de polipropileno (tubo de 1,5 mL). Uma das amostras foi utilizada para observar as células vegetativas da bactéria, e a outra foi submetida ao choque térmico a 80 °C por 12 minutos e gelo por 5 minutos para obtenção somente dos esporos.

Alíquotas de 100 µL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram retiradas e transferidas para placas de Petri (9 cm) contendo meio Embrapa Ágar acrescido de penicilina (100 mg L^{-1}) e espalhadas com alça de Drigalski estéreis descartáveis em triplicata para cada diluição. As placas foram incubadas a $29 \pm 1 \text{ °C}$ por 24 horas, quando foi realizada a leitura.

2.5 Crescimento das estirpes S1450 e S2122 de *B. thuringiensis* recuperadas de plantas inoculadas

O ensaio foi realizado a fim de confirmar o crescimento e a pureza do material obtido nos plaqueamentos obtidos a partir dos isolamentos realizados dos tecidos de plantas de tomate macerados. O crescimento bacteriano foi obtido a partir de amostras de raízes, do caule e das folhas de plantas inoculadas com a estirpe S1450, e de raízes de plantas inoculadas com a estirpe S2122 de *B. thuringiensis*.

Uma amostra de cada um destes crescimentos foi coletada com auxílio de uma alça descartável estéril de 10 µL e inoculada em frascos erlenmeyer (125 mL) contendo de meio Embrapa e cultivados a $29 \pm 2 \text{ °C}$, a 200 rpm por 72 horas em incubador rotativo. Após este período, foi realizada a microscopia do material esporulado utilizando microscópio de contraste de fases (Olympus BH-2) para verificação da morfologia do microrganismo. Uma alíquota de 10 µL foi coletada com auxílio de uma alça estéril e espalhada em meio Embrapa Ágar

(Monnerat et al., 2007) suplementado por penicilina ($100 \mu\text{L mL}^{-1}$) e incubado a $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas. Ao final deste período, foi novamente observada a presença dos isolados bacterianos.

2.6 Microscopia eletrônica de varredura de plantas de tomate inoculadas com a estirpe S1450 de *B. thuringiensis*

Sementes de tomate foram desinfestadas em hipoclorito a 1% por 3 minutos, em etanol a 70% por 1 minuto seguido de imersão em água destilada estéril por 3 vezes (1 minuto cada imersão). Três sementes foram semeadas em tubos de centrifugação (Falcon 50 mL) contendo cerca de 20 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962) e mantidas no escuro por 7 dias a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Após 16 dias do semeio, um mL da suspensão bacteriana na concentração $1,0 \times 10^8$ UFC mL^{-1} foi aplicada nas raízes de 3 plantas, deixando 2 plantas como testemunha (sem a bactéria). Dez dias após realizada a inoculação, as plantas foram retiradas do meio, sendo o tecido das raízes do caule e das folhas seccionados (aproximadamente 1 cm) e imersos em glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 contidos em tubos de polipropileno (2,0 mL). O material foi submetido a agitação em rotator orbital a 4 rpm por 24 horas para fixação. Após esta etapa, as amostras foram armazenadas em tampão cacodilato 0,1 M e pH 7,0 a $-4 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, o material foi submetido a três lavagens de 15 minutos cada em tampão cacodilato 0,1 M e pH 7,0, seguido de imersão em solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 2% e tampão cacodilato 0,1 M por 1 hora. As amostras pós-fixadas em OsO_4 foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M, por 3 vezes seguidas e por mais 2 vezes com água em intervalos de 10 minutos. Logo após, foram submetidas à desidratação em série etanólica crescente de 10, 30, 50, 70, 90, e 100% permanecendo por 20 minutos em cada uma das concentrações. As amostras foram lavadas duas vezes em etanol 90% e três vezes em etanol 100% obedecendo intervalos de 20 minutos de imersão nestas concentrações. Em seguida, as amostras foram secas pelo

método do ponto crítico do CO₂ em aparelho Baltec CPD 030, recobertas com 25 nm de ouro em aparelho MED 010 da Balzers e observadas ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962.

2.7 Efeito de plantas de tomateiro inoculadas com a estirpe S1450 de *B. thuringiensis* sobre

H. armigera

As larvas utilizadas no ensaio foram mantidas em dieta artificial e condições de temperatura a 28 ± 2 °C, umidade média de 60% e fotoperíodo de 14/10 horas (Caixeta et al., 2015).

Após o período de 35 dias da inoculação das raízes, três plantas inoculadas com a estirpe S1450 de *B. thuringiensis* e duas para a testemunha (sem inoculação da bactéria) foram expostas a larvas de *H. armigera*. Cinco larvas de 1º instar foram adicionadas ao terço superior da planta e as plantas foram recobertas com tecido em “voile” para confinamento das larvas. As plantas e as larvas foram mantidas em casa de vegetação a temperatura de 30 ± 7 °C e umidade relativa $43 \pm 20\%$.

Foram avaliados os dados de peso (mg), em balança de precisão (Denver M-310), e o comprimento das lagartas (mm) com auxílio de um paquímetro digital (Digimess 100.171). Este procedimento ocorreu após 72 horas do início da alimentação e novamente após 7 dias de iniciado o ensaio. Decorridos 10 dias do início da alimentação nas plantas, as lagartas foram retiradas e transferidas individualmente para recipientes (50 mL) contendo dieta artificial (Caixeta et al., 2015), e permaneceram sob observação do seu desenvolvimento até a formação de pupa quando verificou a presença de deformidades. As pupas foram pesadas (mg), em balança de precisão e os dados anotados.

2.8 Análise estatística

Os dados das características agronômicas para o crescimento das plantas de tomateiro, do peso e comprimento das larvas e de pupas de *H. armigera*, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste Tukey a 5% de significância, utilizando o programa estatístico ASSISTAT 7.7 beta (Silva & Azevedo, 2016).

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação da indução de crescimento de tomateiro *B. thuringiensis*

Os resultados de avaliação de crescimento das plantas de tomate tratadas com as estirpes de *B. thuringiensis* são representados na Tabela 1.

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com as estirpes para as características de altura, diâmetro do caule, massa da matéria seca e fresca tanto da parte aérea como da parte radicular das plantas.

Tabela 1. Efeito da inoculação de tomateiro nas raízes com estirpes de *B. thuringiensis* aos 11, 20 e 27 dias após a inoculação (DAI) sobre a altura, o diâmetro do caule e sobre a matéria fresca e seca da parte aérea e das raízes. n= repetições (média ± desvio padrão)

Estirpes de Bt	Altura (cm)			Diâmetro do caule (mm)			Parte aérea (g)		Raiz (g)	
	11 DAI	20 DAI	27 DAI	11 DAI	20 DAI	27 DAI	Massa fresca	Massa seca	Massa fresca	Massa seca
	n= 14						n= 9			
Test.	8,978 ± 0,721 a	22,510 ± 1,524 a	37,335 ± 3,028 a	3,820 ± 0,280 a	5,554 ± 0,213 a	5,701 ± 0,319 a	26,25 ± 1,625 a	3,011 ± 0,134 a	7,061 ± 0,695 a	0,593 ± 0,081 a
S1450	8,535 ± 0,544 a	21,578 ± 1,439 a	36,000 ± 2,004 a	3,517 ± 0,332 a	5,612 ± 0,340 a	5,788 ± 0,358 a	24,26 ± 3,720 a	3,118 ± 0,412 a	6,467 ± 0,804 a	0,565 ± 0,056 a
S1905	8,328 ± 0,975 a	21,528 ± 1,868 a	36,092 ± 2,032 a	3,671 ± 0,349 a	5,330 ± 0,308 a	5,715 ± 0,218 a	25,24 ± 1,831 a	2,990 ± 0,219 a	7,006 ± 0,804 a	0,621 ± 0,071 a
S2122	8,014 ± 0,725 a	21,192 ± 1,766 a	37,007 ± 3,934 a	3,630 ± 0,391 a	5,615 ± 0,271 a	5,675 ± 0,284 a	30,05 ± 3,304 a	2,997 ± 0,209 a	6,871 ± 0,862 a	0,567 ± 0,060 a
S2124	8,178 ± 0,605 a	21,978 ± 1,879 a	38,478 ± 3,780 a	3,978 ± 0,377 a	5,557 ± 0,441 a	5,620 ± 0,294 a	27,23 ± 2,032 a	3,083 ± 0,196 a	6,292 ± 0,881 a	0,537 ± 0,054 a

Dados seguidos de mesma letra nas colunas não apresentam diferenças entre si com o teste de Tukey a de 5% de probabilidade

3.2 Root Printing

As placas contendo as secções de raízes são apresentadas na Figura 1.

O crescimento bacteriano obtido das secções de raízes do tomateiro inoculadas com *B. thuringiensis* foi evidenciado após 24 horas de incubação (Fig. 1-A). Decorridas 72 horas, as placas já exibiam numerosas colônias bacterianas para todos os tratamentos. Entretanto, no tratamento testemunha as características de morfologia e coloração diferentes do tratamento testemunha foram diferentes dos demais tratamentos (Fig. 1-B).

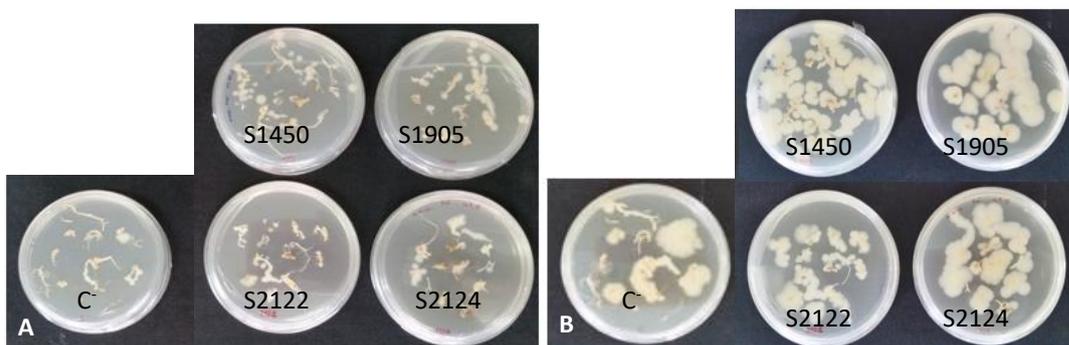


Figura 1. Root Printing de plantas de tomateiro inoculadas com *B. thuringiensis* demonstrando o crescimento bacteriano a partir das secções de raízes decorridas 24 (Fig. 1A) e 72 horas de plaqueamento (Fig. 1B). Placa contendo raízes do tratamento sem a bactéria (C⁻), raízes com estirpes de *B. thuringiensis* (S1450, S1905, S2122 e S2124).

3.3 Isolamento de *B. thuringiensis* das raízes, caule e folhas de plantas inoculadas

O número de células de *B. thuringiensis* isoladas dos tecidos de plantas de tomate inoculadas são apresentados a seguir.

A leitura das placas contendo as amostras dos tecidos das plantas de tomateiro tratadas com as estirpes S1450 e S2122 apresentaram conteúdo bacteriano contendo os esporos e células vegetativas.

A estirpe S1450 sem choque térmico apresentou células vegetativas e esporos nas raízes, no caule e nas folhas das plantas de tomate (Figura 2). A quantidade de bactéria obtida a partir dos tecidos vegetais inoculados com a estirpe S1450 foi $2,0 \times 10^5$ UFC g^{-1} de raiz, $2,0 \times 10^3$ UFC g^{-1} do caule e $1,0 \times 10^3$ UFC g^{-1} de folha.

Plantas tratadas com a estirpe S2122 apresentaram concentração de bactérias nas raízes tratadas sem o choque térmico na concentração $3,0 \times 10^4$ UFC g^{-1} de raiz.

O crescimento bacteriano a partir das raízes do tratamento com a estirpe S1450 só ocorreu nas amostras das plantas que receberam o choque térmico, que apresentaram uma concentração $1,0 \times 10^3$ UFC g^{-1} de esporos por tecido de raízes.

Não foi observado crescimento de bactérias no isolamento realizado para amostras das plantas inoculadas com as estirpes S1905, S2124 e para a testemunha.

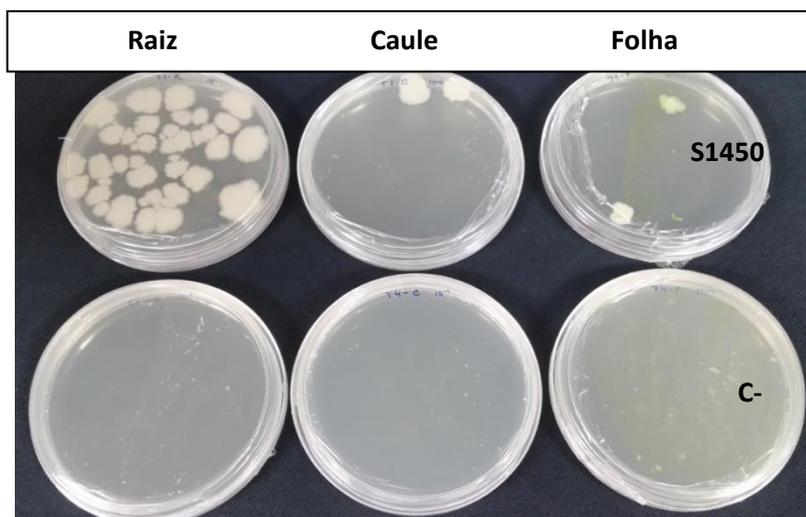


Figura 2. Isolamento da estirpe S1450 HD-1 de *B. thuringiensis* (Bt) de plantas de tomateiro. Na primeira linha e da esquerda para direita isolamento de raiz, caule e folhas do tratamento contendo *B. thuringiensis* mostrando o crescimento das células bacterianas. Na segunda linha o tratamento testemunha na ausência da bactéria.

3.4 Crescimento das estirpes S1450 e S2122 de *B. thuringiensis* recuperadas das plantas de tomateiro

Observou-se por microscopia a pureza do crescimento das bactérias recuperadas das plantas de tomateiro demonstrando aspectos como morfologia e padrões de cor semelhantes aos utilizados nas suspensões como inóculo para os tratamentos com as estirpes S1450 e S2122 (Figura 3).

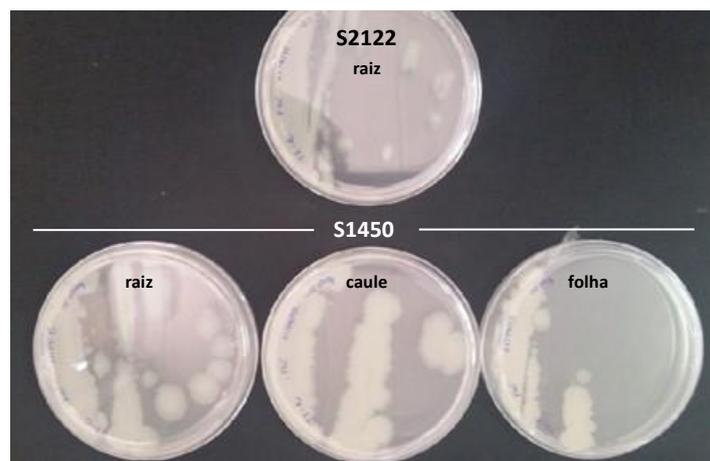


Figura 3. Verificação do crescimento bacteriano obtido da recuperação das células de tecidos de plantas de tomateiro inoculadas nas raízes com as estirpes S1450 e S2122 de *B. thuringiensis* após 24 horas de incubadas. A imagem apresenta bactérias de amostra de raízes do tratamento com a S2122, seguidas de amostras de raiz, do caule e folha com S1450 que foram semeadas em meio seletivo (penicilina a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$).

3.5 Microscopia eletrônica de varredura de plantas de tomate inoculadas com a estirpe S1450 de *B. thuringiensis*

A capacidade de colonização de *B. thuringiensis* nas plantas de tomate foi verificada por microscopia de varredura. A estirpe S1450 de *B. thuringiensis* foi utilizada por ter sido recuperada de todos os tecidos das plantas que receberam a bactéria.

A planta do tratamento testemunha (não inoculado) demonstrou ausência da bactéria nos tecidos observados (Figura 5A-H). Foi possível verificar a presença da bactéria nos tecidos internos da planta de tomate inoculada com *B. thuringiensis* mostrando a colonização do tecido interno das raízes, do caule e das folhas (Figura 6A-H).

Foram encontradas células em depressões formadas no tecido cuticular da epiderme das folhas, as chamadas flanges cuticulares presentes próximas ao complexo estomático (Fig. 6E e 6G). As bactérias foram encontradas isoladas, em pequenas colônias ou formando um biofilme (Figuras 6A-6H). Foram observadas a presença frequente de microfibrilas que são estruturas de adesão bacteriana (Fig. 6-H).

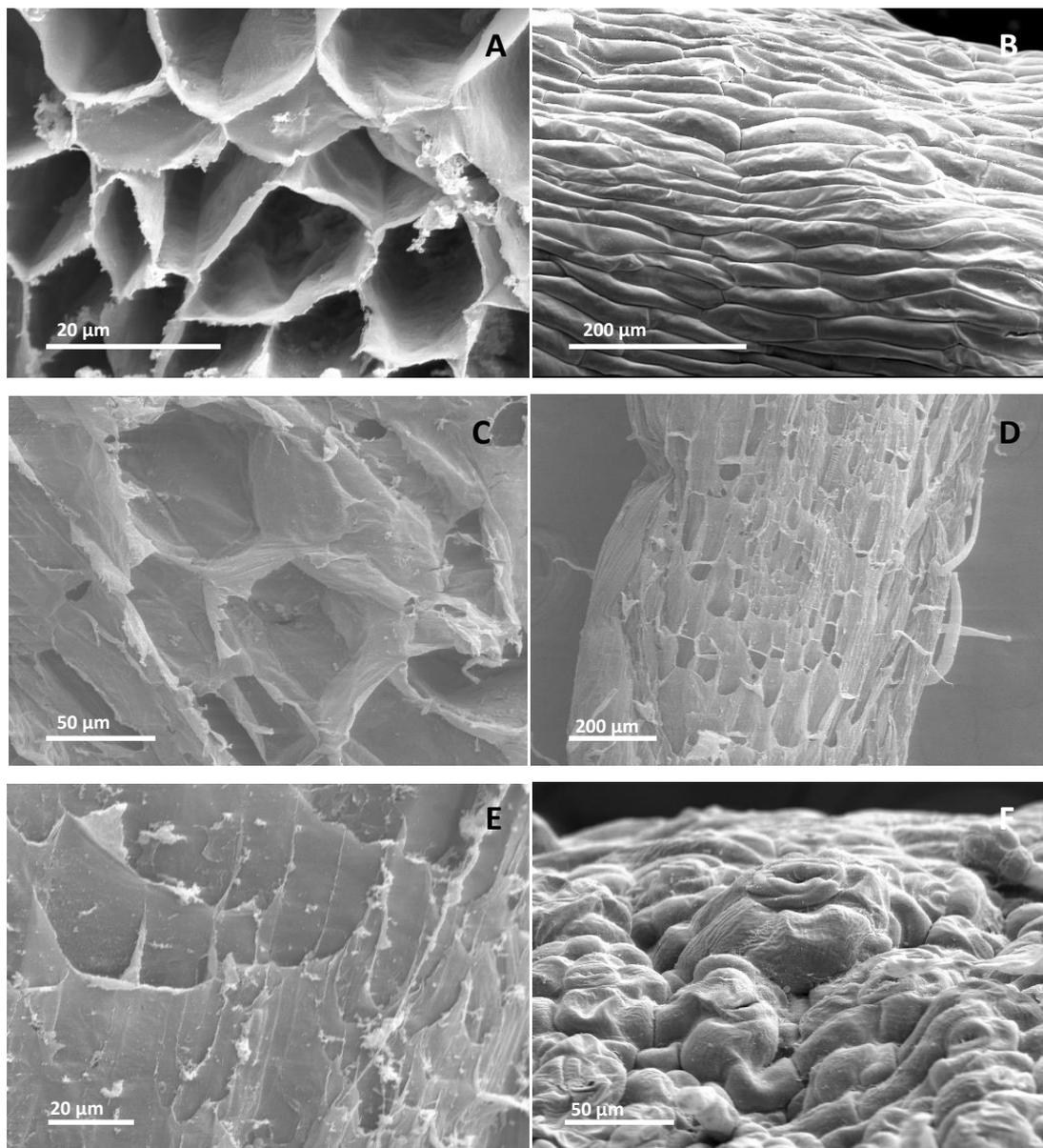


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura mostrando a raiz, o caule e folha da planta de tomate do tratamento testemunha (sem a bactéria) demonstrando a ausência da bactéria no tecido vegetal. Observação a partir do corte transversal na raiz (Fig. A); vista da superfície da raiz (Fig. B); amostra do caule (corte longitudinal) próximo ao eixo vascular (Fig. C); vista panorâmica do corte transversal da região apical do caule (Fig. D); vista aproximada do corte da região anterior (Fig. E); superfície da folha (Fig. F).

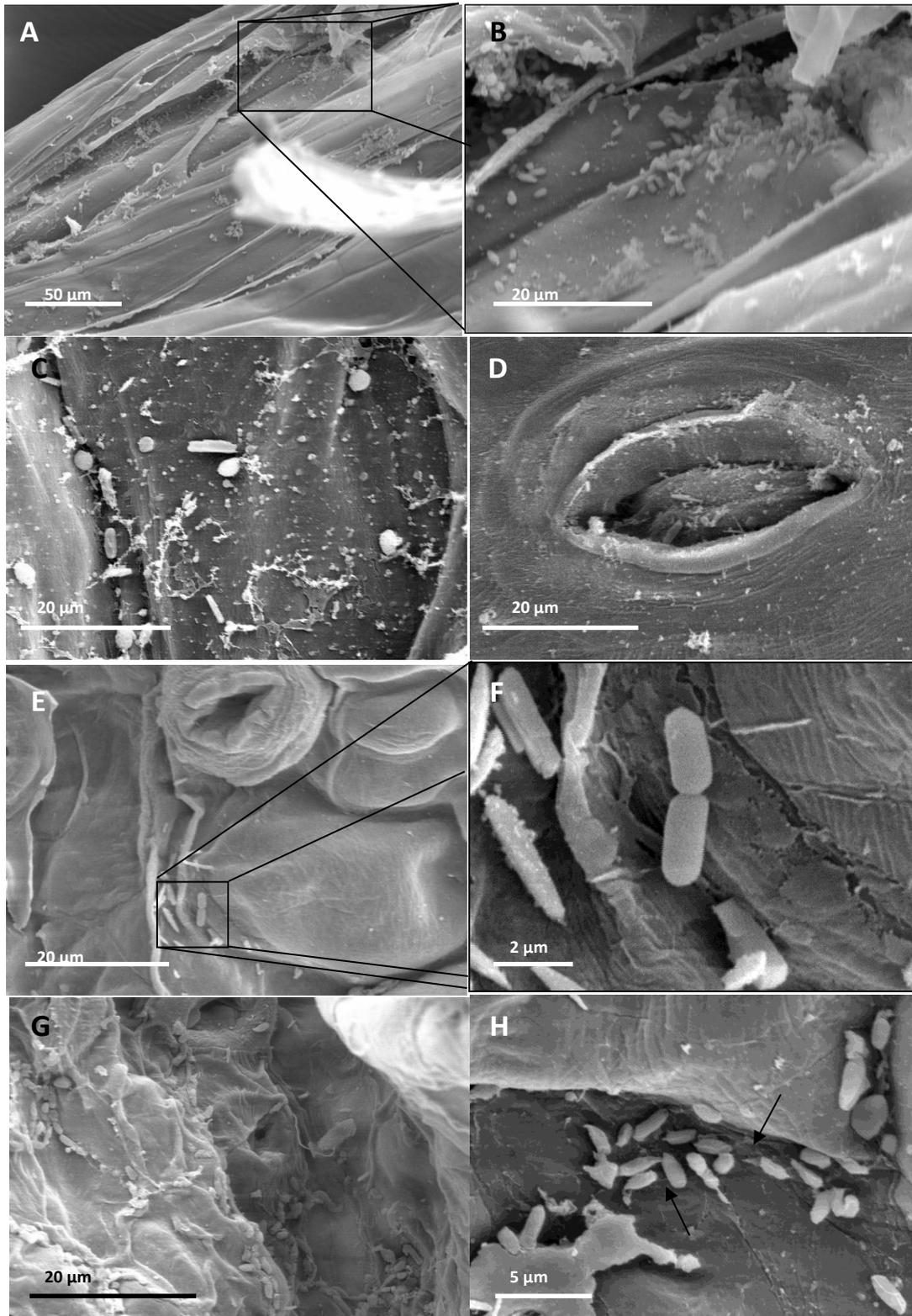


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura mostrando as raízes, o caule e folhas de tomateiro inoculadas com a estirpe S1450 de *B. thuringiensis* (Bt). Vista do corte longitudinal da raiz de planta inoculada apresentando células bacterianas (Fig. A); B- vista aproximada da imagem anterior mostrando colônias formando colônias com o Bt (Fig. B); presença de esporos

no tecido interno do caule (Fig. C); estômato da região do caule da planta expondo a bactéria (Fig. D); célula isolada presente na flange cuticular da superfície da folha próximo ao estômato da planta de tomate (Fig. E); vista aproximada da imagem anterior expondo a célula no momento de divisão celular (Fig. F); aglomerado da bactéria próximo ao complexo estomático da superfície foliar obtido de corte transversal no tecido vegetal (Fig. G); bactéria presente no tecido superficial da folha de tomateiro com formação de microfibrilas de adesão (Fig. H).

3.6 Efeito de plantas de tomateiro inoculadas com a estirpe S1450 de *B. thuringiensis* sobre *H. armigera*

Os dados de peso, comprimento das larvas e peso das pupas de *H. armigera* que se alimentaram no seu período larval em plantas inoculadas com a estirpe S1450 são apresentados na Tabela 2.

Apenas duas lagartas (13,3%) provenientes do tratamento com *B. thuringiensis* apresentaram mortalidade. Entretanto, não foram observados sintomas de intoxicação bacteriana como escurecimento e textura amolecida nas larvas mortas. Também não foi verificado crescimento bacteriano a partir do isolamento das fezes coletadas das larvas alimentadas nas plantas inoculadas. Não foram observadas diferenças de peso, comprimento das larvas e peso de pupas entre os tratamentos. Entretanto as plantas tratadas com *B. thuringiensis* apresentaram um percentual de 13% de pupas contendo deformidades com abertura e desprendimento da pteroteca no ponto de inserção do lóbulo com o quarto segmento abdominal da pupa (Figura 5).

Tabela 2. Efeito de plantas de tomate inoculadas com *B. thuringiensis* sobre *H. armigera*. A avaliação de peso e comprimento das larvas foi realizada após 3 e 10 dias após o início da exposição. n= número de repetições (média ± desvio padrão)

Tratamentos	n	Peso larvas (mg)		Comprimento larvas (mm)		Peso de pupas (mg)
		72 horas	10 dias	72 horas	10 dias	
Bt						
Testemunha	10	47,52 ± 12,055a	413,50 ± 72,545a	17,61 ± 1,472a	28,35 ± 3,601a	331,59 ± 28,622a
S1450	13	38,50 ± 12,902a	368,53 ± 63,675a	14,81 ± 2,232a	26,28 ± 2,606a	313,41 ± 45,017a

As médias nas colunas não diferem a 5% de probabilidade

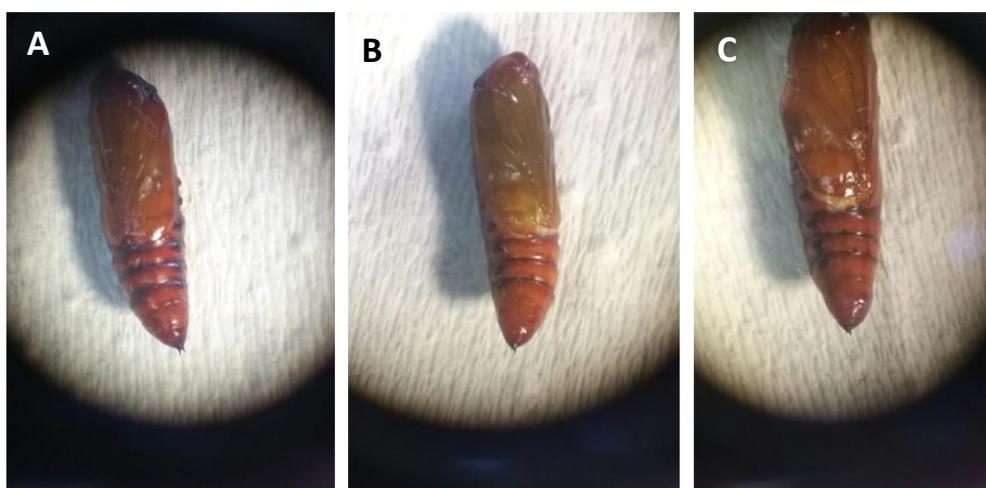


Figura 5. Pupas de *H. armigera* provenientes de larvas alimentadas em plantas de tomate inoculadas com a estirpe S1450 de *B. thuringiensis* (Btk) - HD 1. A- Pupa obtida de tratamento sem a bactéria; B e C - Pupas oriundas de plantas com *B. thuringiensis* apresentando má formação.

4 DISCUSSÃO

O gênero *Bacillus* constitui-se em um dos promotores de crescimento de plantas mais estudados. Os membros desta espécie estimulam várias características promotoras de crescimento vegetal, como aumento da disponibilização de nutrientes, produção de antibióticos, enzimas, fitormônios vegetais, sideróforos, além de produzir toxinas específicas efetivas, sendo

considerados como importantes agentes de biocontrole de fitopatógenos e de insetos-praga (Azizoglu et al., 2019; Nithyapriya et al., 2021). Este gênero foi relatado, em vários trabalhos, como o principal gênero de bactérias endofíticas de determinadas plantas e tais características demonstram o seu grande potencial tecnológico para utilização na agricultura de maneira mais segura e eficaz (Teixeira et al., 2007; Hardoim et al., 2015; Rana et al., 2020).

A grande vantagem que os endófitos têm em colonizar as plantas é que os tecidos internos proporcionam um ambiente protegido das adversidades do meio, tais como raio ultravioleta, chuvas e flutuações de temperatura, bem proporcionam maior disponibilidade de nutrientes, evitando assim competição com outros microrganismos (McInroy e Kloepper, 1995; Hardoim et al., 2008; Tanuja et al., 2013; Le Cocq et al., 2017).

Neste trabalho, o objetivo foi verificar o efeito da inoculação de estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a lepidópteros-praga e colonizadoras de plantas no crescimento do tomateiro, de modo a observar seu efeito colonizador sobre plantas de tomateiro e tóxico sobre *H. armigera*.

As estirpes de *B. thuringiensis* aqui testadas não resultaram na melhoria do crescimento das plantas de tomate quando se avaliou as características de altura, diâmetro do caule biomassa da parte aérea e radicular das plantas inoculadas. Diferentemente do observado para estas estirpes, S2122 e S1905 de *B. thuringiensis* promoveram o crescimento em plantas de algodão e de repolho, respectivamente (Praça et al., 2012; da Costa et al., 2020). Os efeitos benéficos das bactérias endófitas são variáveis entre as plantas em geral. Elas podem ter sua relação mais específica e benéfica de acordo com a espécie da planta, ou cultivar, ou de acordo com o método empregado para inocular a bactéria, o tempo de exposição à bactéria e a frequência das inoculações (Hardoim et al., 2015; Castro et al., 2019; Syed-Ab-Kahman et al., 2019; da Costa et al., 2020).

Entretanto, a limitação de resposta benéfica de crescimento das cepas de *B. thuringiensis* também está relacionada ao método escolhido para a inoculação. Por suas aplicações práticas, as bactérias promotoras de crescimento de plantas são utilizadas através da inoculação de sementes ou no solo (Mastretta et al. 2009; Santos et al., 2014). Em trabalhos anteriores, foram relatados ganhos de crescimento de plantas de algodão e repolho quando o tratamento da bactéria foi realizado nas sementes (Praça et al., 2012; da Costa et al., 2020). Portanto, deve-se avaliar a possibilidade de uso empregando este método em tomateiro sem arriscar a saúde das sementes, levando-se em conta o seu elevado custo.

Alguns trabalhos relatam ganhos de crescimento obtidos pela interação entre bactérias e plantas de tomate. Akram et al., (2015) estudaram o efeito de inoculação com *Bacillus fortis* IAGS162 e *Bacillus subtilis* IAGS174 na promoção de crescimento em tomateiro e verificaram que ambas as estirpes aumentaram o comprimento da parte aérea, da raiz e da biomassa total das plantas. A parte aérea das plantas da cultivar Santa Clara foi aumentada pela inoculação das sementes com a solução contendo a estirpe de *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 na concentração de 1×10^{11} UFC mL⁻¹ (Szilagyi-Zecchin et al., 2015).

Efeitos benéficos com a estirpe *B. thuringiensis* RZ2MS9 foram evidenciados na promoção de crescimento pelo incremento do peso da parte aérea do tomateiro em 24%, modificando a arquitetura das raízes (Batista et al., 2021). A promoção de crescimento vegetal foi relacionada à produção de ácido indol acético (AIA) com níveis de auxina atingindo a média máxima de 55 µg mL⁻¹ em meio de cultivo suplementado por triptofano (Batista et al., 2021).

A promoção de crescimento de plântulas e a ação de supressão do crescimento de patógenos do tomateiro foram verificadas pela inoculação das sementes acrescida de inoculação no solo com *B. amyloliquefaciens* (UQ154) e *Bacillus velezensis* (UQ156) que promoveram o crescimento da raiz, da massa fresca total e do vigor das plantas (Syed-Ab-Kahman et al., 2019).

Albuquerque (2018) também relatou que sementes tratadas com isolados de *Bacillus* spp. estimularam o crescimento de plantas de tomate. Barreti et al., (2009) utilizaram isolados bacterianos endófitos como agente de biocontrole de doenças do tomateiro dentre eles o *Prestia megaterium*, que, contudo, não proporcionou crescimento das plantas. Em outro trabalho realizado por Lanna-Filho et al., (2017) as sementes de tomate inoculadas com *B. amyloliquefaciens* e *Bacillus pumilus* promoveram resistência induzida à mancha bacteriana, entretanto, a inoculação provocou efeito negativo no crescimento das plantas tais como altura e peso seco.

Outro fator limitante à promoção do crescimento pode ser atribuído ao tempo de exposição à bactéria causando estresse nas raízes ou da concentração utilizada no inóculo inicial (de Castro Assumpção et al., 2010; Whipps, 2001).

As bactérias recuperadas das plantas tratadas apresentaram crescimento e morfologia semelhante às utilizadas para colonizar a planta. O fato de ter sido recuperado bactéria das raízes, do caule e das folhas e apenas do tratamento com a estirpe S1450 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, pode levar também a observação da ocorrência de diferentes níveis de colonização na planta a partir da inoculação com a bactéria. Não foi possível recuperar células bacterianas para as estirpes S1905 e S2124 em nenhuma parte da plantas e a estirpe S2122 foi verificada somente nas raízes do tomateiro. No trabalho desenvolvido por Bizzari e Bishop (2008) foi demonstrada a capacidade de formas vegetativas de *B. thuringiensis* em colonizar o filoplano de *Trifolium hybridum* em condições de campo após inoculação, algo que também corrobora a capacidade de colonização e multiplicação na planta dessa bactéria. A maior concentração de células foi obtida das raízes da planta, sendo que a maioria dos trabalhos reportam a região da rizosfera como a principal fonte de microrganismos endofíticos (Verma et al, 2001; Hardoim et al., 2015).

Praça et al. (2012) verificaram que todas as estirpes de *B. thuringiensis* estudadas apresentavam uma queda acentuada na capacidade de colonização nas duas semanas após ter ocorrido o pico de colonização. Foi destacado que este fato pode estar relacionado a fatores como a atividade dos microrganismos antagonistas e a ação de antibióticos produzidos pela planta impedindo a manifestação e multiplicação na planta (Pereira, 2000).

A microscopia de varredura é um método direto, já validado e extremamente útil para verificar e evidenciar a colonização e a multiplicação de microrganismos nas plantas e elucidar a interação do endófito com a planta (Praça et al., 2012; da Costa et al., 2020). Este método permitiu observar a localização e a distribuição da bactéria na planta de modo a confirmar a existência do organismo nas estruturas internas dos tecidos do vegetal. Na superfície das folhas elas parecem ter preferência por espaços formados pelos flanges cuticulares da folha, por estarem próximas aos estômatos (da Costa et al., 2019).

As estruturas das estirpes de *B. thuringiensis* foram visíveis aderidas na superfície das folhas e em flanges cuticulares próximas ao complexo estomático das folhas. Nos tecidos internos de caule e das raízes foram encontradas bactérias nas paredes de feixes vasculares mostrando que esses podem ser os locais preferenciais para estabelecimento.

O endofitismo de *Bacillus pumilus* em plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) também pôde ser comprovado pela análise estrutural da bactéria nos tecidos vegetais por meio de microscopia eletrônica de varredura, comprovando a colonização da bactéria inclusive na região vascular da planta (Melo et al., 2009). Populações de bactérias endofíticas são capazes de se estabelecer nos diferentes tecidos e órgãos das plantas, sem provocar qualquer sintoma visível de sua presença no organismo colonizado (Hayat et al., 2010).

No estudo conduzido por Dorta et al. (2020), a translocação de *B. thuringiensis* em mudas de citrus demonstrou a patogenicidade sistêmica para ninfas de *D. citri*, confirmando o envolvimento das estirpes na mortalidade dos psílídeos.

As estirpes de *B. thuringiensis* inoculadas nas plantas de tomate não apresentaram efeito tóxico sobre *H. armigera*. Foram obtidas pupas deformadas no tratamento com a estirpe S1450 de *B. thuringiensis*, porém não foram identificadas diferenças significativas para o peso das larvas e das pupas entre os tratamentos. Entretanto, pode ser realizada ainda observações utilizando outros métodos de inoculação da bactéria de modo a verificar efeito tóxico sobre insetos-praga. Acredita-se que os resultados da má formação de pupas não estejam relacionados à inoculação da bactéria, podendo ser decorrentes da metodologia aplicada. Os resultados obtidos por Ribeiro et al. (2017) indicaram que as variações qualitativas da dieta são os principais fatores que influenciam os índices biológicos de *H. armigera* incluindo a má formação das pupas, o que pode comprometer nutricionalmente o indivíduo, já que a planta parece ter sido adequada à larva pois a cultivar Santa Clara tem sido considerada suscetível a *H. armigera* em programas de melhoramento (Silva et al., 2016).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o *B. thuringiensis* foi capaz de colonizar plantas de tomateiro. A inoculação com as estirpes de *B. thuringiensis* não promoveram o crescimento das plantas e não houve efeito tóxico sobre *H. armigera*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKRAM, W.; ANJUM, T.; ALI, B. Co-cultivation of tomato with two *Bacillus* strains: effects on growth and yield. *Journal of Animal and Plant Science*, 25: 1644-1651, 2015.

ALVARENGA, M. A. R. Tomate: Produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia. Lavras: Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 517p., 2004.

ARAUJO, F. F. D.; GUERREIRO, R. T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de

crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. *Ciência e Agrotecnologia*, 34: 837-844, 2010.

AZIZOGLU, U. *Bacillus thuringiensis* as a biofertilizer and biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of Bt. *Current Microbiology*, 76: 1379-1385, 2019.

BARRETTI, P. B.; ROMEIRO, R. D. S.; MIZUBUTI, E. S. G.; SOUZA, J. T. D. Seleção de bactérias endofíticas de tomateiro como potenciais agentes de biocontrole e de promoção de crescimento. *Ciência e Agrotecnologia*, 33: 2038-2044, 2009.

BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M. de; POZZA, E. A. Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição in vitro de *Ralstonia solanacearum*. *Ciência e Agrotecnologia*, 32: 731-739, 2008.

BATISTA, B. D.; DOURADO, M. N.; FIGUEREDO, E. F.; HORTENCIO, R. O.; MARQUES, J. P. R.; PIOTTO, F. A.; BONATELLI, M. L.; SETTLES, M. L.; AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. The auxin-producing *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 promotes the growth and modifies the root architecture of tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). *Archives of Microbiology*, 203: 3869-3882, 2021.

BIZZARRI, M. F.; PRABHAKAR, A.; BISHOP, A. H. Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus thuringiensis* recovered from the phylloplane of clover (*Trifolium hybridum*) in vegetative form. *Microbial Ecology*, 55: 619-625, 2008.

BRITO, M. E. B.; SOARES, L. D. A.; LIMA, G. D.; SÁ, F. D. S.; ARAÚJO, T. T.; Silva, E. D. Crescimento e formação de fitomassa do tomateiro sob estresse hídrico nas fases fenológicas. *Irriga*, 20: 139-153, 2015.

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

CASTRO, M. T. DE; MONTALVÃO, S. C. L.; MONNERAT, R. G. Control of mahogany shoot borer, *Hypsipyla grandella* (lepidoptera: pyralidae), with *Bacillus thuringiensis* in a systemic way. *Nativa*, 7(4), 426–430, 2019.

COSTA, P. C. Produção do tomateiro em diferentes substratos. Tese do Doutorado. Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista. Botucatu. São Paulo, 119 p., 2003.

DE CASTRO ASSUMPÇÃO, L.; LACAVAL, P. T.; DIAS, A. C. F.; DE AZEVEDO, J. L.; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44: 503-510, 2010.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A.B. Pós-colheita de frutos e hortaliças, 2^o edição. Lavras, Minas Gerais: Escola Superior de Agricultura de Lavras, FAEPE, 785 p., 2005.

DA COSTA, F. S. S.; PRAÇA, L. B.; GOMES, A. C. M. M.; DOS SANTOS, R. C.; SOARES, C. M. S.; MONNERAT, R. G. *Bacillus thuringiensis* Effect on the Vegetative Development of Cotton Plants and the Biocontrol of *Spodoptera frugiperda*. *Agronomy*, 10: 1889, 2020.

DELABIE, J.H.C.; NASCIMENTO, I. C.; MARIANO, C. S. F. Estratégias de reprodução e dispersão em formigas attines, com exemplos do sul da Bahia. In: XIX Congresso Brasileiro de Entomologia. 2002. p. 16-21.

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

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A. M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79: 293-320, 2015.

HAYAT, R. ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology, Milan*, v. 60, n. 4, p. 579-598, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTÍSTICA – IBGE. Estatística mensal da Produção Agrícola Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em:< https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_mediaibge/arquivos/62ff13bdd3554efec8535a90712651b9.pdf>. Acesso em 18 de janeiro de 2019.

KOCH, M. S., WARD, J. M., LEVINE, S. L., BAUM, J. A. VICINI, J. L., HAMMOND, B. G. The food and environmental safety of Bt crops. *Frontiers in Plant Science*, 6: 283, 2015.

KOUL, B.; SRIVASTAVA, S.; SANYAL, I.; TRIPATHI, B.; SHARMA, V.; AMLA, D.V. Transgenic tomato line expressing modified *Bacillus thuringiensis* cry1Ab gene showing complete resistance to two lepidopteran pests. SpringerPlus, 3: 1-13, 2014.

KUMAR, K.; GAMBHIR, G.; DASS, A.; TRIPATHI, A.K.; SINGH, A.; JHA, A.K.; YADAVA, P.; CHOUDHARY, M.; RAKSHIT, S. Genetically modified crops: current status and future prospects. Planta, 251:91, 2020.

LANNA-FILHO, R.; SOUZA, R. M.; ALVES, E. Induced resistance in tomato plants promoted by two endophytic bacilli against bacterial speck. Tropical Plant Pathology, 42: 96-108, 2017.

LE COCQ, K.; GURR, S.J.; HIRSCH, P.R.; MAUHLIN, T.H. Exploitation of endophytes for sustainable agricultural intensification. Molecular Plant Pathology, 18: 469-73, 2017.

MARTINS, M. K. et al. Aspectos teóricos da caracterização molecular de microorganismos. In: ARAÚJO, W. L. et al. Micro-organismos endofíticos: aspectos teóricos e práticos de isolamento e caracterização. Santarém: UFOPA, 2014.

McINROY, J. A.; KLOPPER, J. W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. Canadian Journal of Microbiology, 41: 895-901, 1995.

MELO, F. M. P. D.; FIORE, M. F.; MORAES, L. A. B. D.; SILVA-STENICO, M. E.; SCRAMIN, S.; TEIXEIRA, M. D. A.; MELO, I.S.D. Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4A. Scientia Agricola, 66: 583-592, 2009.

MELO, A. P. C. D.; SELEGUINI, A.; VELOSO, V. D. R. S.; PEREIRA, J. M. Recobrimento de sementes de tomate com concentrações crescentes de polímero sintético. *Ciência Rural*, 45: 958-963, 2015.

MICHEREFF FILHO, M.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S.; MOITA, A. W.; SILVA, K. F. A.; SILVA, P. S.; EHRHARDT, M. V. S.; SOUSA, N. C. M. Identificação de fontes de resistência em tomateiro para *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Embrapa Hortaliças. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 193. Brasília, Distrito Federal, 36 p., 2019.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T. DE; MARTINS, E. S.; MELATTI, V. M.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; MORINAGA, C.; DEMO, C.; GOMES, A. C. M.; FALCÃO, R.; SIQUEIRA, C. B.; SILVA-WERNECK, S.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. *Biological Control*, 41: 291-295, 2007.

MOURA, A. P.; MICHEREFF FILHO, M.; GUIMARAES, J. A.; LIZ, R. S. Manejo integrado de pragas do tomateiro para processamento industrial. Embrapa Hortaliças, Circular técnica, 129. Brasília, Distrito Federal, 24 p., 2014.

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

NITHYAPRIYA, S.; LALITHA, S.; SAYYED, R. Z.; REDDY, M. S.; DAILIN, D. J.; EL ENSHASY, H. A.; LUH SURIANI, N.; HERLAMBANG, S. Production, Purification, and

Characterization of Bacillibactin Siderophore of *Bacillus subtilis* and Its Application for Improvement in Plant Growth and Oil Content in Sesame. *Sustainability*, 13: 5394, 2021.

PEREIRA, J. C. Interações entre as populações de actinomicetos e outros organismos na rizosfera. Embrapa Agrobiologia, Documentos 118 (INFOTECA-E), Seropédica, Rio de Janeiro, 16 p., 2000.

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

RANA, K. L.; KOUR, D.; KAUR, T.; DEVI, R.; YADAV, A. N.; YADAV, N.; DHALIWAL, H. S.; SAXENA, A. K. Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113: 1075-1107, 2020.

RIBEIRO, Z. A. Dieta artificial e metodologia de criação massal para o bem-estar de *Helicoverpa armigera*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 122 p., 2017.

SANTOS, J. F. D., SACRAMENTO, B. L. D., MOTA, K. N. A. B., SOUZA, J. T. D., & AZEVEDO NETO, A. D. D. Sunflower growth according to seed inoculation with endophytic bacteria. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 44: 142-150, 2014.

SCHMIDT, D.; ZAMBAN, D. T.; PROCHNOW, D.; CARON, B. O.; DE SOUZA, V. Q.; DE

PAULA, G. M.; COCCO, C. Fenologia, filocromo e requerimento térmico de híbridos de tomateiro italiano em dois ciclos de cultivo. *Horticultura Brasileira*, 35: 1, 2017.

SILVA, A. A.; ANDRADE, M. C.; DE CASTRO CARVALHO, R.; NEIVA, I. P.; SANTOS, D. C.; MALUF, W. R. Resistência à *Helicoverpa armigera* em genótipos de tomateiro obtidos do cruzamento de *Solanum lycopersicum* com *Solanum galapagense*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51: 801-808, 2016.

SILVA, F. D. A. S.; DE AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *African Journal of Agricultural Research*, 11: 3733-3740, 2016.

SILVA, H. S. A.; TERRASAN, C. R. F.; TOZZI, J. P. L.; MELO, I. S. DE; BETTIOL, W. Bactérias endófitas do cafeeiro e a indução de enzimas relacionadas com o controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*). Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2008.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; MÓGOR, Á. F.; RUARO, L.; RÖDER, C. Crescimento de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) estimulado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 em cultura orgânica. *Revista de Ciências Agrárias*, 38: 26-33, 2015.

SYED-AB-KAHMAN, S. F., XIAO, Y., CARVALHAIS, L. C., FERGUNSON, B. J., SCHENK, P. M. Suppression of *Phytophthora capsici* infection and promotion of tomato growth by soil bacteria. *Rhizosphere*, 9: 72-75, 2019.

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

TEIXEIRA, M. A.; DE MELO, I. S.; 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*, 42: 43-49, 2007.

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.

WESTERGRENN, G.; KRASSE, B. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 7: 82-83, 1978.

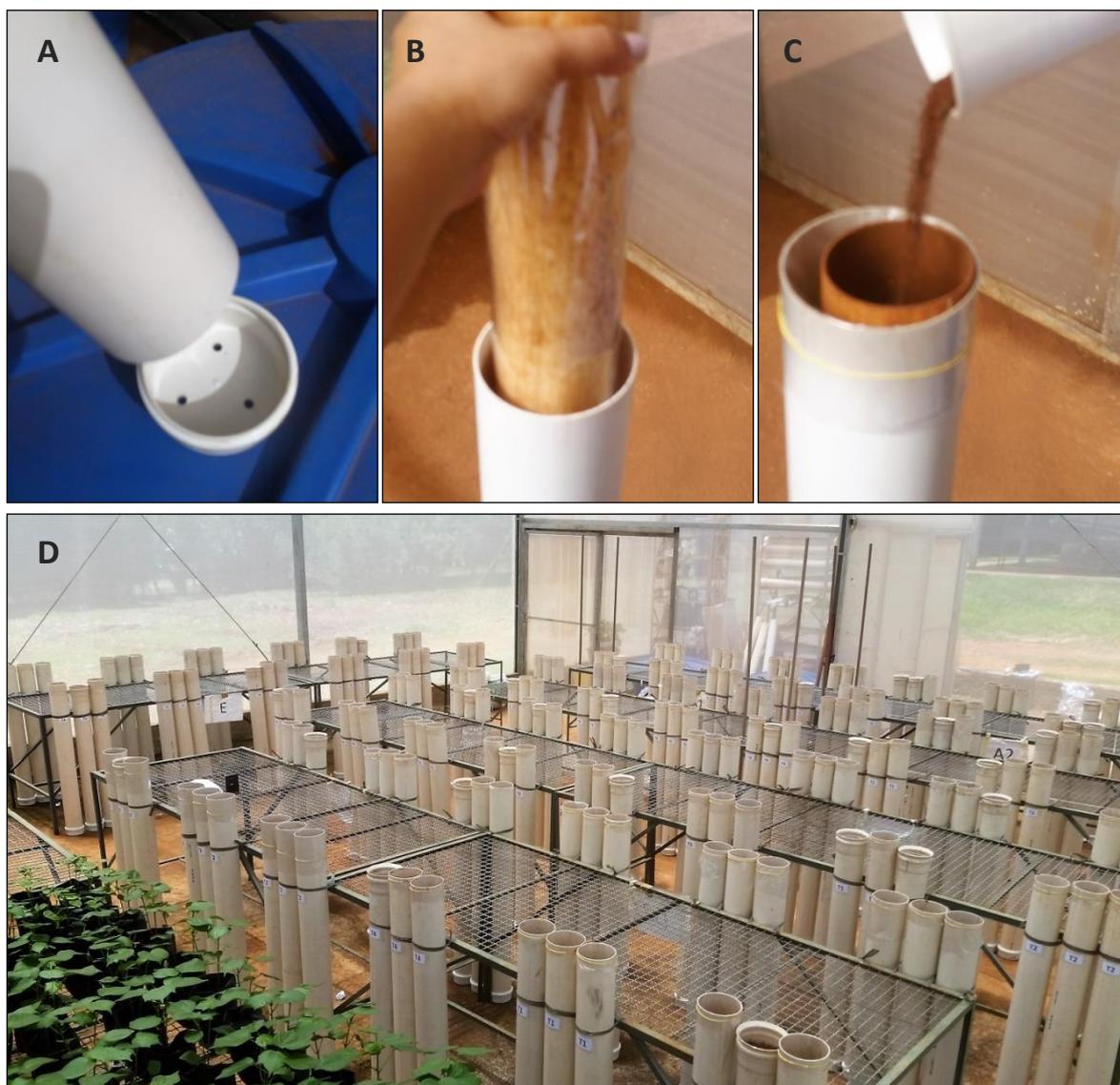
WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52: 487-511, 2001.

CONCLUSÕES

- O tratamento com a estirpe S2122 de *B. thuringiensis* afetou positivamente o índice de velocidade de emergência e o desenvolvimento de plantas do cultivar BRS 8H de algodoeiro;
- O uso de *B. thuringiensis* incrementou em cerca de 30% o peso seco das raízes da cultivar IMA 1318 e o método TS + Aplicação da bactéria aumentou em 14% o peso de raízes da cultivar BRS 8H;
- 40% dos genótipos testados foram positivamente afetados pelo tratamento de *B. thuringiensis* nas sementes. O uso da bactéria aumentou em cerca de 30% da matéria seca das plantas da cultivar IMA 6035 B2RF;
- Os tratamentos com *B. thuringiensis* não influenciaram negativamente a duração e a viabilidade dos estágios imaturos de *S. frugiperda*;
- O peso das pupas, fase adulta de machos e o período de oviposição não foram afetados pelo tratamento com *B. thuringiensis*;
- As mariposas *S. frugiperda* preferiram ovipositar mais em plantas sem a bactéria comparadas as plantas contendo o *B. thuringiensis* nas 72 horas de exposição.
- A inoculação de *B. thuringiensis* nas raízes permite a translocação e colonização endofítica em plantas de algodoeiro com capacidade de serem adquiridos por *B. tabaci* durante a alimentação;
- Plantas com a estirpe S1806 de *B. thuringiensis* demonstrou ser menos preferidas para oviposição por *B. tabaci* comparado a plantas que receberam somente água nos tratamentos;
- O *B. thuringiensis* foi capaz de colonizar endofiticamente as plantas de tomate, mas não induziu o crescimento nas plantas;

- A estirpe S1450 de *B. thuringiensis* foi capaz de colonizar todos os tecidos do tomateiro em maior concentração nas raízes;
- As plantas de tomate colonizadas por *B. thuringiensis* não apresentaram potencial tóxico sobre *H. armigera*.

ANEXOS



Anexo 1. Ensaio de crescimento de plantas da cultivar BRS 8H de algodoeiro inoculadas com a estirpe S2122 de *B. thuringiensis*. As plantas foram conduzidas em tubos polivinil clorido (PVC) de 100 mm de diâmetro e 1 m de altura com uma base também em PVC de mesmo calibre contendo três furos (Anexo 1A). Outro tubo de mesma altura e menor diâmetro revestido com filme de polipropileno (10 mm de espessura), nas dimensões 40 X 1,20 m, foi utilizado para revestir o interior do tubo (Anexo 1B). As bordas do plástico foram presas com elástico ao maior cilindro e só então preenchidos com o solo (Anexo 1C). Os tubos foram posicionados

verticalmente, três a três, e permaneceram presos às bancadas com amarração feita com fitilho plástico durante do ensaio (Anexo 1D).

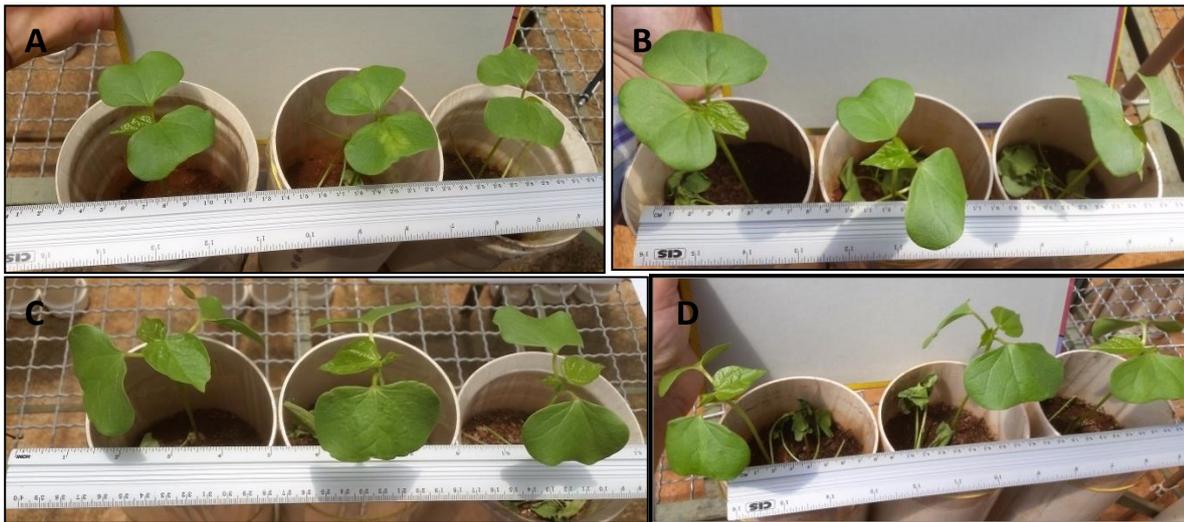
Anexo 2. Percentual e intervalos de confianças de plantas de algodoeiro por estágio fenológico de crescimento dos tratamentos que utilizaram métodos de inoculação com *B. thuringiensis* na cultivar BRS 8H. As avaliações foram realizadas aos 8, 13, 17, 22, 27, 32, 43 e 52 dias após a emergência das plantas (DAE). Os valores para o percentual inferior (PI) e o percentual superior (PS) foram estabelecidas utilizando os limites bilaterais de F a nível de 5% de probabilidade.

Avaliação em dias após a emergência (DAE)	Estádio fenológico de desenvolvimento das plantas
8 DAE	
Testemunha	[23,3% Folha cotiledonar (PI 75,24 e PS 99,87%); 46,7 % em V0 (PI 64,48 e PS 86,25%)]
TS	[5,0% Folha cotiledonar (PI 1,04 e PS 13,89%); 81,7% em V0 (PI 69,87 e PS 90,12%); 13,3% em V1 (PI 5,96 e PS 23,93%)]
TS+Pellet	[5,0% Folha cotiledonar (PI 1,04 e PS 13,89%); 95,0% em V0 (PI 86,10 e PS 98,95%)]
TS+Aplicação	[1,7% Folha cotiledonar (PI 0,04 e PS 8,92%); 98,3% em V0 (PI 91,07 e PS 99,95%)]
13 DAE	
Testemunha	[91,7% em V1 (PI 81,72 e PS 97,23%); 8,7 % em V2 (PI 1,61 e PS 12,57%)]

TS	[73,3% em V1 (PI 60,51 e PS 84,01%); 26,7 % em V2 (PI 15,98 e PS 39,49%)]
TS+Pellet	[68,3% em V1 (PI 56,47 e PS 78,87%); 31,7 % em V2 (PI 20,81 e PS 43,99%)]
TS+Aplicação	[73,3% em V1 (PI 60,51e PS 84,01%); 26,7 % em V2 (PI 15,98 e PS 39,49%)]
17 DAE	
Testemunha	[8,3% em V1 (PI 2,32 e PS 19,70%); 77,1% em V2 (PI 62,15 e PS 87,77%); 14,6% em V3 (PI 6,13% e PS27,43%)]
TS	[4,2% em V1 (PI 0,50 e PS 14,10%); 47,9% em V2 (PI 32,96 e PS 62,54%); 47,9% em V3 (PI 32,96 e PS 62,54%)]
TS+Pellet	[2,1% em V1 (PI 0,50 e PS 10,95%); 39,6% em V2 (PI 26,04 e PS 54,53%); 58,3% em V3 (PI 43,39 e PS 72,28%)]
TS+Aplicação	[2,1% em V1 (PI 0,50 e PS 10,95%); 47,9% em V2 (PI 32,96 e PS 62,54%); 50,0% em V3 (PI 34,80 e PS 65,19%)]
22 DAE	
Testemunha	[2,1% em V2 (PI 0,50 e PS 10,95%); 95,8% em V3 (PI 85,89 e PS 99,49%); 2,1% em V3 (PI 0,50 e PS 10,95%)]
TS	[64,6% em V3 (PI 49,75 e PS 78,48%); 31,2% em V4 (PI 18,54 e PS 51,36%); 4,2% em V5 (PI 0,50 e PS 14,10%)]
TS+Pellet	[62,5% em V3 (PI 47,58 e PS 75,59%); 37,5% em V4 (PI 24,40 e PS 52,41%)]

TS+Aplicação	[68,7% em V3 (PI 53,14 e PS 81,45%); 29,2% em V4 (PI 17,10 e PS 44,51%); 2,1% em V5 (PI 0,50 e PS 10,95%)]
27 DAE	
Testemunha	[33,3% em V4 (PI 20,01 e PS 49,13%); 66,7% em V5 (PI 50,86 e PS 79,98%)]
TS	[20,8% em V4 (PI 10,34 e PS 35,93%); 66,7% em V5 (PI 50,86 e PS 79,98%); 12,5% em V6 (PI 4,75 e PS 24,41%)]
TS+Pellet	[14,6% em V4 (PI 6,13 e PS 27,43%); 83,3% em V5 (PI 72,46 e PS 92,42%); 2,1% em V6 (PI 0,50 e PS 10,95%)]
TS+Aplicação	[14,6% em V4 (PI 6,13 e PS 27,43%); 83,3% em V5 (PI 72,46 e PS 92,42%); 2,1% em V6 (PI 0,50 e PS 10,95%)]
32 DAE	
Testemunha	[2,8% em V4 (PI 0,50 e PS 10,95%); 22,2% em V5 (PI 10,11 e PS 38,38%); 41,6% em V6 (PI 25,34 e PS 59,62%); 33,4% em B1 (PI 18,75 e PS 49,61%)]
TS	[2,8% em V4 (PI 0,50 e PS 10,95%); 13,9% em V5 (PI 4,64 e PS 30,54%); 25,0% em V6 (PI 12,63 e PS 41,78%); 58,3% em B1 (PI 40,37 e PS 74,65%)]
TS+Pellet	[8,3% em V5 (PI 1,75 e PS 22,60%); 30,6% em V6 (PI 16,43 e PS 47,43%); 61,1% em B1 (PI 43,07 e PS 76,73%)]

TS+Aplicação	[5,5% em V5 (PI 0,68 e PS 18,84%); 27,8% em V6 (PI 14,28 e PS 44,29%); 66,7% em B1 (PI 50,38 e PS 81,24%)]
43 DAE	
Testemunha	[41,7% em B2 (PI 22,11 e PS 62,72%); 58,3% em B3 (PI 37,27 e PS 77,88%)]
TS	[20,8% em B2 (PI 10,45 e PS 41,94%); 54,2% em B3 (PI 33,59 e PS 73,79%) 25,0% em B4 (PI 9,79 e PS 45,86%)]
TS+Pellet	[79,2% em B3 (PI 58,05 e PS 92,87%); 16,6% em B4 (PI 4,71 e PS 37,42%); [4,2% em B5 (PI 0,10 e PS 21,36%)]
TS+Aplicação	[54,2% em B3 (PI 33,59 e PS 73,79%); 45,8% em B4 (PI 26,20 e PS 66,40%)]
52 DAE	
Testemunha	[45,8% em B5 (PI 26,20 e PS 66,40%); 54,2% em B6 (PI 33,59 e PS 73,79%)]
TS	[54,2% em B5 (PI 33,59 e PS 73,79%); 41,6% em B6 (PI 22,11 e PS 62,72%); 4,2% em B7 (PI 0,10 e PS 21,36%)]
TS+Pellet	[25,0% em B5 (PI 9,79 e PS 45,86%); 62,5% em B6 (PI 40,51 e PS 80,66%); 12,5% em B7 (PI 2,65 e PS 32,15%)]
TS+Aplicação	[8,3% em B5 (PI 1,02 e PS 26,40%); 83,4% em B6 (PI 62,57 e PS 95,28%); 8,3% em B7 (PI 1,02 e PS 26,40%)]



Anexo 3. Crescimento de plantas da cultivar BRS 8H de algodoeiro tratadas com *B. thuringiensis* aos 8 dias após a emergência das plantas. Plantas do tratamento testemunha com ausência da bactéria (Anexo 1A); plantas que receberam Bt somente na semente (TS) (Anexo 1B e 1C); plantas que receberam o Bt na semente + adição do pellet bacteriano no solo no momento do plantio (TS + Pellet) (Anexo 1D).

Anexo 4. Altura de plantas da cultivar BRS 8H de algodoeiro submetidas ao tratamento com *B. thuringiensis*. Os métodos de inoculação utilizados no ensaio foram o tratamento de sementes (TS) a 10^8 UFC mL⁻¹, TS + adição do pellet bacteriano ao solo com 10^7 UFC mg⁻¹ (TS + Pellet), TS + aplicação de 1 mL da suspensão bacteriana a 10^7 UFC mL⁻¹ no solo a cada sete dias (TS + Aplicação). O tratamento testemunha recebeu água em substituição a bactéria. (média ± desvio padrão) (n = número de plantas)

Altura das plantas de algodoeiro tratadas com Bt (cm)								
Tratamento	Dias após a emergência das plantas (DAE)							
	8	13	17	22	27	32	43	52
	n=60	n=60	n=48	n=48	n=48	n=36	n=24	n=24
Testemunha	14,00 ± 1,500 a	21,10 ± 1,774 a	26,50 ± 2,411 a	32,58 ± 2,802 a	40,00 ± 2,201 a	44,97 ± 2,927 a	53,00 ± 2,620 a	57,83 ± 2,530 a
TS	15,10 ± 1,632 a	23,30 ± 1,960 a	29,25 ± 2,313 a	33,40 ± 2,925 a	40,25 ± 2,398 a	47,15 ± 4,101 a	54,50 ± 3,142 a	59,70 ± 2,999 a
TS + Pellet	14,50 ± 1,790 a	22,00 ± 1,788 a	28,75 ± 2,375 a	33,64 ± 2,687 a	40,75 ± 2,868 a	47,72 ± 3,600 a	54,00 ± 2,963 a	59,291 ± 3,519 a
TS + Aplicação	14,80 ± 1,368 a	22,50 ± 1,738 a	29,00 ± 2,168 a	33,53 ± 2,698 a	40,50 ± 2,538 a	45,46 ± 3,296 a	52,50 ± 4,099 a	58,833 ± 2,371 a

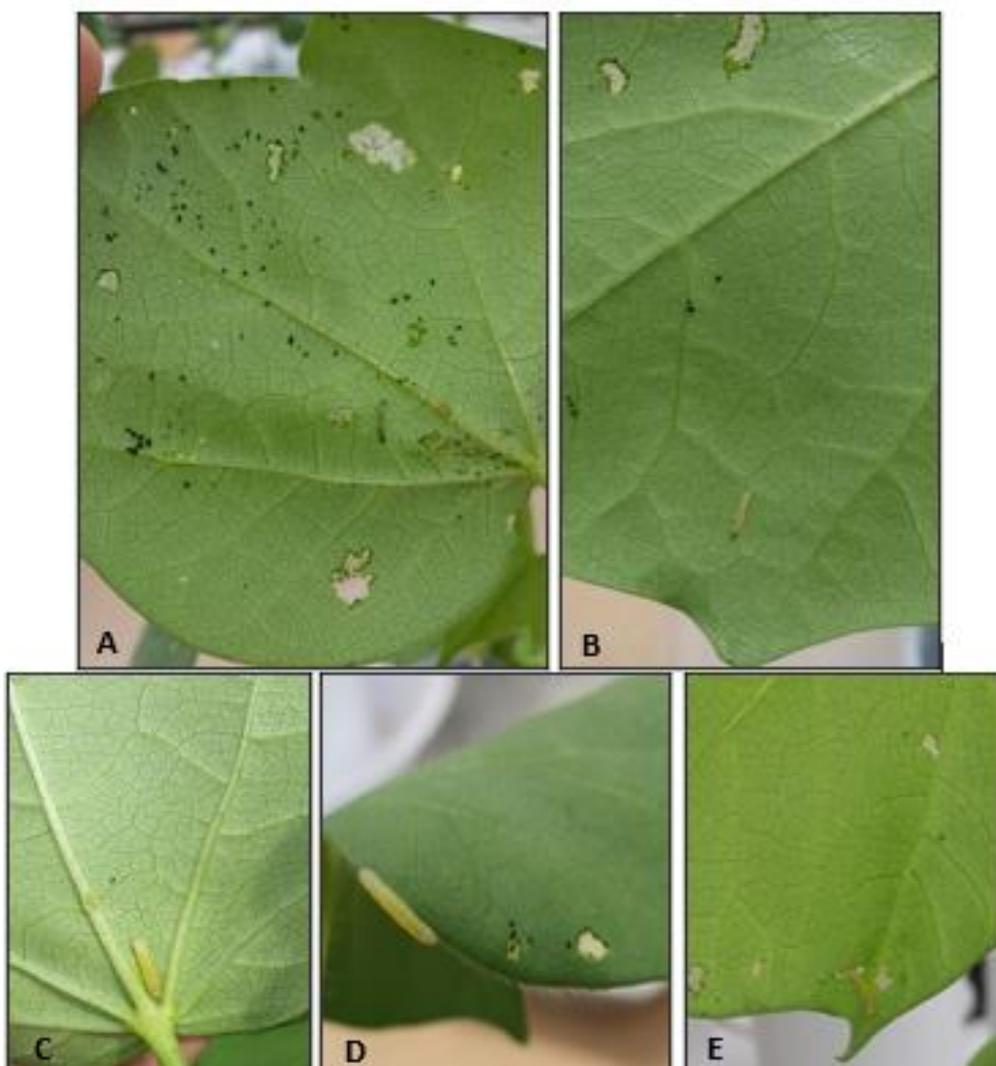
Anexo 5. Percentual de plantas de algodoeiro por estágio fenológico de crescimento e intervalos de confianças dos tratamentos que utilizaram métodos de inoculação com *B. thuringiensis* sobre a cultivar IMA 1318. As avaliações foram realizadas aos 35 dias após a emergência das plantas (DAE). Os valores para o percentual inferior (PI) e o percentual superior (PS) foram estabelecidas utilizando os limites bilaterais de F a nível de 5% de probabilidade.

Avaliação em dias após a emergência (DAE)	Estádio fenológico de desenvolvimento das plantas
35 DAE	
Testemunha	[16,6% em V3 (PI 2,10 e PS 48,38%); 66,6 % em V4 (PI 34,82 e PS 90,00%); 16,6% em V5 (PI 2,10 e PS 48,38%)]
TS	[50% em V4 (PI 21,20 e PS 78,79%); 50% em V5 (PI 21,20 e PS 78,79%)]
TS+Pellet	[75% em V4 (PI 43,63 e PS 94,52%); 25% em V5 (PI 5,47 e PS 56,36%)]
TS+Aplicação	[50% em V4 (PI 21,20 e PS 78,79%); 50% em V5 (PI 21,20 e PS 78,79%)]

Anexo 6. Índice da velocidade de emergência (IVE) de genótipos de algodoeiro tratadas com a estirpe S2122 de *B. thuringiensis* nas sementes com a suspensão 10^8 UFC mL⁻¹ da bactéria. (média \pm desvio padrão) (n=número de plantas).

Cultivares	IVE (n=10)
IMA 5675 B2RF	
Com Bt	13,56 \pm 0,556
Testemunha	13,85 \pm 0,475
IMA 08-3869	
Com Bt	11,04 \pm 0,336*
Testemunha	13,88 \pm 0,577
IMA 07-6035	
Com Bt	14,68 \pm 0,603*
Testemunha	13,51 \pm 0,344
IMA 2106 GTL	
Com Bt	13,45 \pm 0,483*
Testemunha	8,16 \pm 0,200
IMA 6035 B2RF	
Com Bt	13,24 \pm 0,415*
Testemunha	12,45 \pm 0,310
IMA 8405	
Com Bt	12,07 \pm 0,552
Testemunha	13,02 \pm 0,472
FM 966 LL	
Com Bt	10,55 \pm 0,267*
Testemunha	12,22 \pm 0,353
IMA 2106	
Com Bt	10,70 \pm 0,571*
Testemunha	9,81 \pm 0,387
IMA 0250 GTL 05	
Com Bt	10,93 \pm 0,573
Testemunha	11,05 \pm 0,398
IMA 0250 GTL 15	
Com Bt	11,27 \pm 0,515*
Testemunha	9,11 \pm 0,480

* significativo ao nível de 5 %



Anexo 7. Lagartas de *S. frugiperda* aos 5 dias após o início da exposição em plantas colonizadas por *B. thuringiensis* (Bt). Anexo A - lagarta se alimentando em planta do tratamento testemunha com danos em toda a superfície foliar. Anexos B, C, D e E - lagartas se alimentando em plantas que receberam o tratamento de sementes com Bt na concentração 10^8 UFC mL^{-1} (TS) + Aplicação da suspensão bacteriana a 10^7 UFC mL^{-1} no solo. Pela análise visual foi observado que larvas que se alimentaram de plantas tratadas com Bt apresentaram debilitadas, com coloração amarelada e com menor mobilidade.



Anexo 8. Lagartas de *S. frugiperda* aos 22 dias após o início de exposição e alimentação em plantas com *B. thuringiensis*. Os métodos utilizados foram o tratamento com a bactéria nas sementes na suspensão com 10^8 UFC mL^{-1} (TS); TS + Pellet bacteriano a 10^7 UFC mg^{-1} ao solo no plantio; e TS + Aplicação da suspensão da bactéria a 10^7 UFC mL^{-1} semanalmente. A testemunha consistiu na utilização da água em substituição a bactéria.