



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**UTILIZAÇÃO SISTÊMICA DE *Bacillus thuringiensis* PARA CONTROLE DE
Plutella xylostella NA CULTURA DE COUVE**

RAYANE BALSAMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PUBLICAÇÃO Nº. 319

**BRASÍLIA/DF
Fevereiro/2009**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**UTILIZAÇÃO SISTÊMICA DE *Bacillus thuringiensis* PARA CONTROLE DE
Plutella xylostella NA CULTURA DE COUVE**

RAYANE BALSAMO

ORIENTADOR: ROSE GOMES MONNERAT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

BRASÍLIA/DF
Fevereiro/2009

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**UTILIZAÇÃO SISTÊMICA DE *Bacillus thuringiensis* PARA CONTROLE DE
Plutella xylostella NA CULTURA DE COUVE**

RAYANE BALSAMO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDO À FACULDADE DE AGRONOMIA E
MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE DISCIPLINAS DE PRODUÇÃO
VEGETAL.**

APROVADA POR:

**ROSE GOMES MONNERAT, Doutor (Embrapa Recursos Genéticos)
(ORIENTADOR) CPF: 512.803.701-06
E-mail: rose@cenargen.embrapa.br**

**JEAN KLEBER DE ABREU MATTOS Doutor (Universidade de Brasília)
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 002.288.181-68
E-mail: kleber@unb.br**

**CRISTINA MARIA MONTEIRO MACHADO, Doutor (Embrapa Agroenergia)
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 962.072.489-53
E-mail: cristina.machado@embrapa.br**

BRASÍLIA/DF, 20 de fevereiro de 2009 (data da defesa)

Balsamo, Rayane.

UTILIZAÇÃO SISTÊMICA DE *Bacillus thuringiensis* PARA CONTROLE DE *Plutella xylostella* NA CULTURA DE COUVE

Dissertação de mestrado (M) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2009.

1. Couve. 2. *Bacillus thuringiensis*. 3. Gfp. 4. Aplicação Sistêmica. 5. Controle Biológico

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Balsamo, R. UTILIZAÇÃO SISTÊMICA DE *Bacillus thuringiensis* PARA CONTROLE DE *Plutella xylostella* NA CULTURA DE COUVE Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009. 84 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Rayane Balsamo

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: UTILIZAÇÃO SISTÊMICA DE *Bacillus thuringiensis* PARA CONTROLE DE *Plutella xylostella* NA CULTURA DE COUVE

È concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósito acadêmico e científico. À autora reserva-se os outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação pode ser reproduzida sem a autorização da autora.

Rayane Balsamo
CPF: 997.622.421-49
SHIS QI 27 Condomínio Quintas da Alvorada, Rua Javari, 304
Lago Sul
CEP: 71.680-356
E-mail: rayane.balsamo@gmail.com

Não é o mais forte nem o mais
inteligente que sobrevive.
É o mais adaptado às
mudanças.

Charles Darwin

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a pessoa mais extraordinária da minha vida, minha mãe, que me ensinou a perseverança e tenacidade na busca de novos desafios e a força para enfrentá-los todos os dias. Dedico também a meus queridos irmãos (Sandor e Yuri) e ao Michele pelo amor e aprendizagem nas várias fases da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a minha orientadora, Doutora Rose Gomes Monnerat, pela grande oportunidade que me proporcionou.

A Doutora Cristina Maria Monteiro Machado que desde a especialização tem me apoiado com muita competência e a disponibilidade, obrigada pela amizade.

A todos os meus colegas do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia principalmente o Vinícius, Érica, Felipe Ramos;

A Aldaléia e a Carol Ramiro pela amizade que vai além do campo profissional e acadêmico.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela infra-estrutura e apoio financeiro.

A Universidade de Brasília e seus professores pelo conhecimento obtido.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1. A cultura da couve	15
1.2. A traça das crucíferas (TDC) <i>Plutella xylostella</i> (L.) (Lepidoptera: Plutellidae)	15
1.2.1 Características biológicas da <i>Plutella xylostella</i>	16
1.2.2. <i>Plutella xylostella</i> : a principal praga da couve	17
1.2.3. Controle da praga	18
1.3. Controle biológico de pragas	20
1.4. Características dos Microrganismos Endofíticos	22
1.5. <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)	25
1.5.1. Aspectos biológicos	25
1.5.2. Histórico	25
1.5.3. Toxinas produzidas pelo <i>Bacillus thuringiensis</i>	26
1.5.3.1. α - exotoxina	26
1.5.3.2. β - exotoxina	27
1.5.3.3. Vip 3A	28
1.5.3.4. δ - endotoxinas	28
1.5.3.5. Modo de ação das δ - endotoxina	30
1.5.4. Importância comercial	32
1.5.5. Transgênicos	33
1.6. O uso do <i>Green flurescent protein</i> (GFP) como marcador	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
CAPITULO 1-	51
RESUMO	51
CHAPTER 1- SISTEMIC USE OF <i>Bacillus thuringiensis</i> FOR THE CONTROL OF <i>Plutella xylostella</i> IN CABBAGE	52
ABSTRACT	52
INTRODUÇÃO	53
OBJETIVO	54
1. MATERIAL E MÉTODOS	54
1.1. Estirpe	54
1.1.1. A microscopia de fluorescência	55
1.1.2. O plaqueamento e contagem de colônias	55
1.2. Planta	56
1.3. Inseto	57
1.4. Traslocação do Bt em planta de couve	59
1.4.1. Aplicação Semanal	61
1.4.2. Aplicação Única (Teste da Persistência)	61
1.5. Toxicidade a larvas de <i>P.xylostella</i>	62
1.5.1. Bioensaio in vivo aplicação semanal (dose 1mL e 5mL)	62

1.5.2. Bioensaio in vitro aplicação semanal (dose 1mL e 5mL).....	64
1.5.3. Bioensaio in vitro de persistência (aplicação única) (dose 1mL e 5mL) ...	64
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
2.1. Traslocação do Bt em plantas de couve	66
2.1.1. Aplicação Semanal (dose 1mL e 5mL).....	66
2.1.2. Aplicação Única (Teste da Persistência) (dose 1mL e 5mL)	70
2.2. Bioensaio	75
2.2.1. Bioensaio in vivo (dose 1mL e 5mL).....	75
2.2.2. Bioensaio in vitro aplicação semanal (dose 1mL e 5mL).....	77
2.2.3. Bioensaio in vitro teste Persistência (Aplicação Única) (dose 1mL e 5mL)	78
3. CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Várias fases de desenvolvimento da <i>P. xylostella</i> . a) Ovos; b) Larva; c) Pupa; d) Adulto.....	17
Figura 2 - Danos causados pela <i>P. xylostella</i> na cultura de couve.....	18
Figura 3 – Mecanismo de ação da toxina Cry.	31
Figura 4 Mecanismo de ação das plantas transgênicas.....	35
Figura 5-Plantas em estantes protegidas por telas e com fotoperíodo controlado....	57
Figura 6- Detalhe da planta de couve na prateleira.....	57
Figura 7- Gaiola larvas <i>P. xylostella</i>	58
Figura 8- Detalhe gaiola.....	58
Figura 9- Gaiola dos adultos de <i>P. xylostella</i>	59
Figura 10- Imagem da amostra de folha com florescência.....	55
Figura 11- Representação de diluição seriada e plaqueamento.....	56
Figura 12- Detalhe das gaiolas com 2 doses diferentes de aplicação distintas.....	63
Figura 13- Bioensaio in vivo a) Gaiola para o Bioensaio in vivo e b) Detalhe da planta para o bioensaio.....	64
Figura 14 Detalhe da placa com recuperação das amostras de folha com dose de inóculo de 1mL com choque térmico.....	68
Figura 15- Colônias de recuperação das amostras de caule na dose de 5mL com choque térmico com diluição de -1, -2 e -3.....	69
Figura 16- Colônias recuperadas das amostras das folhas dosagem 5mL nas várias diluições com choque térmico.....	69
Figura 17- Persistência amostra de folha e caule 1mL.....	72
Figura 18- Persistência amostra de folha e de caule 5mL.....	72
Figura 19- Persistência amostra de terra com diluição de -3 e dose 5mL.....	73

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- UFC/g das amostras de Folha, Caule e Terra dose 1mL.....	67
Gráfico 2- UFC/g das amostras de Folha, Caule e Terra dose 5mL.....	68
Gráfico 3- Persistência de Btk GFP com tratamento de dosagem única de 1mL em folha.....	70
Gráfico 4- Persistência de Btk GFP com tratamento de dosagem única de 1mL em caule.....	71
Gráfico 5- Persistência de Btk GFP com tratamento de dosagem única de 1mL em terra.....	71
Gráfico 6- Persistência de Btk GFP com tratamento de dosagem única de 1mL em folha.....	73
Gráfico 7- Persistência de Btk GFP com tratamento de dosagem única de 1mL em caule.....	74
Gráfico 8- Persistência de Btk GFP com tratamento de dosagem única de 1mL em terra.....	75
Gráfico 9- Porcentual de mortalidade de dose de 1mL aplicadas distintamente em diferentes plantas de couve por semana.....	76
Gráfico 10- Porcentual de mortalidade na dose de 5mL aplicadas distintamente em diferentes plantas de couve por semana.....	76
Gráfico 11- Bioensaio in vitro dose 1mL.....	77
Gráfico 12- Bioensaio in vitro dose 5mL.....	77
Gráfico 13- Mortalidade do bioensaio aplicação única de 1mL por planta.....	78
Gráfico 14- Mortalidade do bioensaio aplicação única de 5mL por planta.....	79

UTILIZAÇÃO SISTÊMICA DE *Bacillus thuringiensis* PARA CONTROLE DE *Plutella xylostella* NA CULTURA DE COUVE

RESUMO

A traça-das-crucíferas (TDC) *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) é a principal praga da cultura das crucíferas e o controle químico é o método mais empregado para reduzir os danos desta praga. Uma alternativa para o controle da *P.xylostella* é a utilização de agentes de controle biológico, como *Bacillus thuringiensis* (Bt). Seu uso ainda é restrito, quando comparado aos inseticidas químicos, pois quando aplicado nas folhas, o complexo esporo-cristal fica exposto à radiação solar e é rapidamente desnaturado ou é “lavado” pela ação das chuvas. A alternativa é o uso endófito do Bt, que tem a mesma função, sem os limites derivados da baixa ação residual. Este trabalho teve como objetivo determinar o efeito do Bt sobre *P. xylostella* a partir da aplicação sistêmica da bactéria na planta de couve. Foi utilizado o *Bacillus thuringiensis kurstaki* marcado com GFP (Btk-GFP), pertencente ao banco de *Bacillus spp.* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A estirpe foi crescida por 72 h em meio nutritivo e inoculada perto da raiz das plantas para avaliar a sua atividade tóxica para nas lagartas de *P. xylostella*. Após a inoculação foram realizados bioensaios para a determinação da mortalidade das lagartas no terceiro instar. Os resultados obtidos mostraram que, a planta absorveu o Btk-GFP do solo e que este se multiplicou em seu interior, protegendo-a contra os insetos. É possível que esses experimentos preliminares estejam abrindo a possibilidade de uma nova forma de utilização de *B. thuringiensis* no controle de insetos.

Palavras-Chave: couve, *Bacillus thuringiensis*, GFP, aplicação sistêmica, controle biológico

SISTEMIC UTILIZATION OF *Bacillus thuringiensis* FOR THE CONTROL OF *Plutella xylostella* IN CABBAGE

ABSTRACT

The diamondback moth (DM) *Plutella xylostella* (*Lepidoptera: Plutellidae*) is the major pest of crucifer culture and the chemical control is the method most used to reduce its damage. An alternative to control this pest is the use of biological control agents, such as *Bacillus thuringiensis* (Bt). Its use is still limited when compared to chemical insecticides, because when applied in complex leaves the spore-crystal is exposed to solar radiation and is rapidly denatured or are "washed" by the action of rain. The alternative is the use of endophytic Bt that has the same function, without the limitation derived from low residual action. This study aimed to determine the effect of Bt on *Plutella xylostella* from the systemic application of the bacteria in the plant of cabbage. We used the GFP *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Btk-GFP), belonging to the bank of *Bacillus spp.* at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. The strain was grown for 72 h in nutrient medium and inoculated near the roots of plants to evaluate their toxic activity to the larvae of *P. xylostella*. After inoculation bioassays were conducted to determine the mortality of the larvae in the third instar. The results showed that the plant absorbs the Btk-GFP from the ground and proliferates in the interior, protecting it against insects. It is possible that these preliminary experiments are opening the possibility of a new way of using *B. thuringiensis* to control insects.

Keywords: cabbage, *Bacillus thuringiensis*, GFP, systemic application, biological control

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da agricultura mundial está diretamente relacionado ao aumento exponencial da população do planeta. Este fato tem demandado um incremento da produção agrícola. Para atender a essa demanda foi preciso criar um sistema de proteção das culturas e de fertilização do solo. Foram esses os objetivos essenciais da chamada revolução verde ocorrida na década de 50 do século passado.

De acordo com Cavalli (2001), a revolução verde se fundamentou na produção em larga escala, de alta tecnologia agrícola, desenvolvida pelo processo científico. A partir de então, o controle das pragas que infestavam as culturas agrícolas passou a ser feito pelo uso de inseticidas químicos (ALTIERI, 1999).

Dentre as pragas controladas por defensivos agrícolas destacam-se os insetos. Esses são responsáveis por consideráveis perdas agrícolas principalmente em cultivos extensivos de grandes culturas, como soja, milho, algodão e canola (GALLO et al, 2002).

De acordo com Dias (1992), a principal forma de controle de insetos tem sido feita pela utilização de produtos químicos, cuja aplicação exige um grande investimento, onerando e até mesmo inviabilizando, em alguns casos, a produção.

Apesar de o uso de inseticidas ter resolvido um dos problemas que atinge a agricultura mundial, a sua aplicação incontrolada, provoca danos tanto para os trabalhadores agrícolas, que manuseiam esses produtos químicos, como para o meio ambiente e para a saúde do consumidor (MOREIRA, 2000).

A importância do controle de pragas para aumentar a produção agrícola, bem como o aumento da consciência da população quanto aos efeitos diretos e indiretos dos pesticidas usados na saúde pública e no meio ambiente, tem demandado formas de controle mais econômicas e menos danosas para os ecossistemas. Dentre estas têm sido usados vários agentes microbianos que possuem atividade entomopatogênica como o *Bacillus*

thuringiensis (Berliner), que é uma bactéria de ampla distribuição geográfica, específica para controlar insetos, e que tem sido usada como base de produtos comerciais desde 1938, apesar de seu uso ainda ser restrito quando comparado aos inseticidas químicos (DIAS, 1992).

Para Polanczyk e Alves, (2003) isso se deve principalmente à sua baixa ação residual, pois quando aplicado nas folhas, o complexo esporo-cristal fica exposto à radiação solar e é rapidamente desnaturado. Além disso, as formulações são “lavadas” pelas chuvas permanecendo nas folhas por um curto período de tempo. Para contornar este problema, novas formulações, contendo diferentes tipos e quantidades de protetores solares e espalhantes adesivos estão sendo desenvolvidas.

Em 2003, foram iniciados estudos no laboratório de bacteriologia do Núcleo de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia para verificar a possibilidade da utilização de *B. thuringiensis* associado as bactérias endofíticas. Baseado no fato de que muitas bactérias do gênero *Bacillus* tenham sido isoladas de tecidos de plantas (Azevedo et al., 2000) e de que as bactérias pertencentes a esse gênero têm a capacidade de conjugar, trocando desta forma, material genético, foram realizadas pesquisas para encontrar *Bacillus* endofíticos de plantas de algodão e conjugá-los com estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a lepidópteros e coleópteros armazenados na coleção da Embrapa.

Nos primeiros ensaios foram isoladas 20 estirpes de *B. thuringiensis*, algumas das quais contendo toxinas ativas contra lepidópteros (MONNERAT et al., 2003). Concomitantemente a este trabalho foi realizado um grande levantamento bibliográfico onde foi constatado como o primeiro relato do isolamento de *B. thuringiensis* a partir de tecidos de plantas.

Na seqüência dos ensaios laboratoriais, foi verificado que *B. thuringiensis*, uma vez inoculado no solo próximo as raízes da planta de algodão, espalha-se por todos os tecidos, chegando aos insetos que se alimentaram dessas plantas. Não houve necessidade de conjugação do Bt (DEMO, 2006).

É importante destacar que os microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior das plantas durante pelo menos um período do ciclo de

suas vidas (AZEVEDO, 1998). No início dos anos setenta, microrganismos endofíticos eram considerados neutros, por não causarem danos ou benefícios as plantas. Hoje, sabe-se que esses microrganismos, em muitos casos, desempenham um papel importante na proteção das plantas contra predadores e patógenos (AZEVEDO et al., 2000).

Com esta pesquisa procurou-se primeiro compreender melhor como o *B. thuringiensis* sobrevive no interior das plantas de couve e depois saber qual a melhor dosagem de aplicação da bactéria que maximize sua absorção tornando-a resistente aos insetos.

Para tanto, escolheu-se a couve *Brassica oleracea* L. var. *acephala* pela sua importância econômica, pois as brássicas ocupam o 3º lugar dentre as hortaliças mais consumidas no mundo (RAMOS, 2008). Esta cultura, por suas folhas serem lisas e grandes, torna-se sensíveis ao ataque de pragas, principalmente da *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), a qual apresenta alta taxa de alimentação durante o período larval, causando grandes prejuízos a cultura o que chega a provocar até 95% de perdas na produção (MEDEIROS et al, 2006)

Este estudo teve como objetivo verificar o tempo de persistência do *B. thuringiensis* em plantas de couve, a quantidade de bactéria presente nestas plantas após a inoculação na raiz, bem como determinar o efeito do *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Btk) usado de forma endofítica sobre *Plutella xylostella*.

Para lograr tais objetivos foram convalidadas as seguintes hipóteses de trabalho:

- **H1** – O *Bacillus thuringiensis* é absorvido em diferentes partes da planta de couve.
- **H2** – O *Bacillus thuringiensis* persiste na planta de couve.
- **H3** – O *Bacillus thuringiensis* aplicado na raiz da planta de couve mata a *P.xylostella*.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. A cultura da couve

A cultura da couve *Brassica oleracea* L. var. *acephala* apesar de ser originária da Europa tem sido amplamente cultivada nas regiões temperadas, tropicais e sub-tropicais (ELLIS e SINGH, 1993). No centro-sul do Brasil esta cultura tem desempenhando papel importante na agricultura (FIGUEIRA e LARA, 2004).

No que se refere as suas propriedades funcionais, a couve é muito rica em nutrientes, especialmente em minerais, cálcio, ferro, vitaminas A, C, K e B5, beta caroteno, possui elevada quantidade de antocianinas, fibras e apresenta baixo teor calórico (ROCHA, 2002), sendo assim considerada um dos alimentos importantes da nutrição humana.

Essas características nutricionais fazem com que a couve se destaque entre outras plantas hortícolas. Todavia, a sua produção tem sido prejudicada pelo ataque contínuo de pragas. Entre estas se destacam o pulgão (*Aphis gossypii*) e traça das crucíferas (*Plutella xylostella*). Esta última é considerada a principal praga não só da couve, como do repolho e de outras brássicas (TORRES, 2005).

1.2. A traça das crucíferas (TDC) *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae)

A traça das crucíferas (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) é considerada uma praga cosmopolita, encontrada nas mais diversas regiões do globo, independente das condições climáticas (MAU e KRESSING, 2007). Ela é provavelmente originária da Europa Mediterrânea e encontrada também na América do Sul, da África, na Europa, na Índia, no sudeste Asiático, na Nova Zelândia e na Austrália (HARDY, 1938 e KIMOTO, 1993).

A partir da Europa mediterrânea, este inseto foi acidentalmente disseminando também na América do Norte, notadamente em Illinois por volta

de 1854 e no oeste do Canadá em 1885 (HARCOURT, 1962). No Havaí, ele foi primeiramente relatado em 1892 (MAU e KRESSING, 2007).

1.2.1 Características biológicas da *Plutella xylostella*

A *P. xylostella* é a principal praga da cultura das crucíferas. Embora ela seja originária da região temperada, uma das características biológicas é que se desenvolve bem em temperaturas acima de 20°C (FERREIRA, 1983; KIMOTO, 1993). O comportamento fisiológico da *P. xylostella* depende de fatores como temperatura, fotoperíodo, umidade relativa e escassez de alimento (CREMA e CASTELO BRANCO, 2004).

A fêmea da *P. xylostella* deposita os seus ovos na parte inferior das folhas isolados ou em grupos de dois ou três. Esses ovos são muito pequenos de coloração esverdeada e arredondados (figura 1a). Após três ou quatro dias nascem as lagartas (figura 1b), que penetram no interior da folha passando a alimentar-se do parênquima. Em seguida elas abandonam a galeria e passam a alimentar-se da epiderme na parte inferior da folha. As lagartas atingem o máximo desenvolvimento com 8 a 10mm de comprimento, após 9 ou 10 dias da eclosão, a uma temperatura de 28°C, umidade relativa de 60% e fotoperíodo de 12h (MEDEIROS et al, 2003). Quando se transformam em pupas as lagartas tecem um pequeno casulo (figura 1c), facilmente reconhecido por ser constituído de pequenas malhas, na face inferior das folhas. Após cerca de quatro dias de pupa, o adulto emerge como um microlepidóptero (figura 1d). Nos machos à margem posterior das asas anteriores é branca e na posição de repouso apresenta uma mancha alongada característica sobre a face dorsal (MAU e KRESSING, 2007; BIOCONTROLE 2008).

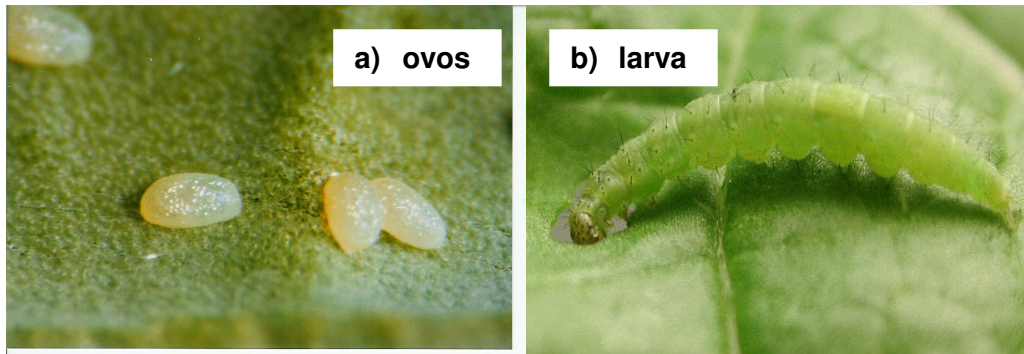
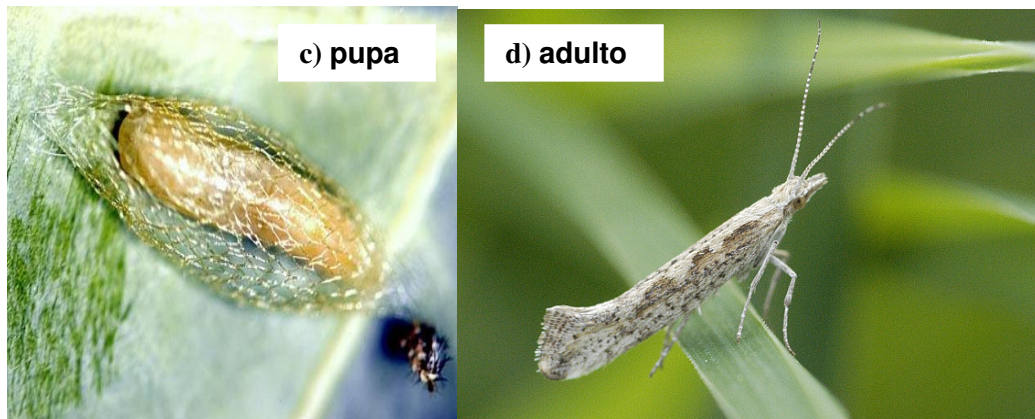


Figura 1- Várias fases de desenvolvimento da *P. xylostella*. a) Ovos; b) Larva; c) Pupa; d) Adulto.



1.2.2. *Plutella xylostella*: a principal praga da couve

Inúmeras pragas atacam a cultura da couve, tais como os pulgões, curuquerê-da-couve, traça-das-crucíferas, lagarta-rosca e lagarta-medepalmo (GALLO et al., 2002).

Segundo SILVA et al. (2003), existe uma relação direta entre o desenvolvimento fenológico da cultura e o aumento dos danos ocasionados pela *P. xylostella* que, por serem irreversíveis impõem a introdução de medidas de controle, que muitas vezes devem ser adotadas ainda no início da formação da planta.

A figura 2 mostra os danos causados na cultura de couve os quais podem ser de até 95% do total da cultura, que depende da região e da época de plantio (CZEPAK et al, 2005).



Figura 2 - Danos causados pela *P. xylostella* na cultura de couve
Fonte : http://www.biocontrole.com.br/pragas/praga.php?id=plutella_xylostella

1.2.3. Controle da praga

O controle químico é considerado a principal forma de controle de *P. xylostella* (VILLAS BÔAS et al., 2001; FRANÇA et al., 1985). A maioria dos inseticidas sintéticos tem ação semelhante em organismos alvos e não-alvos, representando um perigo para os insetos benéficos, para os animais selvagens e para o homem (CHEN et al. 1996).

De acordo com Torres et al. (2006) as aplicações de misturas excessivas de inseticidas feitas para controlar as pragas e evitar perdas econômicas da cultura de couve tem várias conseqüências, tais como a agressão do meio ambiente, a redução dos inimigos naturais da praga e principalmente a seleção de populações resistentes.

Georghiou e Lagunes-Tejeda (1991) relatam que o número de casos de artrópodos pragas resistentes tem crescido exponencialmente. Maia (2005) observa também que pelo menos 504 espécies desenvolveram

resistência em relação a diferentes grupos químicos, entre eles piretróides, carbamatos e fosforados.

O MIP (manejo integrado de pragas) tem como objetivo avaliar o problema causado pelas pragas de forma holística, buscando verificar a real necessidade de intervenções de controle dessas pragas através de critérios específicos e bem definidos, para evitar ou minimizar os impactos do uso irracional de inseticidas. Esta técnica pode assegurar o controle de pragas como a *P. xylostella* (CASTELO BRANCO et al., 2003). Para isso surge a necessidade do emprego de novos agentes como o controle biológico. Um deles é a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (MEDEIROS et al., 2005). O emprego desta bactéria tem sido feito há mais de 70 anos e têm proporcionado algumas vantagens, tais como o uso específico no inseto-alvo, o efeito não poluente ao meio ambiente, a inocuidade a mamíferos e vertebrados, assim como a ausência de toxicidade as plantas (MONNERAT e BRAVO, 2000; RAMOS, 2008).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Agricultura, os produtos à base de *B. thuringiensis* existentes no mercado são nove: Agree, Bac-Control PM, Bactur PM, Dipel, Dipel PM, Dipel GM, Ecotech Pro, Thuricide e Xentari. Estes produtos comerciais têm como princípio ativo os sorotipos de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* e são utilizados no controle de lagartas desfolhadoras como *P. xylostella*, *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja).

Assim como nos produtos químicos (piretróides, carbamatos e fosforados), pragas podem desenvolver resistência as proteínas expressas pelas plantas geneticamente modificadas e aos bioinseticidas. Desta forma, medidas para evitar ou retardar o desenvolvimento de resistência são imprescindíveis em um programa de Manejo Integrado de Pragas (VILLAS BOAS, 2001; SARFRAZ e KEDDIE, 2005).

No entanto, os produtos a base de *B. thuringiensis* foram utilizados durante muitos anos sem que o fator resistência fosse verificado. No passado, era esperado que os insetos não desenvolvessem resistência a *B. thuringiensis*, mas agora se sabe que isso não é verdade (RAMOS, 2008).

È importante destacar que o primeiro caso de resistência em condições de campo foi verificado em *P. xylostella* que apresentou altos níveis de resistência a inseticidas à base de *B. thuringiensis* (MOHAN e GUJAR, 2003). O mecanismo de resistência melhor caracterizado é a alteração dos receptores específicos no intestino médio dos insetos (FERRÉ e VAN RIE, 2002). E assim, Griffiths et al. (2001) estudando genes de resistência a *B. thuringiensis* concluíram que a resistência às toxinas se deve a perda de uma enzima denominada galactosiltransferase, que adiciona carboidratos a lipídios e proteínas. Estes carboidratos seriam o sítio de reconhecimento para as toxinas e sua ausência impediria que a toxina se una as células intestinais.

1.3. Controle biológico de pragas

O controle biológico pode ser definido como o controle de um microorganismo ou praga pela ação direta de outro microrganismo ou inseto antagônico, o qual pode ser controlado por meio de antibiose, parasitismo, competição, predação ou hipovivulência (COOK e BAKER, 1983; SCHWAN-ESTRADA, et al. 2000).

Grigoletti Júnior et al (2000) observam que o controle biológico objetiva manter, através de certas práticas, um equilíbrio no ecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos organismos não patogênicos do sistema.

Cruz et al. (1995) analisam também que o controle biológico pode ser visualizado de duas maneiras: uma delas é através da importação e liberação de inimigos naturais e a outra é pela manipulação dos inimigos já existentes.

Ainda de acordo com Cruz et al. (1995) as inovações nas técnicas de produção agrícola que contribuem de maneira expressiva para a melhoria da eficiência do controle biológico são: a utilização de nutrientes artificiais ou outros tipos de melhoramento no habitat, liberações em época correta, técnicas de preservação e uso de espécies ou raças mais efetivas.

Para Grigoletti Júnior et al. (2000) diferentemente do químico, o controle biológico não apresenta efeito imediato e total. Em geral, seu efeito

pode estar abaixo do necessário, sendo preciso integrar com outro método de controle. Assim estabelece-se o que se chama de controle biológico integrado.

No controle biológico de pragas, Beserra e Parra (2004) enfatiza que é importante que se faça a escolha adequada de uma espécie de inimigo natural a ser utilizada e selecionar uma espécie que seja eficiente ao controle da praga. Para tanto, são necessárias avaliações que devem envolver, principalmente, a preferência e a adequação hospedeira.

Um exemplo de controle biológico feito por microorganismos é mostrado por Silveira et al. (2002) e Falco e Silva-Filho, (2001). Eles salientam que a microbiota do solo exerce efeitos diretos e indiretos na produtividade e na qualidade dos produtos agrícolas. Os autores enfatizam que as populações microbianas naturais dos substratos de mudas desempenham funções similares às do solo, tais como: decomposição de resíduos orgânicos com a liberação de nutrientes e CO₂; produção de substâncias estimuladoras do crescimento vegetal; estabelecimento de simbiose mutualista com plantas e controle biológico de pragas e doenças.

Os estudos de Grigoletti Júnior et al. (2000) mostram que existem gêneros de bactérias antagonistas relevantes para o controle biológico como por exemplo, as *Pseudomonas cepacia* e os gêneros como *Bacillus* spp. e *Streptomyces* spp. assim como, os representantes da família *Enterobacteriace*. Tem destaque neste perfil, o *Bacillus thuringiensis*, que são utilizados como biopesticidas há mais de meio século e têm características menos impactantes ao meio ambiente do que os agroquímicos além de não serem prejudiciais ao ser humano (FALCO E SILVA-FILHO, 2001).

Apesar destas características positivas, os produtos a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) nunca ocuparam um lugar de ênfase no mercado de vendas de inseticidas, principalmente por problemas relacionados à perda de estabilidade, ao espectro limitado de ação e à degradação rápida pela ação da luz ultravioleta (NAVON, 2000).

A partir destas observações, pode-se deduzir que ainda existem algumas lacunas em termos de conhecimento e no sucesso pleno do controle

biológico, para um melhor entendimento sobre a ecologia do patógeno e do seu antagonista.

1.4. Características dos Microrganismos Endofíticos

O termo endófita foi usado pela primeira vez por Perotti, em 1926, em um trabalho pioneiro sobre interações de plantas-microrganismos, quando observou a presença de bactérias em tecidos corticais de raízes de plantas saudáveis (HALLMANN et al, 1997).

As bactérias endofíticas BE, de acordo com Kado (1992) são aquelas que residem dentro de tecidos vivos de plantas, sem causar prejuízos aparentes, tendo como benefício apenas sua proteção. Em 1940 foram publicados vários relatos sobre BE nativas em sementes, óvulos, tubérculos, raízes, caules, folhas e frutos (HALLMANN et al., 1997).

Nos últimos anos tem crescido o interesse sobre a ocorrência, o potencial de colonização e o uso dessas bactérias para promoção de crescimento e controle biológico de doenças de plantas (SHIOMI et al, 2006).

Para Mariano et al. (2004), a associação BE-planta consiste numa interação íntima, quando a planta fornece os nutrientes e habitat, enquanto a bactéria irá promover o crescimento e sanidade da planta. Neste sentido foram realizados vários estudos observando as características dos microrganismos endofíticos.

Na pesquisa de Shiomi et al (2006) foram selecionados isolados de bactérias endofíticas de folhas e ramos de cafeeiro com potencial para o controle biológico da ferrugem do cafeeiro. Nesta pesquisa, os isolados de bactérias endofíticas testados demonstraram eficácia na inibição da germinação no desenvolvimento da ferrugem, com valores acima de 50%. Os resultados verificaram que alguns isolados foram eficientes em controlar a ferrugem do cafeeiro.

Outro estudo desenvolvido por Demo (2006) utilizou o *Bacillus thuringiensis kurstaki* por via sistêmica como método para o controle *Spodoptera frugiperda*, que é uma das principais pragas do algodão. Neste

experimento foram inoculadas diferentes concentrações de Btk no solo, foi observada a sua recuperação das várias partes da planta, além de analisada a mortalidade da bactéria respeito a praga. Os resultados indicaram que houve traslocação do Btk na planta de algodão e que a mortalidade da praga variou de 15% a 80%.

Mcinroy e Kloepper (1995) ao estudarem a diversidade de bactérias endofíticas em associação com raízes e caules de milho e algodão no estado do Alabama, (EUA) obtiveram isolados de 36 gêneros dos quais 70,5% pertencentes a *Enterobacter*, *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Agrobacterium*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter* e *Pseudomonas*.

Nos experimentos de Misaghi e Donndelinger (1990) em plantas de algodão (*Gossypium hirsutum*) foram isolados seis espécies de bactérias, *Erwinia* sp., *Bacillus pumilus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus* sp., *Clavibacter* sp. e *Xanthomonas* sp., que não interferiam no crescimento da planta.

Para Hallmann et al. (1997), o grupo mais comum de bactérias endofíticas isoladas de tecidos vegetais é composto por *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*) e por *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*).

As endofíticas podem ser achadas em sementes, nas folhas, no rizosperma e no interior de diversos tecidos das plantas (VIDEIRA et al., 2007), o que mostra uma dinâmica das população de bactérias endofíticas. Essa dinâmica foi evidenciada por Mcinroy e Kloppe (1995) quando aplicaram bactérias nas sementes de milho e algodão e tentaram recuperá-las nas diversas partes das plantas. Com isso, observaram uma variação no número da população endofíticas presente nas plantas possivelmente devido a colonização diferencial dos tecidos.

Silva et al. (2006) revelam que a colonização das bactérias depende provavelmente das condições ambientais. Por exemplo, para *Alcaligenes faecalis*, que é uma endófita do arroz, estima-se que somente 10% do total da população que vive sobre a superfície da raiz penetram nos tecidos da planta.

Existem vários mecanismos que descrevem como as endófitas promovem o crescimento dos vegetais que as abrigam. Um desses é

evidenciado por Garberva et al. (2001), quando descrevem o isolamento de endófitas com capacidade de fixar nitrogênio e disponibilizá-lo nas plantas. Outro mecanismo é citado por Glick e Bashan (1997) quando descrevem a disponibilização de nutrientes, como a solubilização de fósforo, para a promoção de crescimento nas plantas.

Bizzarri e Bishop (2008) destacam os inúmeros efeitos benéficos que as bactérias endofíticas têm ao serem introduzidas como hospedeiras em plantas. Nesse momento, são adicionadas características às plantas que aguçam o crescimento e o bem-estar das mesmas, o que leva a usar estas bactérias como agente de controle. Para Melo e Faull (2004) apesar de devidamente comprovada a existência da microbiota endofítica, muitas pesquisas ainda deverão ser feitas sobre os aspectos ecológicos, genéticos e fisiológicos dessa interação. Antes disso, é interessante se conhecer a diversidade desses organismos, sua presença, frequência e funções.

Ainda segundo Melo e Faull (2004) existem uma série de razões para que se aprofundem os estudos com endofíticos. Primeiro, a falta de informações para elucidar a base biológica dessas interações e segundo, porque os endofíticos são vantajosos, pois muitos benefícios para a planta têm sido atribuídos a presença deles como:

- a) capacidade de produzir antibióticos e outros metabólicos secundários de interesse farmacológico;
- b) bioindicadores de vitalidade;
- c) controle biológico de pragas e doenças;
- d) bioherbicidas;
- e) biorremediação de solos contaminados com poluentes e
- f) vetores para introdução de genes em plantas hospedeiras.

Apesar de os vários estudos sobre os benefícios dos microrganismos endofíticos terem sido feitos separadamente, os resultados coincidentes encontrados nestes estudos consideram as inúmeras interações que existem

entre os endofíticos e as plantas hospedeiras. É provável que alguns isolados endofíticos promovam o crescimento das plantas exercendo mais de uma função ainda não completamente conhecida (SILVA et al., 2006).

1.5. *Bacillus thuringiensis* (Bt)

1.5.1. Aspectos biológicos

O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria Gram-positiva, da família *Bacillaceae* que apresenta duas fases principais durante seu ciclo de vida: uma de crescimento vegetativo, na qual a bactéria se multiplica por bipartição e outra de esporulação, que consiste na diferenciação da bactéria em esporos. Quando o esporo se encontra em um ambiente favorável ao seu crescimento, ou seja, meio com nutrientes necessários ao seu desenvolvimento e temperatura em torno de 28°C pode germinar e iniciar o crescimento vegetativo (MONNERAT e PRAÇA, 2006).

A atividade entomopatogênica desta bactéria acontece graças a presença de inclusões protéicas cristalinas produzidas durante a esporulação (MONNERAT e BRAVO, 2000). Ainda de acordo com Monnerat e Bravo (2000), outro aspecto importante nesse processo é a característica que o *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria de ocorrência cosmopolita, que é encontrado em todas as partes do mundo, nos vários substratos, tais como solo, água, superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados. Ela é uma bactéria aeróbica, que pode crescer facultativamente em anaerobiose, dentro da faixa de 10 a 40°C (BRAVO et al., 1998).

Nesse sentido, é importante considerar os alguns estudos recentes de Bizzarri e Bishop (2008) que enfatizam a possibilidade de propagação dos Bt a partir da proliferação das bactérias nos cadáveres dos insetos mortos e conseqüente depósito das mesmas no solo e absorção das raízes.

1.5.2. Histórico

Em 1901, o bacteriologista japonês Ishiwata isolou o *B. thuringiensis* de larvas do bicho da seda (*Bombix mori*, Lepidoptera) e a chamou de *Bacillus sotto*. Em 1911, Berliner isolou o bacilo da *Anagasta kuehmiella* (lagarta-da-traça-da-farinha) e o denominou *B. thuringiensis*, em homenagem a província de Thuringia (Alemanha), onde foi encontrado o primeiro inseto infectado (GLARE e O'CALLAGHAM, 2000).

Em 1915, Berliner mencionou a existência de um cristal nos esporos de *B. thuringiensis*, mas a atividade deste cristal só foi descoberta tempos depois (POLANCZYK e ALVES, 2003).

Burges (2001) cita que Hannay verificou em 1953 que a patogenicidade do Bt era determinada pelas inclusões protéicas formadas durante a fase de esporulação. A hipótese de Hannay foi validada por Angus em 1968.

O primeiro produto inseticida para a agricultura formulado e comercializado com os esporos de Bt foi desenvolvido na França a partir de 1938. Este produto se chamou Sporeine e foi usado para o controle das lagartas da traça da farinha (RAMOS, 2008).

Antes de 1976, o *B. thuringiensis* era usado exclusivamente no controle de insetos-pragas na agricultura. Mas a descoberta de um isolado patogênico a dípteros chamado *B. thuringiensis israelensis* (*Bti*) iniciou o uso dessa bactéria no controle de vetores de doenças. Desde então, estão sendo realizados inúmeros programas de seleção, visando ao isolamento de raças mosquitocidas (POLANCZYK et al, 2004).

1.5.3. Toxinas produzidas pelo *Bacillus thuringiensis*

1.5.3.1. α - exotoxina

Para Faust e Bulla Jr. (1982), a α -exotoxina é uma enzima também conhecida por fosfolipase C, lecitinase C ou fosfatidilcolina fosfohidrolase. De acordo com as características físico-químicas, esta enzima é uma toxina

termolábil, solúvel em água, altamente tóxica a alguns insetos, quando administrada via oral ou intra-hemocélica. Ela é também tóxica a ratos e outros vertebrados, pois causa degeneração e lise de hemócitos (MONNERAT e PRAÇA, 2006; KRIEG, 1971).

De acordo com Faust e Bulla Jr. (1982), a toxicidade a vertebrados se deve ao fato de dela apresentar uma função enzimática citolítica quando atua sobre os fosfolipídios que formam as membranas de diversos tipos celulares. Todavia, para que isso ocorra precisa ser ministrada em altas doses.

Esta toxina é encontrada no sobrenadante de algumas culturas, durante a fase logarítmica de crescimento de certas estirpes de *B. thuringiensis* (PRAÇA et al, 2004)

1.5.3.2. β - exotoxina

A denominação β – exotoxina foi sugerida em 1967 por Heimpel. Esta toxina é também chamada de thuringiensina (FARKAS et al., 1977). Ela é termoestável e altamente tóxica para muitos insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Himenoptera, Isoptera e Ortoptera e até para certos vertebrados (HABIB e ANDRADE, 1998). A β - exotoxina é produzida durante o crescimento vegetativo do *B. thuringiensis*.

A toxina do tipo I é um análogo do ATP e é composta de adenina, ribose, glicose e ácido fosfoalárico, com massa molecular de 701 daltons (FARKAS et al., 1969). Essa toxina atua inibindo a ação da RNA polimerase por competição pelo ATP e é altamente tóxica para várias ordens de insetos, como: ácaros, e também nematóides, e vertebrados, causando efeitos teratogênicos e mutagênicos (SEBESTA et al., 1981). Assim, a partir de 1970, os produtos comerciais de *B. thuringiensis* à base de estirpes que apresentaram β - exotoxinas do tipo I foram substituídos por outros à base de linhagens não produtoras de β -exotoxina (MONNERAT e PRAÇA, 2006)

A β -exotoxina do tipo II apresenta toxicidade superior à toxina do tipo I, principalmente, para coleópteros da espécie *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) (LEVINSON et al., 1990). Segundo esses

autores, os genes responsáveis pela síntese de β - exotoxina estão localizados em plasmídeos de 75 ou 110 kda.

1.5.3.3. Vip 3A

A toxina Vip 3A são proteotoxinas que receberam o nome de “Vips” do inglês “vegetative insecticidal proteins”. Esta é uma nova classe de proteínas que foi identificada em 1997, encontrada no sobrenadante de culturas de certas estirpes de *B. thuringiensis* nas fases logarítmica de crescimento e de esporulação (BRAVO et al., 1998, MONNERAT e BRAVO, 2000).

As Vips são produzidas em etapas iniciais do processo de crescimento das bactérias, antecipando assim, sua obtenção (MONNERAT e BRAVO, 2000). Essa foi uma descoberta importante, pois atualmente, se pode aproveitar a mistura de esporos e cristais obtida após o cultivo de *B. thuringiensis* e o seu sobrenadante (SOBERÓN e BRAVO, 1994).

Esta toxina tem uma massa molecular de 88,5 kDa, que apesar de não apresentar homologia com as proteínas Cry e Cyt, tem atividade contra insetos pouco sensíveis a maioria das δ -endotoxinas, como *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1767), (Lepidoptera: Noctuidae); *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) (BRAVO et al., 1998; MONNERAT E BRAVO, 2000).

Para Loguercio et al., (2002) este grupo de toxinas tem demonstrado ação sobre um espectro maior de espécies de insetos-praga quando comparados a muitas δ -endotoxinas (proteínas Cry), mas principalmente contra larvas de lepidópteros.

A forma de ação específica das toxinas Vip é similar à das toxinas Cry, pois causa a destruição da função digestiva dos insetos-alvo, apesar dos tipos de receptores de membrana das células do intestino médio parecerem ser de natureza distinta (YU et al., 1997).

1.5.3.4. δ - endotoxinas

As δ -endotoxinas são chamadas também como Cry e Cyt e são o principal componente inseticida das formulações atuais de *B. thuringiensis*. Sua constituição é glicoprotéica, representando normalmente 20-30% do peso seco das células esporuladas (BENINTENDE e MÁRQUEZ, 1996) e são usadas como inseticidas biológicos com bons resultados.

De acordo com Valadares-Inglis et al, (1998) estas toxinas têm ação extremamente tóxica para larvas de insetos das ordens: Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Himenoptera, Homoptera e Orthoptera. Também foi relatada toxicidade para algumas espécies das ordens Nematoda, Protozoa e Acari. As proteínas Cry (ou cristais protéicos) individualmente apresentam um espectro de ação, normalmente restrito a uma Ordem de insetos em particular (DE MAAGD, 2000).

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

De acordo com Ramos (2008) as etapas da esporulação e biogênese do cristal seguem os passos listados abaixo:

- A célula para seu crescimento e sua parede celular se modifica;
- O septo de esporulação é formado, e a cromatina é dividida em duas partes. Começa, nesse momento, a aparição de uma estrutura condensada que é o cristal;
- Formação do pré-esporo;
- Crescimento do esporo e formação do cristal;
- Formação do envelope esporal em torno do esporo. O cristal fora desse envelope continua seu crescimento;
- Maturação do esporo, o cristal atinge seu tamanho máximo;
- Ruptura da célula e liberação do cristal e do esporo.

As toxinas que são codificadas por genes *cry* e a toxicidade das proteínas que por elas são codificadas está ligada a região N-terminal das cadeias polipeptídicas, enquanto que a forma e a estrutura do cristal são determinadas pela porção C-terminal (POLANCZYK et al, 2004). Estas proteínas apresentam peso molecular variando de 65 a 138 kDa (ALVES, 1998). Os genes *cry* podem estar localizados tanto no cromossomo como em grandes plasmídios (40–200 MDa) ou em ambos.

Várias iniciativas para a classificação dessas proteínas foram propostas. A primeira delas foi feita por De Barjac e Bonnefoi, em 1962, que se embasaram em propriedades bioquímicas e na sorotipagem fundamentada na aglutinação de antígenos flagelares (antígeno H) das células vegetativas, que apresenta um caráter específico e estável, facilitando a diferenciação entre as várias estirpes e proporcionando uma ordenação aos isolados de *B. thuringiensis*, que passaram a ser agrupados em subespécies.

Crickmore et al., (2007) enfatiza que um comitê internacional, em 1994, sugeriu uma nomenclatura baseada apenas nas seqüências de aminoácidos. Essas proteínas são codificadas por mais de 400 genes *cry* já seqüenciados e as proteínas Cry estão classificadas em 53 grupos Cry e diferentes subgrupos, além de dois grupos de toxinas Cyt, em função do grau de similaridade de seus aminoácidos. Por exemplo, as toxinas da família Cry1 têm 42 subgrupos representados por Cry1Aa,..., Cry1La. Algumas destas proteínas são ativas contra insetos da Ordem Lepidoptera (CRICKMORE et al., 2007).

1.5.3.5. Modo de ação das δ - endotoxina

De Maagd et al., (2001) descrevem o modo de ação de *B. thuringiensis* da seguinte forma:

Depois da ingestão pelo inseto, o cristal se solubiliza no suco intestinal pelo pH alcalino, originando as protoxinas. Na presença de enzimas digestivas estas são convertidas em δ -endotoxinas. As toxinas hidrolizadas cruzam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos na

membrana apical das células colunares do intestino médio, interferindo no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana, o que leva à formação de poros que aumentam a permeabilidade da mesma. O aumento na absorção de água causa divisão celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio. O inseto também pode morrer por inanição pouco tempo após a infecção, pois pára de se alimentar. Essa descrição é mostrada na figura 3.

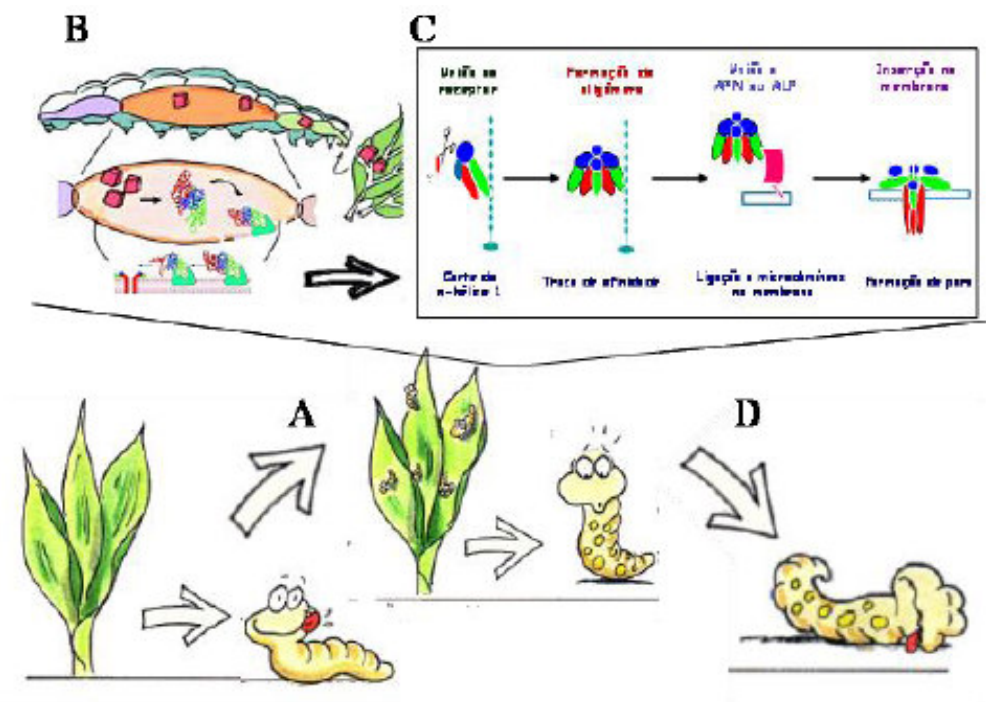


Figura 3 – Mecanismo de ação da toxina Cry. A – O inseto ingere a proteína cristal; B – no intestino médio da larva os cristais são solubilizados e ativados em proteínas monoméricas que se ligam ao receptor Caderina. C – Esta ligação resulta na ativação de vias de sinalização intracelulares reguladas por fosfatases (P). Após ligação ao receptor Caderina, monômeros da toxina são processados e formam oligômeros que se ligam a proteínas ancoradas a GPI (ALP ou APN) que estão em plataformas de lipídeos, a presença desta toxina em plataformas de lipídeos possui efeito duplo, induzindo a inserção da toxina na membrana, formando poros e ativando vias de sinalização intracelular que podem ativar respostas apoptóticas e choque osmótico induzidos pela formação do poro, contribuindo para a morte celular; D – levando o inseto à morte (PRAÇA et al., 2007).

Além da patogenicidade e virulência de *Bacillus thuringiensis* contra insetos-praga, outros aspectos como os efeitos subletais sobre os indivíduos sobreviventes, embora difíceis de detectar, ocorrem e representam um importante parâmetro, que auxilia na sua atividade tóxica (POLANCZYK et al, 2004).

1.5.4. Importância comercial

Na década de 50 os inseticidas biológicos à base de *B. thuringiensis* passaram a ser fabricados na Rússia, na Checoslováquia, na Alemanha e nos Estados Unidos. Inicialmente, o produto era utilizado somente para o controle de lepidópteros. A partir dos anos 1970 novas subespécies da bactéria se mostraram eficientes também contra insetos da Ordem Diptera, Coleoptera (EDWARDS et al., 1988) e Himenoptera, Homoptera e Ortoptera (FEITELSON, 1994). Também foi relatada a toxicidade do Bt para algumas espécies de nematóides, protozoários e ácaros (EDWARDS et al., 1988; FEITELSON, 1994). Atualmente, estima-se que existam mais de 50.000 estirpes de *Bacillus spp.* em coleções espalhadas pelo mundo (MONNERAT et al., 2001).

De acordo com Cerón (2004) existem cerca de 60 produtos que utilizam o Bt como princípio ativo. Os inseticidas biológicos com base de *Bacillus thuringiensis* presentes no mercado podem chegar a 2% e o valor estimado de venda de cerca de 100 bilhões de dólares anuais. Segundo Nester et al (2002), os produtos à base de Bt têm características vantajosas no uso, pois têm boa estabilidade e são facilmente armazenados sem restrições de local.

Os bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* se classificam em produtos de primeira geração (esporos e cristais), segunda geração (esporos e toxinas de estirpes com introdução de genes de δ -endotoxina de outra estirpe), terceira geração (bactérias recombinantes mortas especialmente *Pseudomonas fluorescens*) e quarta geração (quimeras de proteínas) (CERÓN, 2004).

Buitrago (2004) menciona que a produção do bioinseticida começa com a caracterização da estirpe. A técnica de produção pode ser realizada com fermentação semisólida ou fermentação submersa, que é o método de seleção onde o processo transcorre entre 27 e 35°C a um pH de 6.8 a 7.2 sob uma regulação de nutrientes, cinética e transferência de oxigênio adequada para uma boa recuperação de biomassa e proteínas inseticidas para sua posterior formulação.

Segundo Cerón (2004) muitos microrganismos quando cultivados em grande escala e de forma sucessiva podem perder ou reduzir sua capacidade patogênica, diminuir a eficiência e a credibilidade do controle, além do método de aplicação do controle. Os fatores, principalmente neste último caso, edafo-climáticos também têm sido limitantes, pois os antagonistas sofrem variações, não acentuando todo o seu potencial quando as condições se afastam do ótimo.

Cerón (2004) reconhece os problemas que surgem com o uso dos inseticidas biológicos. Primeiro, o efeito lento com a morte do inseto de 24 a 48 horas após a aplicação. Segundo, pouca persistência em campo por causa da sensibilidade do produto dos raios solares UV e as altas temperaturas. Por fim, a especificidade dos insetos sujeitos aos bioinseticidas que determina uma margem estreita de ação e as formulações existentes não protegem as partes internas das plantas e as raízes.

Já para Turner et al. (1991) estes problemas que são em parte resolvidos nos inseticidas biológicos de segunda e terceira geração, que usam estirpes recombinantes que expressão mais de um gene *cry*.

Numa outra direção, Demo (2006) realizou experimentos com a aplicação de Bt por via sistêmica em plantas de algodão para o controle da *Spodoptera frugiperda* com resultados satisfatórios. Todavia, se observou que ainda não foi desenvolvida uma formulação para o uso desta nova técnica de aplicação do bioinseticida à base de Bt.

Desse modo, pode-se deduzir que o controle biológico é mais específico que o químico e no caso do uso do *Bacillus thuringiensis* não existem limitações. Pois foi observado por Ramos (2008) a ausência de mortalidade e de quaisquer sintomas de intoxicação, tanto em peixes como em caramujos.

1.5.5. Transgênicos

A história das ciências da vida mostra que a modificação genética de plantas por meio das técnicas de biotecnológicas é uma prática que se

consolida, no século XXI, com a técnica de transgenia de plantas (REIS, 2001).

A palavra transgênico indica transformação, modificação ou alteração da carga genética (animal ou vegetal) por meio de técnicas genéticas específicas (FIORATI, et al 2003).

Esta técnica que pode contribuir de forma significativa para o melhoramento genético de plantas, possibilita a produção de alimentos, fibras e óleos, como também a fabricação de fármacos e outros produtos industriais (NODARI e GUERRA, 2003).

A transgenia possibilita a introdução dos genes de *Bt* codificadores das toxinas nos genomas dos vegetais, permitindo a expressão contínua das proteínas em todos os tecidos da planta e atingindo, assim, apenas os insetos-praga que se alimentam do tecido. A primeira geração de plantas transgênicas resistentes a insetos, foi desenvolvida exatamente com o uso de genes codificadores de proteínas inseticidas do entomopatógeno *Bt* (BOBROWSKI et al.,2003).

Atualmente, culturas como soja, milho, algodão, batata e fumo têm sido modificadas geneticamente, para expressar as proteínas derivadas de *Bacillus thuringiensis* Berliner e são utilizadas em escala comercial em vários países. Sua produção ocupa uma área aproximada de 102 milhões de hectares (JAMES, 2006).

Na figura 4 é explicado o mecanismo de ação das plantas transgênicas.

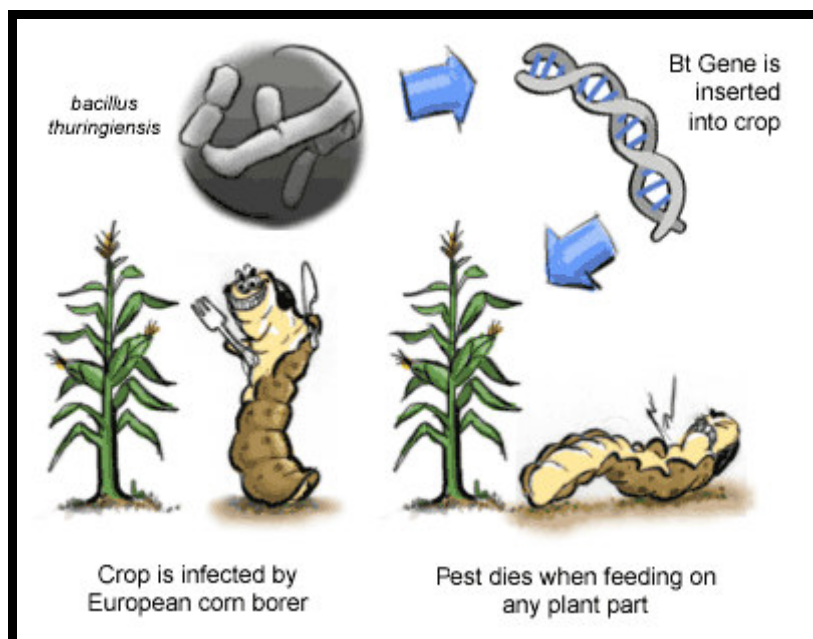


Figura 4 Mecanismo de ação das plantas transgênicas.
 Fonte: www.scq.ubc.ca/quarterly023/GM-crop.gif

A taxa de crescimento anual da área plantada com cultivos transgênicos entre 1996 e 2003 conforme Silveira et al (2005) foi de 46,42%. Essa expansão ocorreu devido a grande participação dos Estados Unidos e também nos países em desenvolvimento, com destaque para a Argentina, que apresentou no mesmo período uma taxa de crescimento geométrico anual de 80%. Atualmente, os cultivos organismos geneticamente modificados (OGM) estão presentes em 18 países, os quais têm grande peso na economia regional e mundial. Os dez principais produtores de cultivos OGM em 2003 tinham população de aproximadamente 3 bilhões de pessoas e um PIB de US\$ 13 trilhões, quase a metade dos US\$ 30 trilhões do PIB mundial. Com exceção dos Estados Unidos, estão entre os países produtores de cultivos GM os três países mais populosos da Ásia (China, Índia e Indonésia), as três maiores economias da América Latina (Brasil, México e Argentina) e, na a África do Sul, na África (CARPENTIERI-PÍPOLO et al., 2005).

1.6. O uso do *Green flurescent protein* (GFP) como marcador

A bioluminescência é um fenômeno natural observado em diversas espécies de organismos terrestres e marinhos. No ambiente terrestre, o

vagalume é o representante mais conhecido deste fenômeno. Enquanto as espécies aquáticas, presentes nos oceanos usam a bioluminescência para outros fins como: afastar os predadores, como camuflagem, mimetizar outras espécies, atrair suas presas e seus parceiros no período reprodutivo, bem como fonte de alternativa de energia (CHIARINI, 2002).

A proteína verde fluorescente na forma selvagem (GFP) extraída da *Aequorea victoria*, tem como característica a produção de uma luz verde brilhante fluorescente quando estimulada com a luz ultravioleta (UV) (WARD, 1998).

A história da GFP começa no Japão do pós-guerra, em 1962, quando Osamu Shimomura recebeu uma incumbência de investigar o que fazia brilhar na água um pequeno crustáceo chamado Cypridina (KALIL et al, 2002). O cromóforo foi identificado em 1979, pelo mesmo pesquisador que observou uma cor verde quando irradiado com radiação UV.

Em 1994, Chalfie et al. descreveram no laboratório a proteína verde fluorescente GFP (*green fluorescent protein*), como um importante marcador para a transferência e expressão gênica em diversos organismos. Essa proteína, quando excitada por meio de luz ultra-violeta (395-470nm), emite uma fluorescência verde (509nm) facilmente monitorada sem a necessidade de co-fatores, substratos ou marcações adicionais. Assim, a expressão da proteína GFP pode ser detectada de forma direta e simples com o uso de citometria de fluxo de fluorescence- *activated cell sorting* (FACS) e microscopia de fluorescência (CHENG et al, 1997).

Gubin et al (1997) salienta que, ao contrário de outras moléculas fluorescentes, a GFP têm níveis de toxicidade baixos e podem ser utilizadas em células vivas. Estas propriedades da GFP revolucionaram a microscopia de fluorescência nos campos da bioquímica e biologia celular.

A GFP funciona como um identificador que pode ser ligada a outras proteínas e são detectadas facilmente a presença destas, em células ou organismos com o uso de um microscópio de fluorescência. Assim, passou a ser possível determinar a concentração e a localização em células vivas, de quaisquer proteínas de interesse que estão ligadas a GFP (FERNANDES, 2008).

A fluorescência é muito estável quando estudada em fluorímetro. Porém quando estudada em microscópio ótico, onde há maior intensidade de iluminação, apresenta fotobranqueamento. Este fenômeno ocorre quando a GFP é iluminada próximo ao pico máximo de excitação ao comprimento de onda entre 340-390 nm ou 395-440 nm (CHALFIE et al., 1994).

A GFP mantém a fluorescência entre o pH de 5,5 e 12. Entretanto a fluorescência decresce em valores de pH inferiores a 5,5 e superiores a 12, sendo o pH ótimo igual a 8,0 (CHIARINI, 2002). O ponto isoelétrico da GFP está situado entre os valores de pH 4,6 e 5,4. A adição de β -mercaptoetanol e a manutenção do pH em 8,0 aumentam a estabilidade da proteína (WARD, 1998 E CHALFIE, 1994).

No caso específico desta pesquisa, a GFP é usada como um instrumento para visualizar e evidenciar de modo específico a localização da colonização no sistema de raízes e nas demais partes da planta. Nessa perspectiva, uso do GFP e outros marcadores com fluorescência, pode ser uma ferramenta útil para observar a colonização a partir do reconhecimento e visualização de microrganismos em plantas. Fato esse observado por Gilbertson (2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, J. L. Engenharia Genética aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.

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

ALTIERI, M.A. Os **mitos da biotecnologia agrícola: algumas questões éticas**. *O Interior*, Porto Alegre, v.25, n.893, p.14-15, 1999.

ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.

BESERRA, E. B.; PARRA, J. R. P. Biologia e parasitismo de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner e *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera, Trichogrammatidae) em ovos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae). *Rev. Bras. Entomol.*, Mar. 2004, vol.48, no.1, p.119-126. ISSN 0085-5626.

BENINTENDE, G.; MARQUEZ, A. Bactérias Entomopatógenas. In: LECUONA, R. E. **Microrganismos Patógenos Empleados em el Control Microbiano de Insectos Plaga**. Talleres Gráficos Mariano Mas, México, Buenos Aires, cap. 4, 1996, p. 207-222.

BIOCONTROLE. *Plutella xylostella*. Disponível em: http://www.biocontrole.com.br/pragas/praga.php?id=plutella_xylostella. Acesso em 07/02/2008.

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*. *Microb Ecol* v. 56, 2008, p. 133–139

BOBROWSKI, V.L.; FIUZA, L.M.; PASQUALI, G. BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, set-out, 2003.

BUITRAGO, G. **La producción de ingredientes activos con *Bacillus thuringiensis*. En *Bacillus thuringiensis* en el control biológico.** BRAVO, A. Y CERÓN, J. eds. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 233-273. 2004.

BURGES, H.D. *Bacillus thuringiensis* in Pest Control. **Horticulture Research International**, June, 2001. Disponível em: <http://www.rsc.org/ej/PO/2001/B104591C.PDF>. acesso em: 20 de janeiro de 2009

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F.J.; GUADALUPE, P. NUNEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of Cry Genes in Mexican *Bacillus Thuringiensis* Strain Collection. **Applied Environmental Microbiology**, 4965-4972. 1998.

CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; GASTALDI, L. F.; PÍPOLO, A. E. **Correlações fenotípicas entre caracteres quantitativos em soja.** Seminário: Ciências Agrárias, Londrina, v. 26, n. 1, p. 11-16, jan./mar. 2005

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

CAVALLI, S. B. Segurança alimentar: a abordagem dos alimentos transgênicos. **Revista Nutrição**, Campinas, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141552732001000400007&lng=&nrm=iso>. Acesso em: 22 de outubro de 2008.

CERÓN, J. **Productos comerciales: nativos y recombinantes. En *Bacillus thuringiensis* en el control biológico.** Bravo, A. y Cerón, J. eds. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 2004. p. 123-147.

CHALFIE M.; Tu Y. EUSKIRCHEN G; WARD W; PRASHER D. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, 1994; 263:802-5.

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

CHENG L.; DU C.; MURRAY D. A GFP reporter system to assess gene transfer and expression in human hematopoietic progenitor cells. **Gene Ther.** 1997; 4: 1013-22.

CHIARINI,E. Comparação entre os métodos físicos e químicos de permeação e de extração da proteína verde florescente (GFP uv) de culturas de *Escherichia coli* DH5- α . **Dissertação de mestrado.** Universidade de São Paulo. Faculdade de ciências farmacêuticas. São Paulo, 2002.

COOK, R.G.; BAKER, K.F. **The Nature and Practice of Biological Control of Plants Pathogens.** St. Paul: APS,Press, 1983. P. 539.

CREMA, A.; CASTELO BRANCO, M. Impacto da temperatura e fotoperíodo no desenvolvimento ovariano e oviposição de traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.305-308, abril-junho 2004.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D.H. 2007. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature.** Disponível em: http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/ acesso em: 10 de dez.de 2008.

CRUZ, I.; WAQUIL, J.M.; VIANA, P.A. **Pragas: Diagnose e Controle.** ARQUIVO DO AGRÔNOMO 2ª ed., nº 2, Setembro, 1995. Disponível em: [http://www.potafos.org/ppiweb/brazil.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/d5fbc829a2f54298832569f8004695c5/\\$FILE/Milho10-14.pdf](http://www.potafos.org/ppiweb/brazil.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/d5fbc829a2f54298832569f8004695c5/$FILE/Milho10-14.pdf). Acesso em: 22 de outubro de 2008.

CZEPAK, C. ;FERNANDES, P.M. ;SANTANA, H.G. TAKATSUKA, F.S.; ROCHA, C.L.. Eficiência de Inseticidas para o Controle de *Plutella xylostella* (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) na Cultura do Repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*). Comunicação científica. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.35, n, 2, 2005, p. 129-131.

DE BARJAC, H.; BONNEFOI, A. Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*. **Entomophaga**, v.7, n.1, 1962. p. 5-31

DE MAAGD, P.H. **Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment**. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.23-40.

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

DEMO, C. Utilização Sistêmica de *Bacillus thuringiensis* Para o Controle de *Spodoptera frugiperda* na Cultura do Algodão. Brasília. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2006, 56p. **Dissertação de mestrado**.

DIAS, J. M. C. S. Produção e Utilização de Bioinseticidas Bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 27, n. 1. p. 59-76, 1992.

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

ELLIS, P.R.; SINGH, R. A review of the host plant of the cabbage aphid, *Brevycorine brassicae* (L.) (Homóptera: Aphididae). **International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants: West Palaearctic Regional Section Bulletin**, Darmstadt, v. 16, n. 5, p. 192-201, 1993.

FAUST, R.M.; BULLA JR., A.L. **Bacterial and their toxins as insecticides**. In: KURSTAKI, E. (Ed.). **Microbial and viral pesticides**. New York: Marcel Dekker, 1982. p. 75-206

FARKAS, J.; SEBESTA, K.; HORSKA, K.; SAMEK, Z.; DOLEJS, S.; SORM, F. The structure of exotoxins of *Bacillus thuringiensis*. **Coll. Czech Chem. Commun.** V. 42: 1977. p. 909-929.

FARKAS, J.; SEBESTA, K.; HORSKA, K.; SAMEK, Z.; DOLIJS, J.; SORM, F. The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 34, 1969. p. 1118-1120.

FALCO M.C.; SILVA-FILHO M.C Plantas transgênicas no melhoramento. In: **Recursos Genéticos e Melhoramento- Plantas**, NASS, L. et al, Rondonópolis, Fundação MT, 2001. p.1011-1056.

FEITELSON, J. S. NOVEL PESTICIDAL DELTA-ENDOTOXINS FROM *BACILLUS THURINGIENSIS*. IN: **Proceedings of XXVII Annual Meeting Of The Society For Invertebrate Pathology**, p.184. MONTPELLIER, FRANCE, 1994.

FERNANDES, M. X., Como brilha a proteína verde fluorescente. **Revista cienciahoje**. Disponível em: <http://cienciahoje.pt/index.php?oid=28008&op=all> Acesso em: 19 de novembro de 2008.

FERREIRA, F. A. Efeito do clima sobre brássicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 9, n. 98, 1983. p.54-56.

FERRÉ, J, VAN RIE, J .BIOCHEMISTRY AND GENETICS OF INSECT RESISTANCE TO *BACILLUS THURINGIENSIS* **Annual Review of Entomology**, January, Vol. 47, 2002. p. 501-533

FIGUEIRA. L.K., LARA F.M. Relação predador: presa de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Crysopidae) para controle do pulgão-verde em genótipos de sorgo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.33 n4, p. 447-450, 2004.

FIORATI, D, GARCIA, F.; COLOMBO, G.; NONOSE, J.; OSAKU, L., DALOSE, M.; NONOSE R; PINHEIRO, R.; GIOVANINI, T.; FEITOZA, L.; COLLET, T., GASPAR, V., GIANOTTO, D. **Alimentos transgênicos**. 2003, disponível em: www.dbi.uem.br/transgenicos.pdf, acesso em: 12 de dezembro de 2008.

FRANÇA, F.H.; CORDEIRO, C.M.T.; GIORDANO, L.B.; RESENDE, A.M. Controle da traça-das-crucíferas em repolho. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 3, n. 2, 1985. p. 47-53.

GALLO, D; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.;

MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, S. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GARBEVA, P.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN VUURDEN, J.W.L.; VAN ELSAS, J.D. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGE) of 16S rDNA based PCR fragments. **Microbial Ecology**, v.41, 2001. p.369-383.

GEORGHIOU, G. P.; LAGUNES-TEJEDA, A. **The occurrence of resistance to pesticides in arthropods**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. 1991.

GILBERTSON, A. W. Transport and survival of GFP-tagged root-colonizing microbes: Implications for rhizodegradation. **European Journal of Soil Biology**. v. 43, 2007. p. 224-232. Disponível em: <http://www.elsevier.com/locate/ejsobi> acesso em: 22 de agosto de 2008

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAM, M. **Bacillus thuringiensis**: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley, 2000.

GLICK, B.R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, v.15, n.2, p.353-378, 1997.

GRIFFITTS, J. S., J. L. WHITACRE, D. E. STEVENS, AND R. V. AROIAN. **Bt Toxin Resistance from Loss of a Putative Carbohydrate-Modifying Enzyme**. *Science* 3 August 2001; 293: 2001.860-864

GRIGOLETTI JÚNIOR, A; SANTOS, A. F.; AUER, S. C. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**, v.30, n.1/2, 2000. p.155-165,

GUBIN, AN; REDDY, B, NJOROGÉ, JM, MILLER, JL. Long-term, stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun** 1997; 236: 347-50.

HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS. IN: **Controle Microbiano de Insetos**. Editado Por S.B. Alves. 2. Ed. Fealq, Piracicaba, 1998. p. 383-446.

HARCOURT, D. G. Biology of cabbage caterpillars in Eastern Ontario. Proc. Entomol. **Soc. Ont.** 1962. 93:61-75.

HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOPPER, J.W., Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology** 43, 1997. p. 859–914.

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

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

JAMES, C. **Global review of commercialized transgenic crops: ISAAA** (Briefs, 36: Preview). Ithaca: ISAAA, 2006. 20p.

KADO, C.I. Plant pathogenic bacteria. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. (Ed.). **The Prokaryotes**. New York: Springer-Verlag, 1992. p.660-662.

KALIL, R. A. K.; TEIXEIRA, L. A. K., MASTALIR, E. T.; MORENO, P., FRICKE, C. H.; NARDI, N. B. **Modelo Experimental de Transfecção Gênica em Miocárdio Normal de Cães. Perspectivas de Terapia Gênica para o Tratamento da Cardiopatia Isquêmica.** Arq Bras Cardiol, Porto Alegre, v. 79, nº 3, 2002. p. 223-7,

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

KRIEG, A. Is the potential pathogenicity of bacilli for insects related to production of alpha-exotoxin? **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 18, 1971.p 425-426,

LEVINSON, B.L.; KASYAN, K.K.J; CHIU,S.S; CURRIER,S.; GONZÁLEZ JR.J.M. Identification of b-exotoxin production, plasmids encoding bexotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using highperformance liquid

chromatography. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.172, 1990. p. 3172-3179,

LOGUERCIO, L.L.; BARRETO, M.R.; ROCHA, T.L.; SANTOS, C.G.; TEIXEIRA, F.F.; PAIVA, E. Combined Analysis of Supernatant-Based Feeding Bioassays and Pcr as a First-Tier Screening Strategy for Vip-Derived Activities in *Bacillus thuringiensis* Strains Effective Against Tropical Fall Armyworm. **Journal of Applied Microbiology**, 2002.

MAIA, A, H, N. **Definindo Estratégias de Manejo da Resistência de Pragas a Toxinas Bt Expressas em Culturas Transgênicas: o Papel dos Modelos de Simulação**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, fev. 2005.

MARIANO R. L. R, SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. A. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. Anais... da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, Recife, vol. 1, 2004. p.89-111.

MAU, R. F.L.; KESSING, J. L.M. *Plutella xylostella* (Linnaeus): *Diamondback Moth*. **Crop Knowledge Masters**. April 2007. Disponível em: <http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/Crop/Type/plutella.htm>. Acesso em: 14 de outubro de 2008.

McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.895-901, 1995.

MEDEIROS, C. A. M., DIAS, J.M.C.S.; MONNERAT, R.G.; SOUZA, N R. Instalação e Manutenção de Criação Massal da Traça-das Crucíferas (*Plutella xylostella*). **Circular Técnica 29**. Brasília, Out. 2003.

MEDEIROS, C. A. M.; BOIÇA JUNIOR, A. L.; TORRES, A. L. Efeito de Extratos Aquosos de Plantas na Oviposição da Traça-Das-Crucíferas, em Couve. **Fitosanidade**. Bragantia, Campinas, v.64, n.2, 2005. p.227-232.

MEDEIROS, P. T; SONE, E. H; SOARES, C. M. S et al. Avaliação de produtos à base de *Bacillus thuringiensis* no controle da traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**., April/June, vol.24, no.2, 2006. p.245-248. ISSN 0102-0536.

MELO, I. S de; FAULL, J. L.. Scanning electron microscopy of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a biocontrol agent of witches' broom disease of cocoa. **Braz. J. Microbiol.**, v. 35, n. 4, 2004. p. 330-332.

MISAGHI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, v.80, p.808-811, 1990.

MONNERAT, R.G.; PRAÇA, L.B. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. In: OLIVEIRA-FILHO, E.C. e MONNERAT, R.G. **Fundamentos para a Regulação de Semioquímicos, Inimigos Naturais e Agentes Microbiológicos de Controle de Pragas**. Planaltina-DF; Embrapa Cerrados, 2006.p. 352.

MONNERAT, R.G.; SANTOS, R.; BARROS, P.; BATISTA, A.; BERRY, C. Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão. **Comunicado técnico 98**, outubro 2003.

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

MONNERAT, R; BRAVO A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO IS, AZEVEDO JL, (eds). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2000. p. 163.

MOREIRA, R. J. Críticas ambientalistas à Revolução Verde. X World Congress of Rural Sociology – IRSA e no XXXVII Brazilian Congress of Rural Economic and Sociology – Sober, **Workshop** n. 38. Greening of agriculture. Rio de Janeiro, 2000.

MOHAN, M.; GUJAR, G.T. **Local variation in susceptibility of the diamondback moth *Plutella xylostella* (Linnaeus) to insecticides and role of detoxification enzymes**. Crop Prot. 22, 495–504. 2003.

NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection. reality and prospects. **Crop Protection**, Oxford, v.19, 2000. p.669-676.

NESTER, E.; THOMASHOW, L.S.; METZ, M.; GORDON, M. **100 years of *Bacillus thuringiensis*: A critical Scientific Assessment**. 2002. Disponível em: <http://www.asmus.org>, acesso em 19 de novembro de 2008

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Plantas transgênicas e seus produtos: impactos, riscos e segurança alimentar (Biossegurança de plantas transgênicas). **Rev. Nutr.**, v. 16, n. 1, 2003. p. 105-116.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, É. S. **Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera**. *Pesq. agropec. bras.*, , vol.39, no.1, Jan. 2004. p.11-16.

PRAÇA, L. B.; MARTINS, É. S.; MELATTI, V, M.; MONNERAT, R. G. *Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae): aspectos gerais, modo de ação e utilização Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia **Documentos 239**. Brasília, dezembro, 2007. 40 p.

POLANCZYK, R; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma Breve Revisão. Revista **Brasileira de Agrociência**. V.7, n. 2, p.1-10,2003.

POLANCZYK, R. A.; SILVA, R. F. P.; FIUZA, L. M. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* Berliner a partir de amostras de solos e sua patogenicidade para *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (Lepidoptera: Noctuidae). **R. Bras. Agrociência**, , v.10, n. 2, abr-jun, 2004. p. 209-214.

RAMOS, F. R. **Avaliação a Campo de uma Estirpe de *Bacillus thuringiensis* Tóxica à Lepidoptera e seu Possível Efeito Adverso sobre Espécies Não- Alvo**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 87 p. Dissertação de Mestrado.

REIS, L.G. A cooperação para o desenvolvimento sustentável das ciências e tecnologias da vida vegetal. In: 53^a. Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, **Anais...** Salvador-Ba, 2001.

ROCHA, L.L. Avaliação de características da couve manteiga existente no mercado de Belo Horizonte. **XI Semana de Iniciação Científica**. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. 25 a 29 de Novembro de 2002. Disponível em:

<http://www.ufmg.br/prpq/xisic/sic2002/resumos/2w5w15.html>. Acesso em: 15 de outubro de 2008.

SARFRAZ, M.; KEDDIE, B. A. **Conserving the efficacy of insecticides against *Plutella xylostella* (L.) (Lep., Plutellidae)**. Blackwell Verlag, Berlin. 2005, p.149–157.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN J.R.; CRUZ, M. E. S . Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogenicos **Floresta**,v.30, n.1/2, 2000. p.129-137,

SEBESTA, K.; FARKAS,J.; HORSKÁ, K; VANKOVÁ,J., **Thuringiensin, the Beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis***. In: BURGESS, H.D. (Ed.). **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. London: Academic Press, P. 1981. p. 249-281.

SHIOMI, H. F.; SILVA, H. S. A.; MELO, I. S.; NUNES, F V.; BETTIOL, W.. BIOPROSPECTING ENDOPHYTIC BACTERIA FOR BIOLOGICAL CONTROL OF COFFEE LEAF RUST **Sci. Agric.** (Piracicaba, Braz.), v.63, n.1, Jan./Feb. 2006. p.32-39.

SILVEIRA, J. M. F. J.; BORGES, I. C.; BUAINAIN, A. M.. Biotecnologia e agricultura: da ciência e tecnologia aos impactos da inovação. **São Paulo Perspec.** 2005, v. 19, n. 2, pp. 101-114. ISSN 0102-8839

SILVEIRA, E. B.; RODRIGUES, V. J.L.B.; GOMES, A. M.A. et al. Pó de coco como substrato para produção de mudas de tomateiro. **Hortic. Bras.**, vol.20, no.2, June 2002. p.211-216.

SILVA, H, S. A.; BETTIOL, W.; TERRASAN, C. R. F.; TOZZI, J. P. L; MELO I. S.; NUNES, F. V. Microrganismos Endofíticos: potencial de uso como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro. **EMBRAPA MEIO AMBIENTE. Boletim de Pesquisa e desenvolvimento 38**. Junho, 2006.

SILVA, V. C. A.; BARROS, R.; MARQUES, E J.; TORRES, J B. Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos Fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok **Neotropical Entomology** v.32, n.4, 2003. p.653-65.

SOBERÓN, M.; BRAVO, A. **Bacillus thuringiensis y sus toxinas insecticidas.** TABASHNIK, B.E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol.. 39: 1994. p.47-79. Disponível em: <<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap12/>>. Acesso em: 10 de dez de 2008.

TORRES, A.L., Bragantia, Efeito de extratos aquosos de azadirachta indica, melia azedarach e aspidosperma pyrifolium no desenvolvimento e ovoposição de *Plutella xylostella*. **Fitosanidade**. Campinas, v.65, n.3, 2005. p.447-457,

TORRES , A. L.; BOIÇA JÚNIOR ,A. L.; MEDEIROS, C. A. M.; BARROS, R. **EFEITO DE EXTRATOS AQUOSOS DE AZADIRACHTA INDICA, MELIA AZEDARACH E ASPIDOSPERMA PYRIFOLIUM NO DESENVOLVIMENTO E OVIPOSIÇÃO DE *Plutella xylostella*.** Bragantia, Campinas, v.65, n.3, 2006. p.447-457,

TURNER, J.T.; LAMPEL, J.S.; STEARMEN R.S.; SUNDIN, G.W.; GUNYUZUL, P.; ANDERSON, J.J.. **Stability of the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xily* subsp. *cynodontis*.** Appl. Environ. Microbiol. 57: 1991. 3522-3528.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SOUZA, M. T.; SHILER, W.; Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico In: MELO, I. L.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. Embrapa. Jaguariúna, p.102-225. 1998.

VIDEIRA, S.S.; ARAÚJO, J.L.S.; BALDINI, V. L. D. **Metodologia para Isolamento e Posicionamento Taxonomico de Bactérias Diazotróficas Oriundas de Plantas Não-Leguminosas.** Embrapa Agrobiologia, 2007.

VILLAS BOAS, G.L. Atenção no controle: Técnicas simples de manejo auxiliam a diminuir a população e traça-das-crucíferas, que ataca principalmente cultivos de repolho, couve, couve-flor e brócolo. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**. Nº 7, abr.-maio 2001. Disponível em: <http://www.grupocultivar.com.br/artigo.asp?id=275> Acessado em: 10 de outubro de 2008.

WARD, W. W. Biochemical and Physical Properts of Green Fluorescent Protein. In: CHALFIE, M., KAIN, S. **Green Fluorescent Protein: properties, applications and protocols.** New York: Wiley-Liss, 1998. p.45 – 75.

YU, C-G.; MULLINS, M.A.; WARREN, G.W.; KOZIEL, M.G.; ESTRUCH, J.J.
The *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3a Lyses Midgut
Epithelium Cells of Susceptible Insects. **Applied and Environmental
Microbiology**, V.63, 1997, p.532-536.

CAPITULO 1- UTILIZAÇÃO SISTÊMICA DE *Bacillus thuringiensis* PARA CONTROLE DE *Plutella xylostella* NA CULTURA DE COUVE

RESUMO

A *Plutella xylostella* é uma das mais importantes pragas da cultura da couve que tem causado prejuízos econômicos relevantes para a agricultura mundial. O método mais usado contra esta praga é o controle químico através de inseticidas. Estes produtos prejudicam o meio ambiente e saúde do homem. Uma das alternativas encontradas para substituir o controle químico é o controle biológico, que usa os bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis*. Estes produzem esporos e cristais que são eficazes especificamente contra as pragas. O uso endofítico do *Bt* na planta tem a mesma ação dos demais bioinseticidas, todavia sem limitação, como é o caso das formulações presentes no mercado. A pesquisa teve como objetivos verificar o tempo de persistência do *B. thuringiensis* em plantas de couve, a quantidade de bactéria presente nestas plantas, bem como determinar o efeito do *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Btk) de forma sistêmica sobre a *Plutella xylostella*. As plantas de couve foram colocadas em sala de bioensaio em temperatura, umidade e fotoperíodo controlados. A estirpe usada foi o Btk marcado com um gene GFP que expressa uma proteína fluorescente, facilmente observada em microscópio de fluorescência. Foram usados dois tipos de tratamentos e duas doses diferentes para cada tratamento. O Btk GFP foi inoculado no solo perto das raízes da planta de couve e foi observado que a estirpe pode ser recuperada de todas as partes da planta e no solo. Foram feitos bioensaios *in vivo* e *in vitro* de cada tratamento com dosagens diferentes. Verificou-se que as plantas tratadas com Btk tiveram índice de mortalidade das larvas de *Plutella xylostella* com valores que variam de 60% a 90%. Esta pesquisa mostrou uma nova perspectiva para o controle biológico com o uso de diferentes aplicações de bioinseticidas a base de Bt.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, *Brassica oleracea* L. var. *acephala*, controle biológico, *Plutella xylostella*, aplicação sistêmica.

CHAPTER 1- SISTEMIC USE OF *Bacillus thuringiensis* FOR THE CONTROL OF *Plutella xylostella* IN CABBAGE

ABSTRACT

The *Plutella xylostella* is one of the most important pests of crop of cabbage and has caused relevant economic losses to agriculture worldwide. One of the most widely used methods for controlling this pest is the chemical ones that makes use of insecticides, that impact on human and environment health. One of the alternatives found to replace this chemical control is the biological control that uses biopesticides based on *Bacillus thuringiensis* which produce spores and crystals specifically effective against pests. The use of Bt endophytic has the same action of other biopesticides, but without causing negatives effects of the spray formulations presented on the market. This research has the following goals: to verify the time of *B. thuringiensis* in the cabbage plants, the amount of bacteria present in the plants and also to determinate the effect of endophytic *Bacillus thuringiensis* kurstaki (Btk) on the *Plutella xylostella*. The cabbage plants were placed in a bioassay room with controlled the temperature, humidity and photoperiod. The strain used was the Btk marked with a GFP gene that expresses a protein thriving, easily observed in fluorescence microscope. Two types of treatments were used with two different doses for each treatment. The Btk GFP was inoculated into the soil near the roots of the cabbage plants, and was observed that the strain can be recovered from all parts of the plant and in the soil. For each treatment with different doses, bioassays were performed *in vivo* and *in vitro*. It was found that the cabbage plants treated with Btk registrated between 60% and 90% mortality rate of the larvae of *Plutella xylostella*. This research shows a new perspective for the biological control is based on different applications of Bt-based biopesticides.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Brassica oleracea* L. var. *acephala*, biological control, *Plutella xylostella*, sistemic application.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas cresceram as preocupações sobre os impactos ambientais causados pelos inseticidas químicos usados para matar as pragas que agridem as diversas culturas agrícolas. Entre as pragas que atacam as brássicas (couve, repolho, couve-flor) destaca-se a *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), popularmente conhecida como traça-das-crucíferas, que no Brasil é considerada uma das pragas mais importantes da cultura da couve (GALLO et al., 2002) pois provoca reduções de até 95% na produção (BIOCONTROLE, 2007).

Como descreveram Mau e Kessing (2007), o adulto da *P. xylostella* deposita os ovos nas folhas da couve, após eclosão dos ovos, se desenvolvem as lagartas, chegando a medir até 10mm de comprimento. A partir do segundo estágio, as lagartas perfuram as folhas da planta da couve, causando danos irreversíveis e prejudicando a sua comercialização. Sucessivamente, as lagartas empupam, preferencialmente, a parte inferior das folhas de couve onde emergem os adultos que voltam a colonizar as outras plantas (SILVA et al., 1993).

Seu controle pode ser realizado por meio de inseticidas químicos ou através do controle biológico. Este último usa bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) que, diferentemente do controle químico, não causa danos ao meio ambiente e a saúde do homem.

Monnerat et al (1999) e Ramos (2008) ressaltam que as vantagens desta bactéria, que produz uma ou várias proteínas tóxicas para a *P. xylostella*, é a sua especificidade, seu efeito não poluente ao meio ambiente, sua inocuidade aos mamíferos e ausência de toxicidade às plantas.

O uso deste tipo de inseticida biológico é ainda restrito, se comparado aos inseticidas químicos. Isso porque, quando aplicado nas folhas, o complexo esporo-cristal fica exposto a radiação solar e é rapidamente desnaturado ou então os bioinseticidas são “lavados” pela ação das chuvas, permanecendo nas folhas por um curto período de tempo. Para contornar este problema, novas formulações, contendo diferentes tipos e quantidades de

protetores solares e espalhantes adesivos estão sendo desenvolvidas (POLANCZYK e ALVES, 2003).

Estes estudos preliminares abrem um novo campo para o uso endofítico do Bt no controle da *P. xylostella*. Contudo, estudos complementares são necessários para entender se o Bt endofítico pode ser empregado como alternativa aos bioinseticidas presentes hoje no mercado, já que, provavelmente, tem a mesma função porém, sem as limitações derivadas da baixa ação residual (AZEVEDO et al., 2000).

OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivos verificar o tempo de persistência do *B. thuringiensis* em plantas de couve, a quantidade de bactéria presente nas plantas e determinar o efeito do Btk com aplicação sistêmica sobre *P. xylostella*.

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1. Estirpe

A estirpe *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (S2032) foi selecionada por ser o padrão contra lepidópteros, diferenciada apenas por possuir gene *green fluorescent protein* (GFP), que expressa uma proteína fluorescente. O uso do GFP foi necessário para identificar a bactéria analisada e diferenciá-la dos outros endofíticos eventualmente presentes na planta.

Inicialmente, tiras de papel filtro embebidas com esporos da estirpe foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 50ml, contendo 10mL de meio NYSM (YOUSTEN, 1984), colocados em incubador rotativo, a 30°C e 200 rpm, por 12 horas; 5mL dessa cultura foram inoculada em frascos Erlenmeyer de 2000ml contendo 600ml do meio em questão. Os frascos foram incubados a 30°C por 72 horas a 200 rpm.

Durante o experimento a estirpe foi armazenada em slants e colocadas no freezer com temperatura de -20°C para o uso semanal em todos os tratamentos e doses inoculadas.

1.1.1. A microscopia de fluorescência

Nesta pesquisa foi utilizado microscópio de fluorescência para a visualização das colônias. Este equipamento dispõe de uma fonte de luz, um filtro de excitação, filtros de barreira e lentes (objetivas) (MAGALHÃES e ARAÚJO, 1998). A fonte de iluminação usada foi a radiação Ultra Violeta (UV), que resulta em fluorescência verde. A faixa de luminosidade para reflexão de fluorescência (GFP) foi de 450nm para incidência e reflexão de 490nm.

As colônias foram crescidas em placas por 24 horas. Após este período passaram por verificação de fluorescência através de microscopia de fluorescência, como mostra a figura 10.

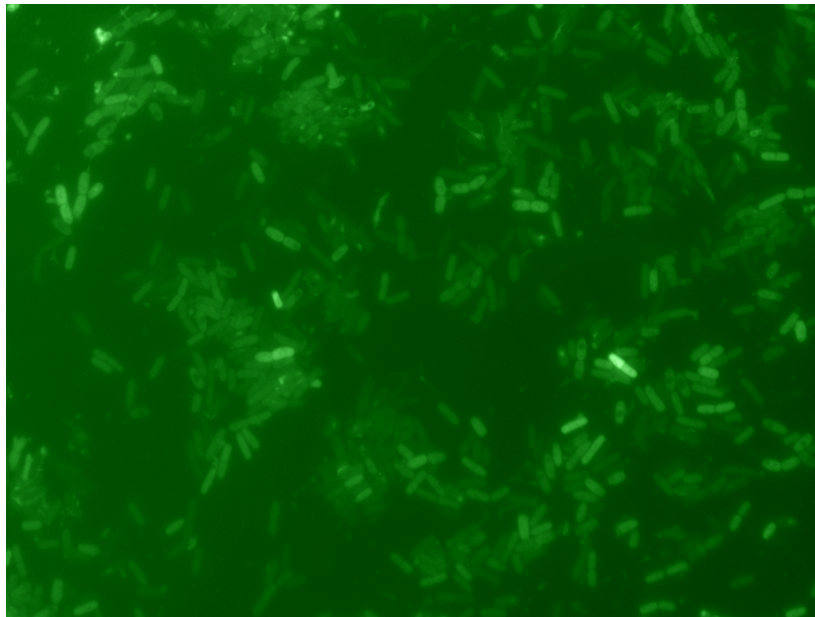


Figura 5- Imagem da amostra de folha com fluorescência

1.1.2. O plaqueamento e contagem de colônias

A contagem de colônias é um método que utiliza diluição seriada para a determinação das células crescidas em meio NYSM nas placas de Petri, como mostra a Figura 11. Para isto, foram usados tubos de ensaio com 4,5mL de água destilada estéril e 0,5mL da suspensão original tirada dos eppendolffs resultando uma concentração de 1 para 10 por placa.

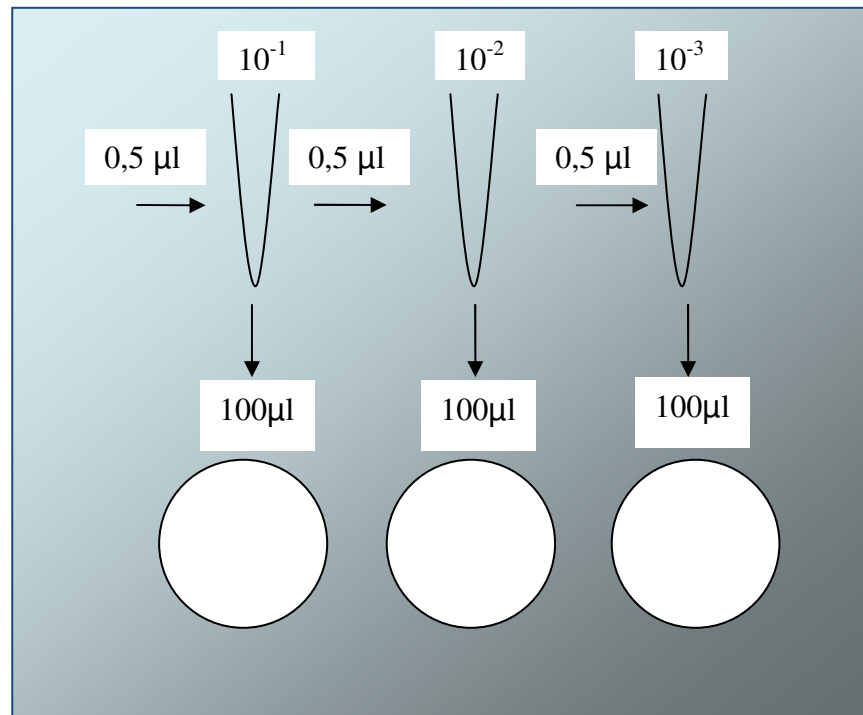


Figura 6- Representação de diluição seriada e plaqueamento

Ao utilizar o método de placa de contagem de Alves (1998) as placas recebem 100µL que são espalhados com auxílio da *Alça de Drigalski*. A contagem das colônias (UFC) foi realizada após 24 horas. Depois foram selecionadas as placas que apresentarem de 30 a 300 colônias. O número de colônias contadas foi multiplicado pela diluição da placa e considerou a pesagem da amostra coletada (UFC/g) (ALVES e MORAES, 1998).

Após a contagem, as colônias foram observadas em microscópio de fluorescência, com comprimento de onda adequado.

1.2. Planta

Para todos os ensaios foram usadas as mesmas condições de plantio e crescimento de sementes de couve manteiga *Brassica oleracea* L. var.

acephala, que foram plantadas em vasos plásticos de dois litros, em solo não estéril com quatro sementes em cada vaso.

Os vasos plásticos foram colocados em estantes protegidas com tela (Figura 5 e 6) para evitar eventuais misturas ou contaminações entre os tratamentos. Cada prateleira possuía iluminação artificial própria com fotoperíodo controlado em 12 horas.



Figura 7-Plantas em estantes protegidas por telas e com fotoperíodo controlado.



Figura 8- Detalhe da planta de couve na prateleira

1.3. Inseto

As lagartas de *Plutella xylostella* utilizadas no bioensaio foram obtidas da criação já instalada no laboratório de Bioecologia e Semioquímicos da

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia onde já eram mantidas em temperatura e umidade controladas (28 °C, 60% \pm 10 de umidade relativa e o fotoperíodo controlado em 12 horas) (MEDEIROS et al. 2003).

A alimentação dos adultos foi feita com solução de mel a 10%, renovada a cada dois dias. Para a fase sucessiva de eclosão das lagartas as folhas com a postura foram transferidas diariamente em gaiolas de acrílico (figuras 7 e 8). Após a eclosão, foram oferecidas folhas de couve previamente lavadas com hipoclorito de sódio a 2% e enxaguadas com água destilada. As lagartas que se desenvolveram nas folhas, formaram as pupas, as quais foram transferidas uma por uma para a gaiola onde se tornaram adultos (figura 9).

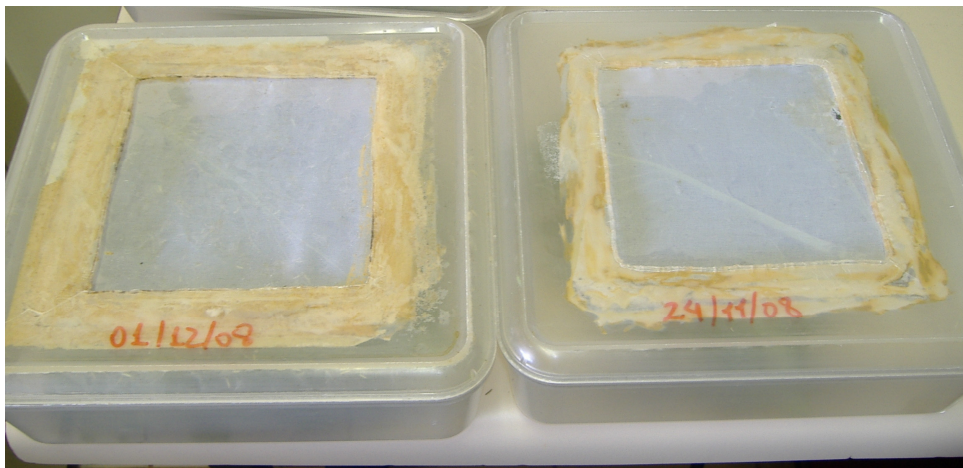


Figura 9- Gaiola larvas *P. xylostella*



Figura 10- Detalhe gaiola



Figura 11- Gaiola dos adultos de *P. xylostella*

1.4. Traslocação do Bt em planta de couve

Para a realização dos testes foram utilizados 30 vasos de plástico com quatro plantas cada, por tratamento. As plantas jovens de couve foram inoculadas com a bactéria Btk-GFP crescida em meio NYSM (YOUSTEN et al., 1984). Foram realizados três tratamentos separadamente:

- Aplicação semanal;
- Aplicação única (teste de persistência);
- Testemunha (controle negativo).

Os procedimentos dos testes iniciais foram feitos para a observação da translocação de Btk GFP aplicado no solo para verificar a absorção de Btk GFP pela planta através de amostras de suas partes (caule e folhas) e solo/terra para observação direta.

O Btk marcado nesse procedimento foi incubado por 72 horas e inoculado no solo próximo as raízes da planta de couve. Esse procedimento,

foi utilizado a dosagem de 1mL. No tratamento com doses semanais, esta aplicação foi repetida a cada sete dias.

Para os tratamentos realizados no experimento da pesquisa foram feitos slants com o isolamento de 10% de material liofilizado da estirpe para os tratamentos e contagem das colônias a partir da UFC/g. O experimento foi desenvolvido em três repetições.

Para cada tratamento, uma planta de couve inteira foi coletada dos vasos de forma aleatória após três dias da aplicação. Após lavou-se superficialmente a planta coletada utilizando água e esponja para limpeza adequada e eliminação de outros organismos que, porventura, estariam presentes. Com o auxílio de bisturi flambado, procedeu-se o corte das partes da planta selecionada da seguinte maneira: Primeiro, o caule e pedúnculo da planta foram retirados aleatoriamente sem as raízes; depois as folhas da mesma planta foram separadas sem o pedúnculo; e por último foram retirados do vaso e pesados imediatamente 0,60g a 0,80 g de terra (solo).

Todas essas partes retiradas da planta de couve selecionada, como descrita acima foram pesadas separadamente, maceradas em cadinhos autoclavados com 5mL de solução fisiológica (0,8% de NaCl) estéril. Das amostras resultaram dois eppendolfs; cada uma para verificar o seu crescimento em diferentes condições. A primeira foi submetida a choque térmico¹ de 80°C por 12 minutos e 5 minutos em gelo, para eliminar as impurezas que poderiam estar presentes, restando apenas os esporos viáveis do Btk. Enquanto na segunda, que não sofreu choque térmico, foi feita para verificar o crescimento vegetativo da bactéria. Depois, foi feito o plaqueamento usando a técnica de diluição seriada (figura 11) em meio de cultura seletiva com antibiótico (eritromicina) (15µL de antibiótico por mL de álcool etílico absoluto) em uma concentração de 100µg por mL de meio. Nessas condições, só germinam esporos de *Bacillus thuringiensis kurstaki* marcados com GFP e não dos outros microrganismos. Após 24 horas de

¹ O choque térmico é uma técnica que usa o aquecimento a 80°C por 12 minutos e resfriamento em gelo por 5 minutos para que apenas os esporos viáveis permaneçam e sejam eliminadas as células vegetativas e os esporos não viáveis.

incubação, foi observado o crescimento das bactérias em placa e verificado a fluorescência em microscópio de fluorescência.

Posteriormente, foram utilizadas duas dosagens de 1mL e 5mL de caldo final de Btk GFP por planta, em solo não autoclavado. Para esta etapa foram utilizadas 80 plantas de couve com quatro plantas por vaso, que foram plantadas em vasos plásticos de dois litros.

1.4.1. Aplicação Semanal

Foram feitos testes semanais de aplicação de inóculo com 1mL e de 5mL de caldo final de NYSM com o *Bacillus thuringiensis* (Btk-GFP) em plantas jovens de couve para determinar a presença da bactéria na planta. Neste tratamento, a aplicação foi repetida cada sete dias nas mesmas plantas de couve.

Os resultados foram obtidos a partir do isolamento da bactéria e a contagem em agar NYSM com eritromicina. Onde se notou a presença e porcentual de bactéria isolada a partir de diluição seriada (-1, -2, -3), com duas placas para cada tratamento com e sem choque térmico.

Todas as amostras (folha, caule e terra) foram tratadas com choque térmico e sem choque térmico e feita a média do valor de UFC. Com este valor procedeu-se ao calculo UFC/g e, depois calculado o porcentual dos valores obtidos das amostras.

Foram usadas plantas de couve sem nenhum tratamento para o controle negativo (testemunha).

1.4.2. Aplicação Única (Teste da Persistência)

Este tratamento tem como objetivo analisar a persistência da bactéria (Btk) na planta após uma inoculação única na primeira semana de experimento. Foram usadas duas doses: 1mL e de 5mL de caldo final.

Analisou-se semanalmente a o valor do UFC/g a partir técnica de diluição seriada, contagem em placas e observação da fluorescência das colônias recuperadas com microscópio de fluorescência.

Foi feita uma aplicação única das duas doses (1mL e 5mL) usando 40 plantas para cada dose separadamente. Analisou-se semanalmente o valor do UFC/g como calculado no tratamento semanal. Foram usadas plantas de couve sem nenhum tratamento para o controle negativo (testemunha).

1.5. Toxicidade a larvas de *P.xylostella*

1.5.1. Bioensaio in vivo aplicação semanal (dose 1mL e 5mL)

Para o bioensaio *in vivo* foram usadas duas gaiolas (figura 12 e 13). Cada gaiola tinha dois vasos com duas plantas de couve para cada vaso. As gaiolas foram mantidas em uma sala de bioensaio com temperatura controlada de 26°C com variação de $\pm 2^\circ\text{C}$, 70% de umidade com variação $\pm 10\%$ e com fotoperíodo controlado de 12 horas.

Foram aplicadas duas dosagens (1mL e 5mL) de inóculo de caldo final de NSYM com a bactéria Btk GFP crescido a 30°C por 72h em incubador rotativo (220 rpm) perto da raiz das plantas na gaiola do bioensaio. Na gaiola com a testemunha não houve inóculo nas plantas de couve. Em cada gaiola foram colocadas 10 lagartas de *P. xylostella* de 2º/3º instar por 7 dias. Após 48h começou-se a observar a mortalidade das lagartas, até a última leitura que ocorreu no sétimo dia de experimento.

Depois de 7 dias as lagartas vivas e mortas foram recolhidas em eppendolfs e maceradas com 0,5mL de solução salina (0,8% de NaCl) e depois inoculadas em placa de Petri com Agar NSYM e eritromicina.

As placas foram colocadas em incubadora a 30°C por 24h. Após este período, observou-se a morfologia das colônias características da bactéria Btk GFP nas placas de Petri. Depois foram analisadas as colônias com microscópio de fluorescência (450nm) para determinar a presença da bactéria fluorescente.

O mesmo protocolo é usado com a testemunha sem tratamento com a bactéria teste.



Figura 12- Detalhe das gaiolas com 2 doses diferentes de aplicação distintas



Figura 13- Bioensaio in vivo a) Gaiola para o Bioensaio in vivo e b) Detalhe da planta para o bioensaio.

1.5.2. Bioensaio *in vitro* aplicação semanal (dose 1mL e 5mL)

No bioensaio *in vitro* do tratamento de aplicação semanal, as folhas da planta de couve utilizadas na amostragem foram obtidas da aplicação semanal do inóculo de Btk no solo perto das raízes das plantas. As folhas retiradas das plantas de couve foram colocadas em placas de Petri (figura 21) e oferecidas para 10 lagartas de *P. xylostella*. Após 48 horas foi realizada a primeira leitura e, depois de sete dias, foi feita a última leitura das placas. Depois desses procedimentos, foi avaliada a mortalidade das lagartas com sintomas característicos de bacteriose (figura 22). As lagartas vivas e mortas foram submetidas à maceração em eppendolffs com 0,5mL de solução fisiológica (0,8% de NaCl), e procedeu-se ao plaqueamento para contagem de células e visualização em microscópio de fluorescência. O mesmo procedimento foi realizado para o controle negativo sem inóculo.

1.5.3. Bioensaio *in vitro* de persistência (aplicação única) (dose 1mL e 5mL)

Para o bioensaio *in vitro* no tratamento de persistência, as plantas foram inoculadas com uma aplicação única somente na primeira semana de experimento sem aplicações posteriores. Foram usadas as mesmas plantas durante as sete semanas de bioensaio. As folhas das plantas de couve em dose inoculada de 1mL e de 5mL foram colocadas em placa de Petri oferecidas para 10 lagartas de *P. xylostella* (figura 21). Em seguida, foram feitas duas leituras, uma após 48 horas e outra depois de sete dias. Foi avaliada a mortalidade das lagartas de *P. xylostella*. As lagartas vivas e mortas foram submetidas à maceração em eppendolffs com 0,5mL de solução fisiológica (0,8% de NaCl), ao o plaqueamento para contagem de células e, a visualização em microscópio de fluorescência. O mesmo procedimento foi realizado para o controle negativo sem inóculo.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Traslocação do Bt em plantas de couve

A recuperação do Btk foi calculada em UFC/g de amostra. A partir destes dados, foi feita uma média das amostras com e sem choque térmico e calculado o percentual de Btk obtido de cada amostra. Este cálculo foi feito para todos os tratamentos. Foi considerado um número de colônias de 30 a 300. Foram feitos também testes com a mesma técnica, mas com plantas sem nenhum tratamento (testemunha).

Comprovou-se por microscopia de fluorescência, que a bactéria isolada das partes das plantas foi realmente a estirpe inoculada. Após uma semana foi possível reisolar o Btk de todas as partes da planta e do solo, inclusive dos insetos que se alimentaram das folhas de couve.

Desta forma, foi comprovada a translocação da bactéria inoculada, Btk (GFP), nos tecidos da planta. Verificou-se também a persistência desta no solo, por até oito semanas no tratamento com uma única aplicação (persistência).

2.1.1. Aplicação Semanal (dose 1mL e 5mL)

Na aplicação semanal foi observada uma recuperação do Btk-GFP em treze semanas consecutivas. Os dados comparativos observados na dosagem de 1mL, ressaltam a presença do Btk-GFP nas três amostras como é evidenciado no gráfico 1.

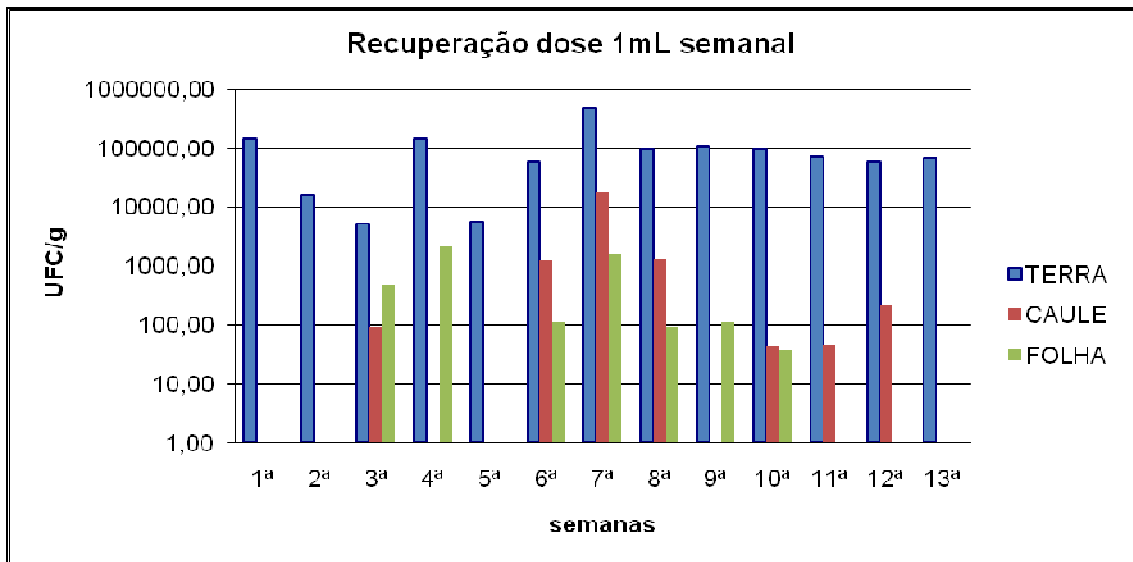


Gráfico 1- UFC/g das amostras de Folha, Caule e Terra dose 1mL

O gráfico acima mostra os seguintes resultados que foram apresentados de acordo com a evolução do tratamento semanal nas amostras de:

- Caule: foi observado um crescimento da quantidade nas primeiras semanas até os picos de maior valor que foram observados nas 6ª, 7ª e 8ª semanas, observando um decréscimo gradual até a 13ª semana.
- Folhas: se visualizou uma variação de recuperação gradual até o pico mais importante na 4ª semana de aplicação, quando foi evidenciado uma decadência na recuperação do Btk.
- Terra: foi mostrada uma pequena oscilação da recuperação com um pico mais alto na 7ª semana da experimentação.

Nas placas a seguir (figura 14) são mostradas os resultados da recuperação do Btk GFP em forma de UFC.

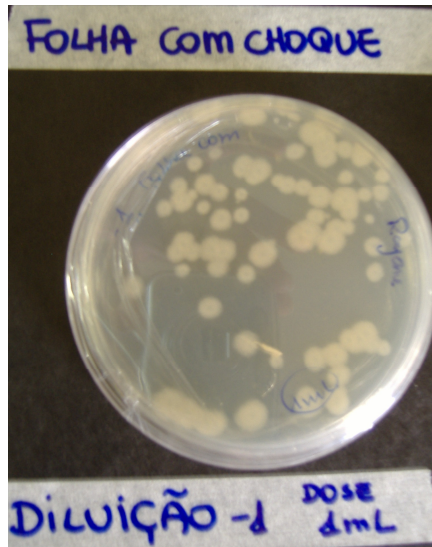


Figura 14 Detalhe da placa com recuperação das amostras de folha com dose de inóculo de 1mL com choque térmico

Na aplicação semanal foi observada uma recuperação do Btk-GFP em 12 semanas consecutivas. Os dados comparativos observados no gráfico 2 mostram que na dosagem de 5mL ocorreu a presença do Btk-GFP nas três amostras:

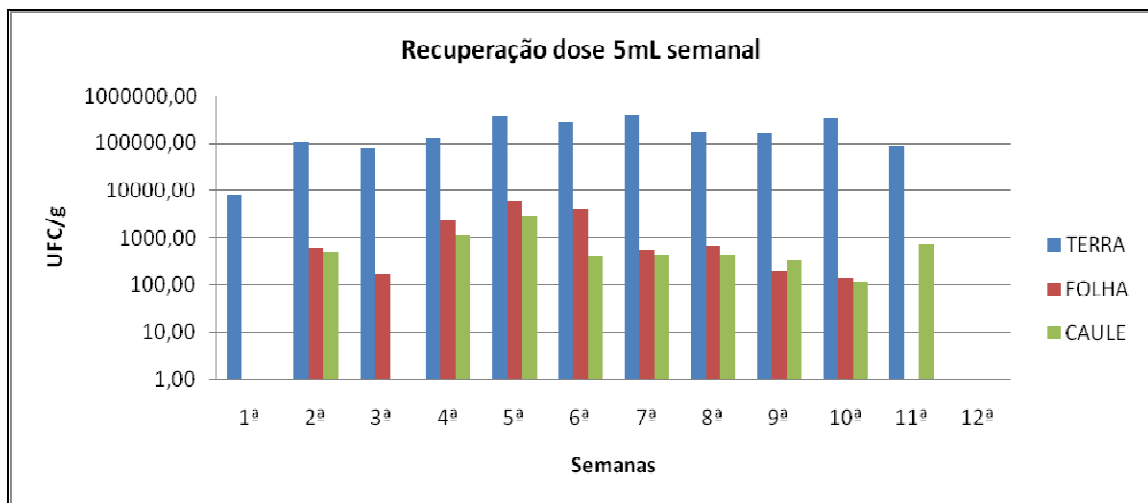


Gráfico 2- UFC/g das amostras de Folha, Caule e Terra dose 5mL

O gráfico acima mostra os seguintes resultados que foram apresentado de acordo com a evolução do tratamento semanal com dosagem de 5mL nas amostras de:

- Caule: foi observado um crescimento até o pico mais alto na 5ª semana de experimento. Após este valor evidenciado uma estabilidade entre a 4ª e 11ª semanas;

- Folhas: observou-se um crescimento lento nas primeiras semanas até o pico mais importante durante a 5ª semana de aplicação, quando foi evidenciada uma decadência na recuperação do Btk;
- Terra: como observado também na dosagem de 1mL, alguns picos ressaltaram uma recuperação estável. Os picos mais evidentes foram na 5ª, 7ª e 10ª semanas.

Nas placas abaixo (figuras 15 e 16) são mostradas o resultado da recuperação do Btk GFP em forma de UFC.

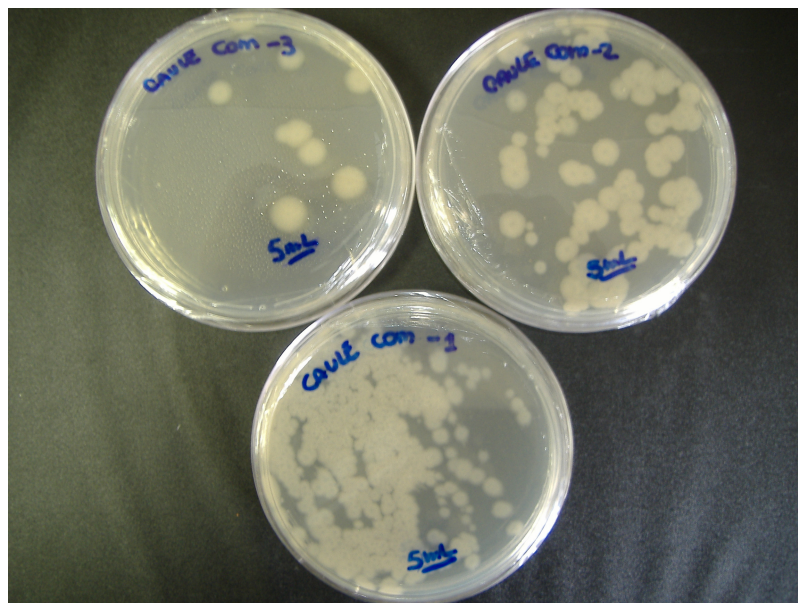


Figura 15- Colônias de recuperação das amostras de caule na dose de 5mL com choque térmico com diluição de -1, -2 e -3

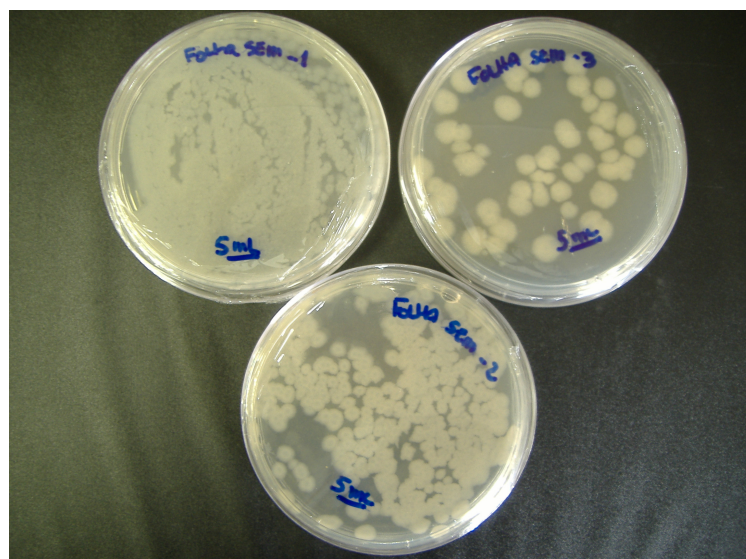


Figura 16- Colônias recuperadas das amostras das folhas dosagem 5mL nas várias diluições com choque térmico

2.1.2. Aplicação Única (Teste da Persistência) (dose 1mL e 5mL)

Os gráficos 3, 4 e 5 (com uma aplicação única) mostram que houve a recuperação da bactéria fluorescente aplicada durante o período de oito semanas.

O gráfico 3, relativo a amostra de folha na aplicação da dosagem de 1mL demonstra que houve uma recuperação do Btk durante todo o período de oito semanas e, principalmente, na 4ª semana quando foi evidenciado um pico de maior quantidade.

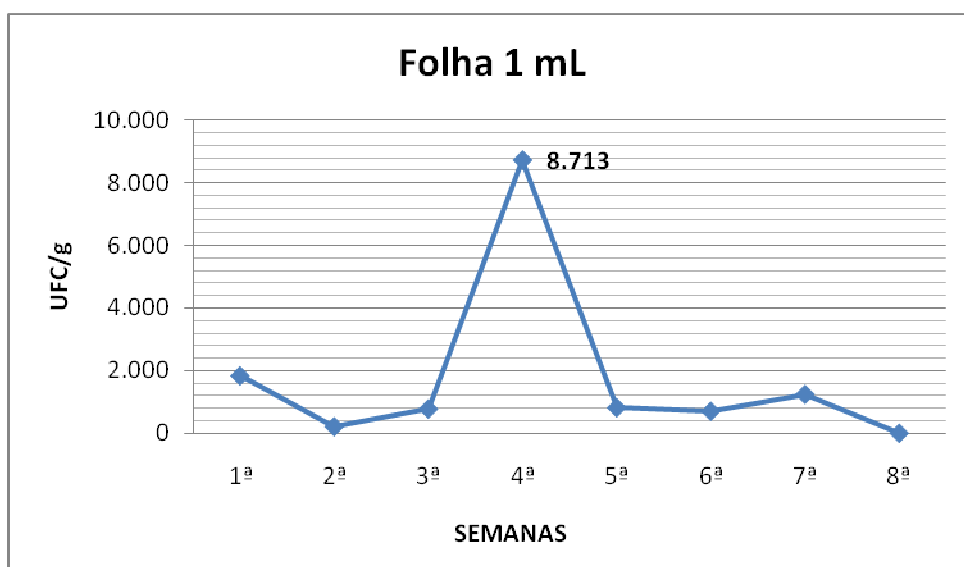


Gráfico 3- Persistência de Btk GFP com tratamento de dosagem única de 1mL em folha

O gráfico 4, das amostras de caule na aplicação da dosagem de 1mL, mostrou que houve uma oscilação da quantidade recuperada, pois evidenciou um pico de maior quantidade na 3ª e principalmente 4ª semana de experimento.

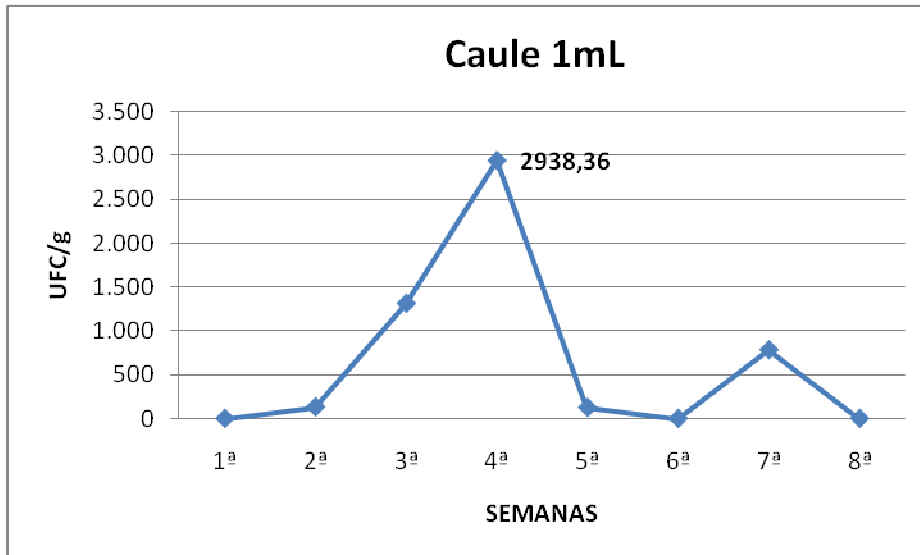


Gráfico 4- Persistência de Btk GFP com tratamento de dosagem única de 1mL em caule

Na amostra de terra (solo) na aplicação da dosagem de 1mL, de acordo com o gráfico 5, ocorreu uma recuperação do Btk GFP em modo decrescente até a 8ª semana, evidenciando um pico na 5ª semana, além do valor mais alto, que foi observado na 1ª semana.

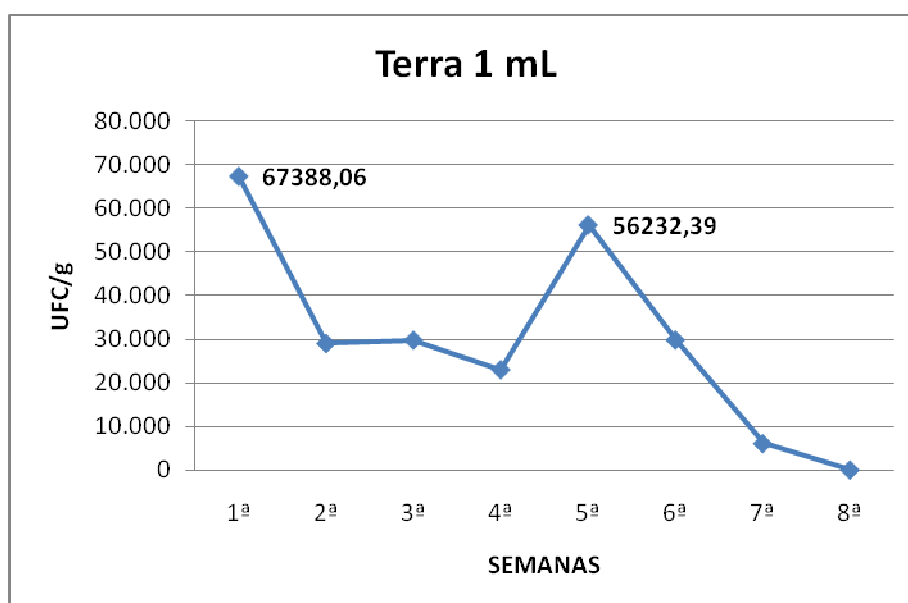


Gráfico 5- Persistência de Btk GFP com tratamento de dosagem única de 1mL em terra

As imagens abaixo (figuras 17, 18 e 19) mostram as colônias crescidas a partir da recuperação do Btk GFP nas amostras de folha, caule e terra (solo) no teste de persistência.

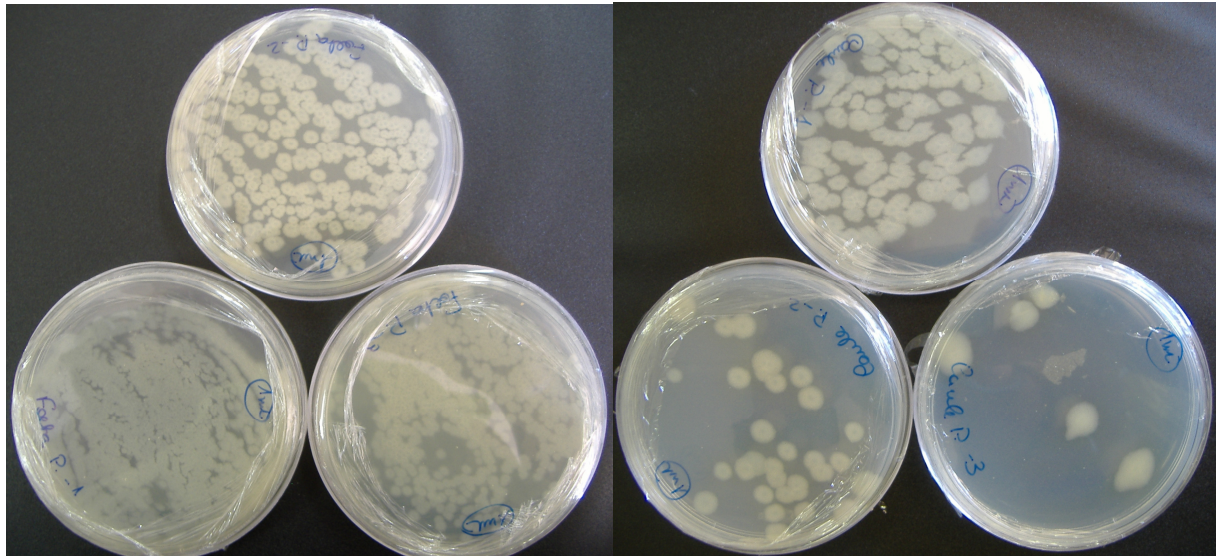


Figura 17- Persistência amostra de folha e caule 1mL

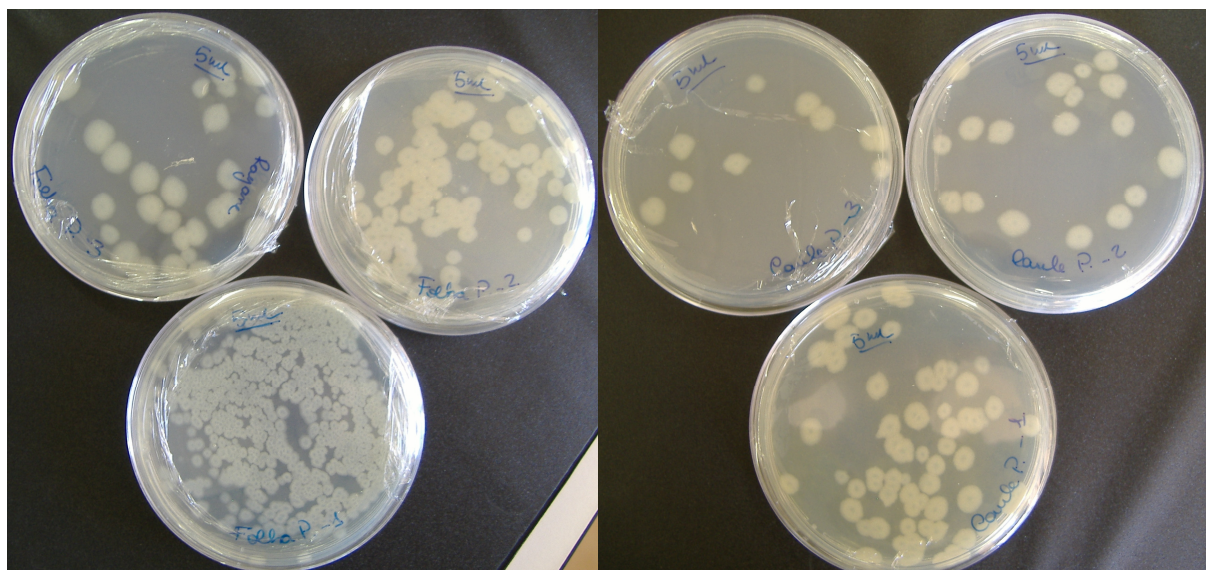


Figura 18- Persistência amostra de folha e de caule 5mL



Figura 19- Persistência amostra de terra com diluição de -3 e dose 5mL

São mostrados a seguir os resultados do teste da persistência para a dose 5mL:

Nas amostras de folha, caule e terra (solo) observou-se uma recuperação variável, mas sempre presente.

Para a amostra de folha, os dados do gráfico 6, ressaltam uma evolução decrescente da quantidade da recuperação do Btk GFP, indicando um pico e maior valor na 2ª semana.

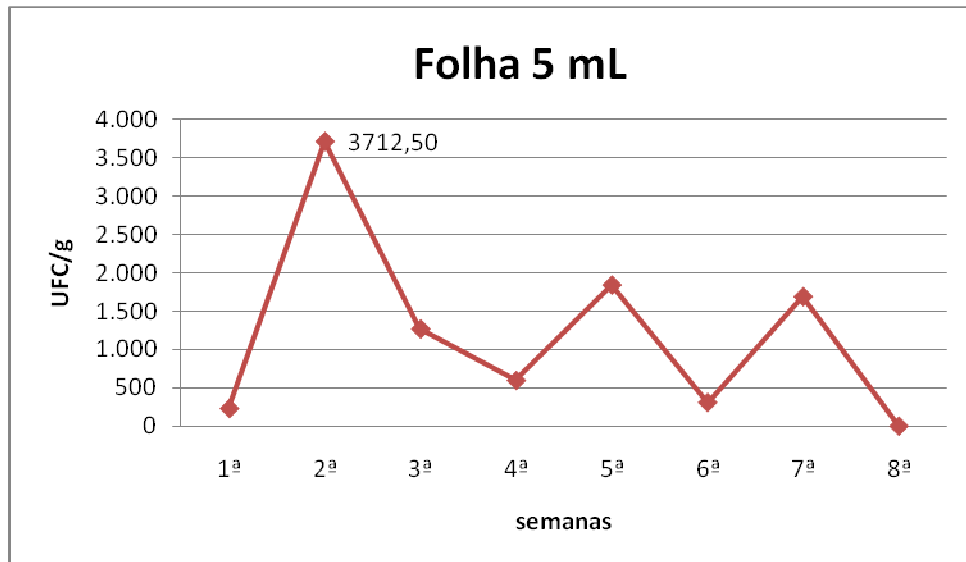


Gráfico 6- Persistência de Btk GFP com tratamento de dosagem única de 1mL em folha

Para as amostras de caule, como mostra o gráfico 7, houve uma oscilação nas oito semanas de experimento, quando foram evidenciados os 3 picos mais importantes, na 2ª, 5ª e, principalmente na 8ª semana, na quando apresentou o valor mais alto.

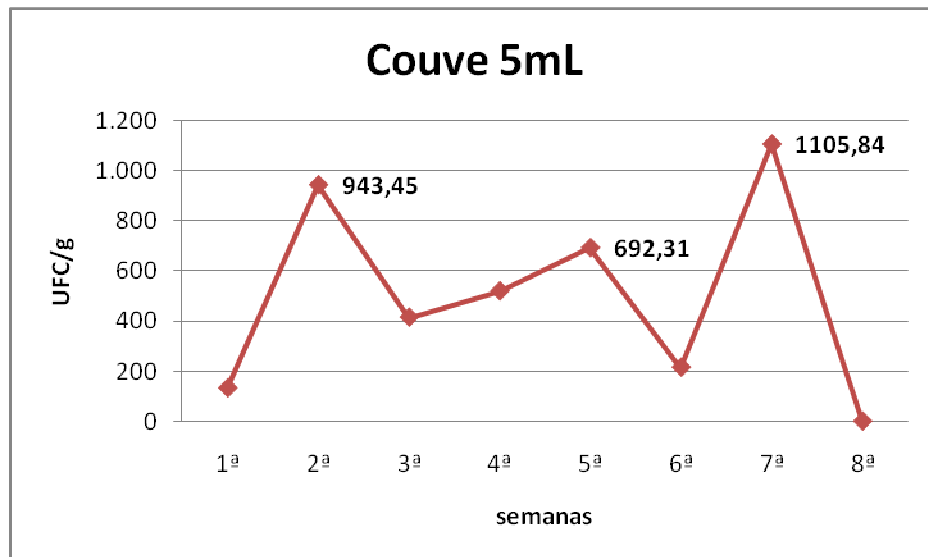


Gráfico 7- Persistência de Btk GFP com tratamento de dosagem única de 1mL em caule

No gráfico 8, que representa a amostra de terra (solo) na aplicação da dosagem de 5mL, observou-se um pico inicial na 1ª semana e a partir da 4ª semana mostrou uma estabilidade de valores altos até a 7ª semana.

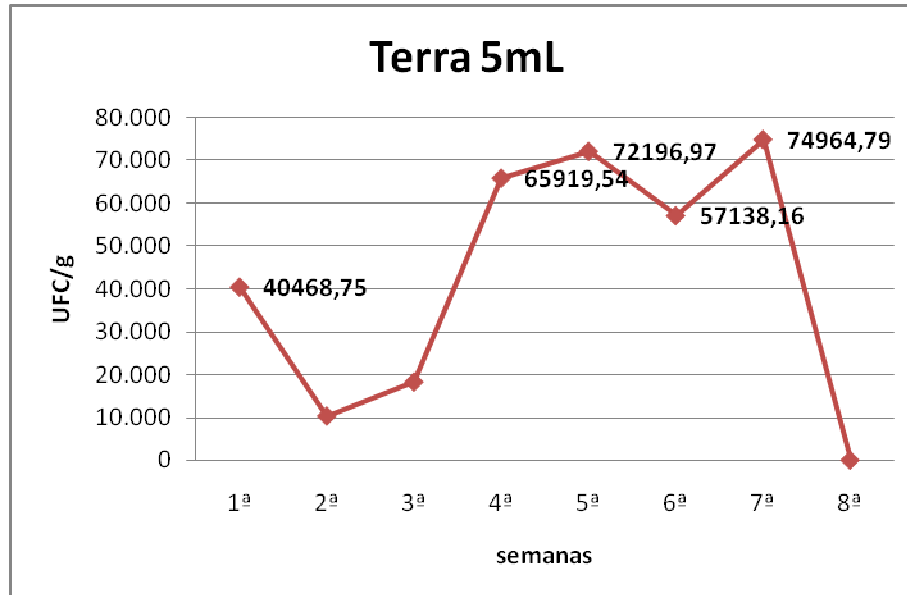


Gráfico 8- Persistência de Btk GFP com tratamento de dosagem única de 1mL em terra

2.2. Bioensaio

Todas as colônias obtidas da recuperação das amostras dos insetos vivos e mortos usados para o bioensaio apresentaram fluorescência, quando observadas no microscópio de fluorescência.

As testemunhas não apresentaram fluorescência quando se realizou a microscopia de fluorescência.

2.2.1. Bioensaio in vivo (dose 1mL e 5mL)

No gráfico 9 observou-se um valor de 80% a 90% de mortalidade da *P. xylostella* na dosagem de 1mL por aplicação.

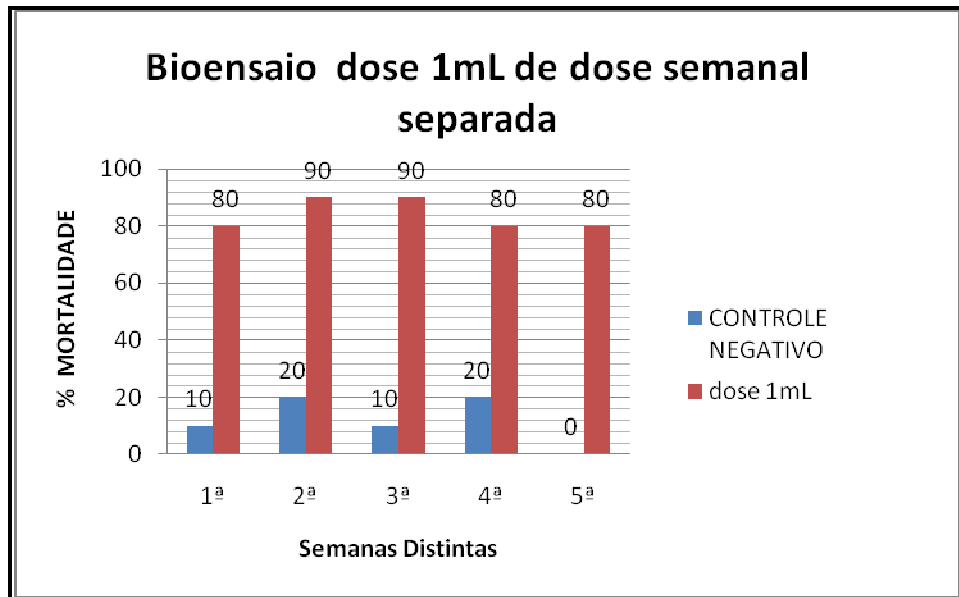


Gráfico 9- Porcentual de mortalidade de dose de 1mL aplicadas distintamente em diferentes plantas de couve por semana

Na dosagem de 5mL presente no gráfico 10, mostra que a mortalidade é superior a 80% chegando a um valor de 90%.

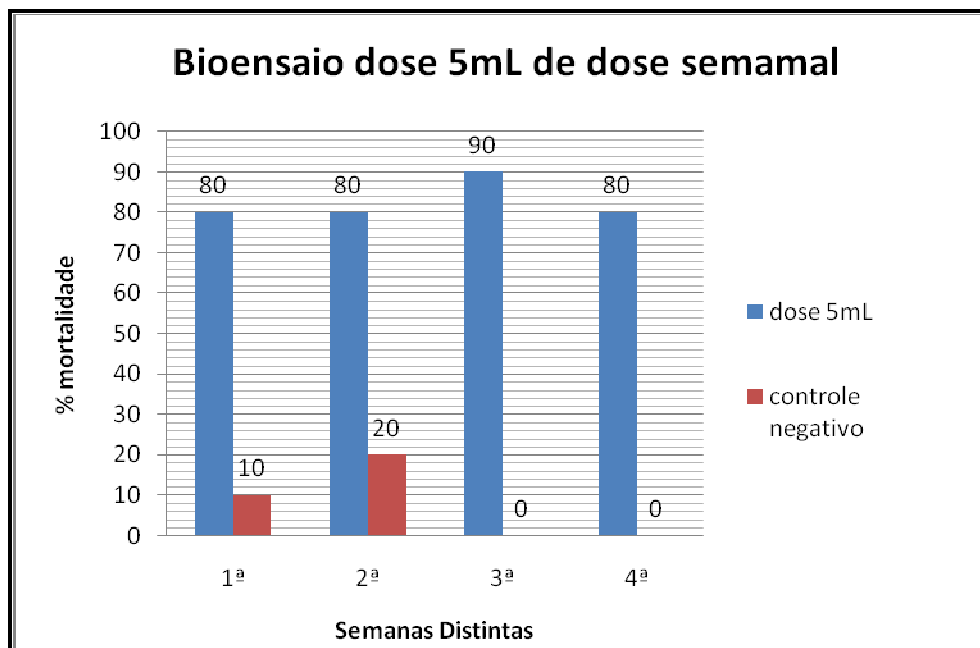


Gráfico 10- Porcentual de mortalidade na dose de 5mL aplicadas distintamente em diferentes plantas de couve por semana

2.2.2. Bioensaio *in vitro* aplicação semanal (dose 1mL e 5mL)

Para os bioensaios *in vitro*, os dados relevantes são evidenciados nos gráficos 11 e 12.

O gráfico 11, relevou uma mortalidade que varia de 60% a 80% das lagartas de *P. xylostella*.

Na dosagem de 5mL, o valor da mortalidade oscilou de 70% a 90%.

O controle negativo não superou os 20% de mortalidade nos dois testes (1mL e 5mL).

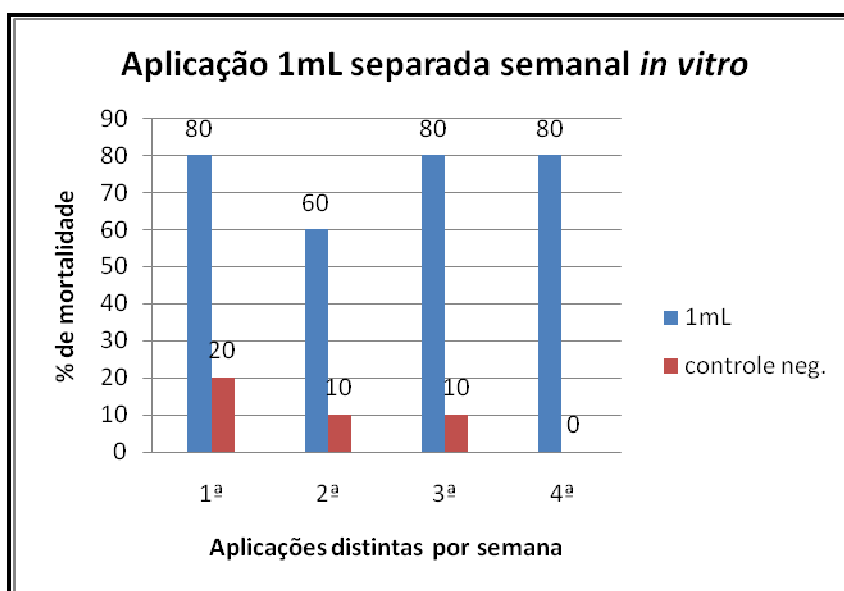


Gráfico 11- Bioensaio *in vitro* dose 1mL

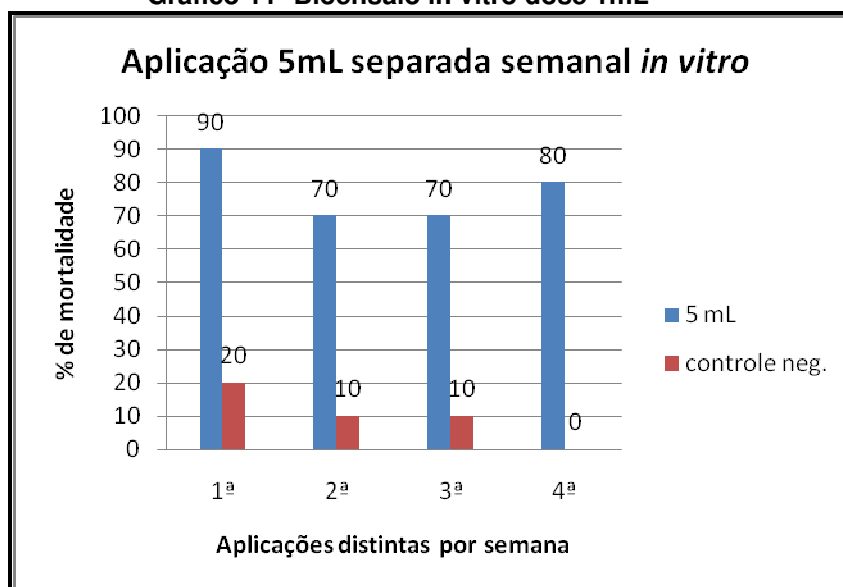


Gráfico 12- Bioensaio *in vitro* dose 5mL

2.2.3. Bioensaio *in vitro* teste Persistência (Aplicação Única) (dose 1mL e 5mL)

No bioensaio *in vivo* evidenciou-se um decremento da mortalidade de acordo com a quantidade de Btk presente na planta, tanto na doses de 1mL quanto na de 5mL.

Os dados do gráfico 13 demonstraram que inicialmente a mortalidade é alta (90%), na dose de 1mL. Já na dosagem de 5mL, mostrou que houve uma pequena variação nas cinco semanas iniciais, observando uma queda substancial até a sétima e última semana. Após sete semanas a mortalidade chegou a 20%, como ocorreu com o controle negativo.

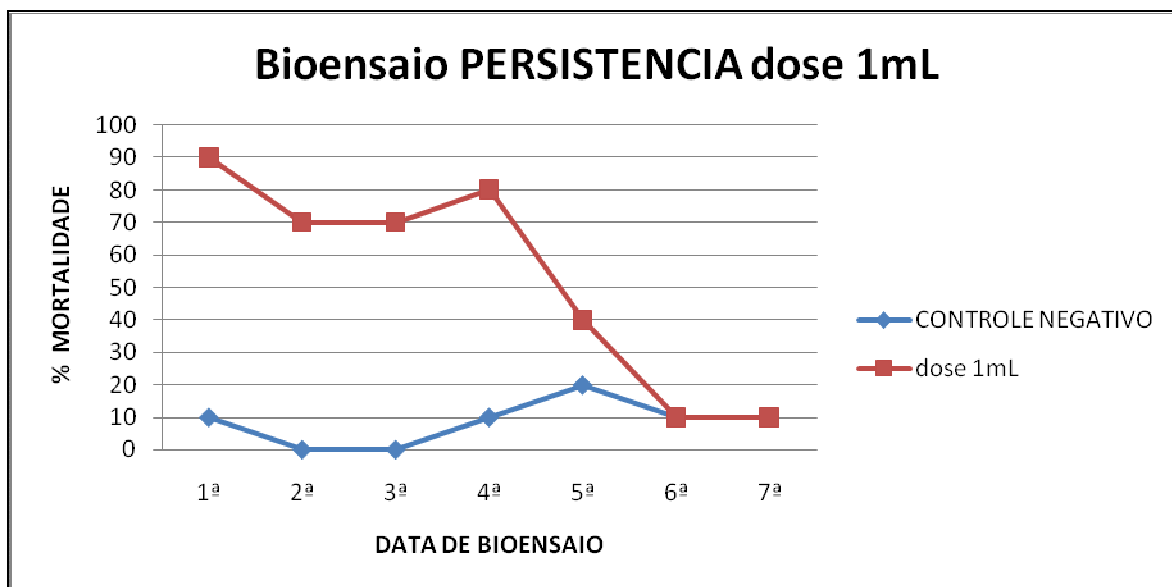


Gráfico 13- Mortalidade do bioensaio aplicação única de 1mL por planta

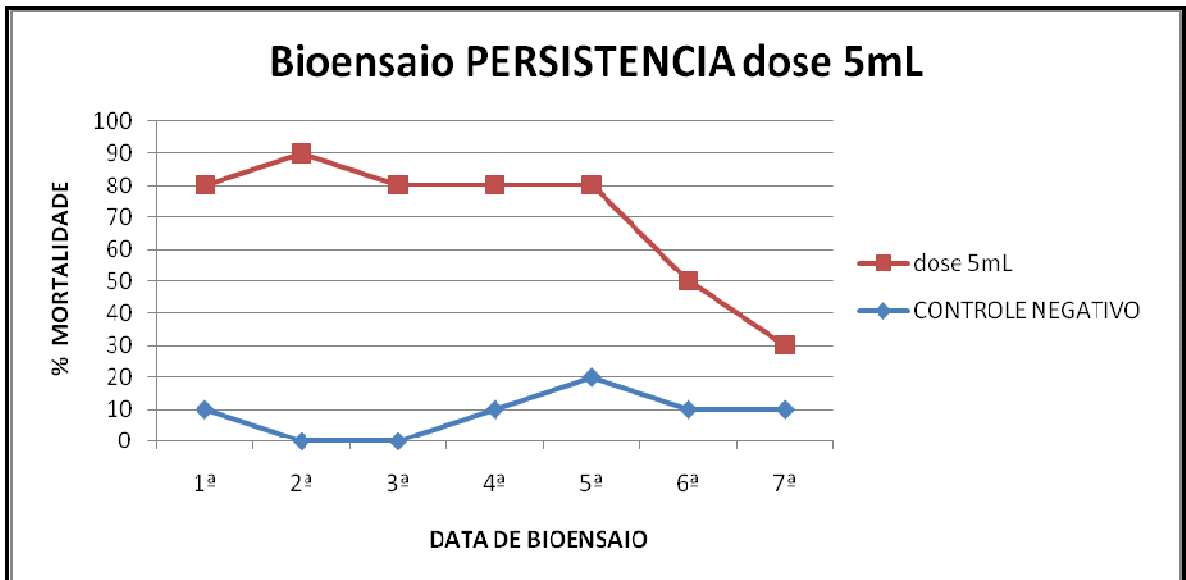


Gráfico 14- Mortalidade do bioensaio aplicação única de 5mL por planta

Imagens abaixo mostram placas do bioensaio *in vitro* para a dose de 1mL.

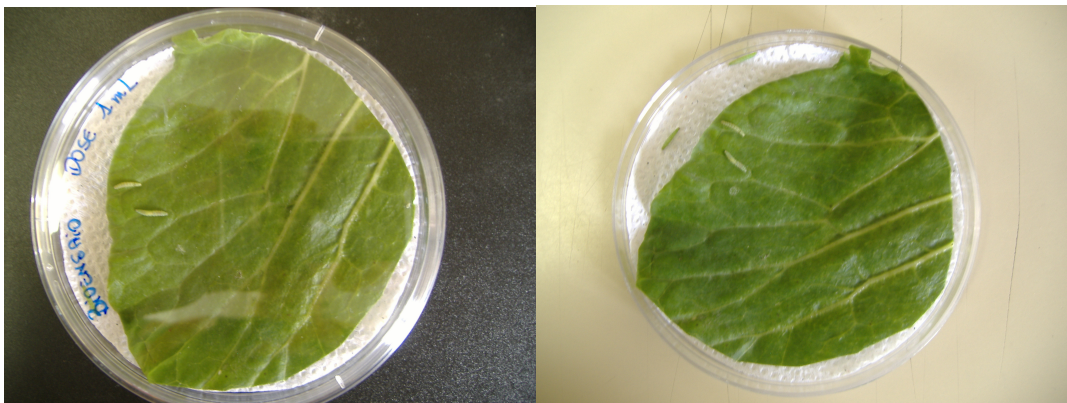


Figura 21- Bioensaio in vitro dose 1mL e detalhe bioensaio



Figura 22- Detalhe da *P. xylostella* morta após 48 horas

As fotos mostram que no tratamento de aplicação semanal do Btk houve uma variação da translocação na dosagem de 1mL e de 5mL. Na

variação observada nas doze semanas de experimento foi verificada a recuperação do Btk do solo (terra) e de todas as partes da planta (folha e caule) analisadas. Foi observado ainda que na amostra de solo, os valores percentuais de recuperação foram maiores, por ter sido o local de aplicação do inóculo do Btk.

Para o tratamento de aplicação única (persistência), a observação de translocação variou de forma decrescente, comprovando a presença do Btk com variações e picos significativos, principalmente na dosagem de 5mL.

Estes resultados podem ser comparados com o estudo de Demo (2006) que testou a mesma bactéria (Btk GFP) endofítica com plantas de algodão para o controle da *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuide). Nos dois estudos, os mesmos tratamentos foram feitos (aplicação semanal e única/persistência) com variação e resultados similares.

Em relação à toxicidade, esta pesquisa demonstrou que o Btk endofítico nas plantas de couve provocaram uma mortalidade que variou de 60% a 90% para as lagartas de *P. xylostella*. Importante notar que no caso da pesquisa de Demo (2006) a mortalidade da *Spodoptera frugiperda* chegou ao valor de 80% nas plantas de algodão testadas.

Sendo assim, se observou que as características endofíticas do Bt testadas e os resultados positivos indicam sua capacidade de conviver e persistir dentro dos tecidos das plantas de couve, sem causar prejuízos aparentes, tendo como benefício apenas proteção contra a sua principal praga, a *P. xylostella*.

Os resultados evidenciaram ainda uma translocação em algumas partes da planta (caule e folhas), as quais destacaram a capacidade das plantas de absolver o Bt a partir das raízes, bem como as características endofíticas deste em sobreviver e persistir na planta de couve.

Estes resultados foram verificados também por Mcinroy e Koepler (1995) e Videira (2007) quando observaram as diversidades de bactérias associadas as raízes e caule de plantas.

3. CONCLUSÕES

Este estudo observou a capacidade endofítica do Bt e a relação que existe entre o crescimento, convivência e a persistência da bactéria dentro da planta durante o tratamento e a eficácia da bactéria no combate do inseto-praga nos bioensaios.

Os estudos iniciais comprovaram por microscopia de fluorescência que o *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) marcado com gene de fluorescência (GFP) se difunde por todas partes da planta como caule e folhas, nos insetos mortos e vivos e também na terra (solo).

Foi comprovada a mortalidade dos insetos que se alimentaram das folhas de couve tratadas com Btk (GFP).

A persistência das células de Btk (GFP) na terra e na planta, principalmente nas folhas, foram constatadas por até doze semanas, quando usadas as dosagens de 1mL e de 5mL de caldo final. Nas folhas, essa persistência foi comprovada por até sete semanas, causando mortalidade dos insetos nesse período.

A pesquisa comprovou que a utilização de forma sistêmica de Btk (GFP) é eficaz no controle de lagartas, com mortalidade que variaram de 60% a 90% dos insetos testados.

A partir dos resultados obtidos com esta pesquisa, se observou a presença do Btk na planta de couve garantindo a sua proteção contra a *P. xylostella*. Esses experimentos preliminares abrem a possibilidade de uma nova forma de utilização de *B. thuringiensis* no controle de insetos com diferentes formulações e aplicações que podem determinar uma melhor eficácia do bioinseticida.

Este estudo abre uma variedade de perspectivas que podem aprofundar as possibilidades do uso de Bt como:

- Uso de novas formulações para aumentar a eficácia do controle biológico;
- Desenvolvimento de diferentes técnicas de aplicação;

- Análise dos mecanismos internos da planta que permitem a translocação da bactéria endofítica;
- Estudos de interações planta e microrganismos com testes de variedades e estirpes mais adaptas para o perfil endofítico;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.

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

BIOCONTROLE. *Plutella xylostella*. Disponível em: http://www.biocontrole.com.br/pragas/praga.php?id=plutella_xylostella. Acesso em 07/02/2008.

DEMO, C. Utilização Sistêmica de *Bacillus thuringiensis* Para o Controle de *Spodoptera frugiperda* na Cultura do Algodão. Brasília. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2006, p.56. **Dissertação de mestrado**.

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

MAGALHÃES, B. P.; ARAÚJO, A. C. G. Microscopia de fluorescência na entomopatologia. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.

MAU, R. F.L.; KESSING, J. L.M. *Plutella xylostella* (Linnaeus): *Diamondback Moth*. **Crop Knowledge Masters**. April 2007. Disponível em: <http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/Crop/Type/plutella.htm>. Acesso em: 14 de outubro de 2008.

McINROY, J.A.; KLOPPER, J.W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.895-901, 1995.

MEDEIROS, C. A. M., DIAS, J.M.C.S.; MONNERAT, R.G.; SOUZA, N R. Instalação e Manutenção de Criação Massal da Traça-das Crucíferas (*Plutella xylostella*). **Circular Técnica 29**. Brasília, Out. 2003.

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

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma Breve Revisão. Revista **Brasileira de Agrociência**. V.7, n. 2, p.1-10, 2003.

RAMOS, F. R. **Avaliação a Campo de uma Estirpe de *Bacillus thuringiensis* Tóxica à Lepidoptera e seu Possível Efeito Adverso sobre Espécies Não- Alvo**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 87 p. Dissertação de Mestrado.

SILVA, A. L.; VELOSO, V. R. S; TARDIVO, J. C.; ABREU, C. D. ; SILVA, R. M. C. E. **Avaliação de inseticidas piretróides no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* (L., 1758) em repolho**. Anais Esc. Agron. Vet., 23(1): 1993. p.7-12.

VIDEIRA, S.S.; ARAÚJO, J.L.S.; BALDINI, V. L. D. **Metodologia para Isolamento e Posicionamento Taxonomico de Bactérias Diazotróficas Oriundas de Plantas Não-Leguminosas**. Embrapa Agrobiologia, 2007.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potencial as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, v. 3, p. 1984. p.315-343,