**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Viabilização do uso de Bt para o manejo do HLB dos citros via redução da
população de *Diaphorina citri***

Tatiane da Cunha

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2018**

Tatiane da Cunha
Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas

**Viabilização do uso de Bt para o manejo do HLB dos citros via redução da
população de *Diaphorina citri***

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:

Dra. **JULIANA DE FREITAS-ASTÚA**

Co-orientador:

Dr. **MARCELO PEDREIRA DE MIRANDA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Cunha, Tatiane da

Viabilização do uso de Bt para o manejo do HLB dos citros via redução da população de *Diaphorina citri* / Tatiane da Cunha. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

106 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. *Bacillus thuringiensis* 2. *Candidatus Liberibacter asiaticus* 3. Citrus 4. Brush Border Membrane Vesicle 5. Asian Citrus Psyllid I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Valentim Cunha e Celina Piccoli,
Pelo amor, carinho, confiança e respeito. Vocês serão sempre meu melhor exemplo a
ser seguido, eu tenho orgulho em ter pais como vocês!

Ao meu irmão Thiago, sua esposa Mariane, minha afilhada Maria Eduarda e à Luiza que está
a caminho,
Pelo amor, carinho e por sempre acreditarem no meu trabalho!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar uma família maravilhosa, a qual sempre acreditou nos meus sonhos, e colocar pessoas especiais no meu caminho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-EMBRAPA), pela concessão da bolsa de estudos.

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP e ao curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de ensino.

Minha orientadora Dr^a Juliana de Freitas Astúa, que me deu a oportunidade de desenvolver este projeto, me orientando como pessoa e como profissional, ajudando na minha trajetória, sempre muito humana e preocupada com todos ao seu redor.

Ao meu co-orientador Dr. Marcelo Pedreira de Miranda, que me auxiliou muito nos experimentos de entomologia, agregando grande conhecimento nesta área e me auxiliando como profissional.

À Dr^a Rose Monnerat, pelos ensinamentos e por toda a contribuição no projeto e auxílio nos ensaios de ligação.

Ao Dr. Marcos Machado, pelos ensinamentos e por prover infraestrutura necessária para o desenvolvimento do estudo no CCSM.

Ao Centro de Citricultura ‘Sylvio Moreira’ – IAC, por toda a infraestrutura e apoio técnico nos experimentos.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus, por toda infraestrutura e apoio técnico nos bioensaios e ao Dr. Antonio Juliano Ayres, por permitir a condução do projeto junto à empresa.

À Embrapa de Recursos Genéticos – Cenargen, por toda infraestrutura e apoio técnico nos ensaios de ligação.

À banca examinadora do Exame Geral de Qualificação e da Defesa e aos demais professores e pesquisadores que participaram desta importante etapa em minha vida e pelo acréscimo ao trabalho com suas observações e conselhos.

A toda minha família, pais, irmão, cunhada, sobrinhas, primos, tios e avós, por toda estrutura emocional e apoio e por sempre acreditam nos meus sonhos.

A todos meus amigos do “Estábulo” Eduardo, Emylin, Inaiara, Diogo, Laís, Francisco, Silvia, Camila, Laura, Tiago e Paulo, vocês fizeram meus dias mais alegres e contribuíram para o crescimento de “pérolas”.

A todos meu amigos e colegas do CCSM, em especial Lury, Aline, Mariana, Evandro, Rose, Anita, Kleber, Camila, Rosangela, Leonardo, Simone, Diogo Xf, Gabi, Lísia, Paula, Amanda, Pedro Ramos, Orlene, Alex e demais estagiários, pós-graduandos e funcionários.

Aos pesquisadores do CCSM, em especial Kátia Kupper e Rodrigo Latado, que foram meus orientadores no mestrado e graduação, respectivamente, à Alessandra Souza, que me auxiliou nas análises microscópicas e Valdenice Noveli por todo apoio e disponibilizar o Laboratório de Acarologia para condução dos experimentos.

Aos meus amigos e colegas do Fundecitrus Michele, Moacir, Felipe, João, Rafael, Odimar, Arthur, Haroldo, Josiane, Dr. Nelson, Elaine, Fabrício, Sidney, Tati, Priscila, Amanda e demais estagiários, funcionários e pesquisadores.

À equipe da Embrapa-Cenargen, principalmente Cristina e Érica, que me auxiliaram nos ensaios de ligação.

Ao João Paulo Rodrigues Marques, que me auxiliou na interpretação das análises de microscopia de fluorescência.

À Marcia Oyafuso, que me acolheu em Araraquara e se tornou uma grande amiga.

Ao Rogério Machado, por apoiar meu sonho e estar presente em minha vida.

A todos que de uma maneira ou outra contribuíram durante meu doutorado.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

Nascida em 25 de maio de 1989 em Leme, SP. Iniciou sua graduação em Ciências Biológicas em março de 2007 no Centro Universitário Hermínio Ometto – Uniararas, na cidade de Araras, SP, concluindo seu bacharelado e licenciatura em dezembro de 2010. Durante a graduação, estagiou junto ao Departamento de Meio Ambiente na área de propagação *in vitro* de espécies de orquídeas, na Uniararas, Araras, SP, sob a orientação do Dr. Cristiano Pedroso de Moraes. Estagiou no Departamento de Entomologia na área de Controle Biológico de Pragas, na Esalq – USP, Piracicaba, SP, sob a orientação do Prof. Dr. José Roberto Postalí Parra. Foi bolsista de iniciação científica do CNPq-PIBIC no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Cordeirópolis, SP, atuando na área de Biologia Molecular, sob a orientação do Dr. Rodrigo Rocha Latado. Em 2011 ingressou no curso de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (FCAV-UNESP), na cidade de Jaboticabal, SP, sob a orientação da Profª. Drª. Katia Cristina Kupper, como bolsista Fapesp, realizando seu projeto de pesquisa na área de Fitopatologia e Controle Biológico, no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, na cidade de Cordeirópolis, SP, defendendo sua dissertação em dezembro de 2013. Em 2014 ingressou no curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, na cidade de Piracicaba, sob a orientação da Dra. Juliana de Freitas Astúa e co-orientação do Dr. Marcelo Pedreira de Miranda, como bolsista Capes, realizando o projeto de pesquisa na área de Controle Biológico, no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, na cidade de Cordeirópolis, SP e no Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus, Araraquara, SP.

EPÍGRAFE

*“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar,
não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a
ver o mundo”.*

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT.....	12
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1. A CITRICULTURA E O <i>HUANGLONGBING</i> (HLB).....	23
2.2. <i>DIAPHORINA CITRI</i> KUWAYAMA.....	26
2.3. MEDIDAS DE MANEJO DO HLB	27
2.4. <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> (BT), SUAS TOXINAS E MODO DE AÇÃO	29
2.4.1. APLICAÇÃO DE BT NA AGRICULTURA.....	33
2.4.2. BT ENDOFÍTICO	35
2.4.3. BT PARA CONTROLE DE <i>D. CITRI</i> EM CITROS	37
3. OBJETIVO.....	39
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1. BIOENSAIOS DE CAPACIDADE ENDOFÍTICA E PATOGENICIDADE	41
4.1.1. OBTENÇÃO DE NINFAS DE <i>DIAPHORINA CITRI</i>	41
4.1.2. OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE PLANTAS	41
4.1.3. ESTIRPES DE BT.....	42
4.1.3.1. PREPARO DO INÓCULO DE BT	42
4.1.4. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ENDOFÍTICA DE BT EM CITROS	43
4.1.4.1. ISOLAMENTO E PCR.....	43
4.1.4.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CAPACIDADE ENDOFÍTICA.....	44
4.1.4.3. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	44
4.1.5. BIOENSAIOS DE PATOGENICIDADE.....	45
4.1.5.1. CONFIRMAÇÃO DA MORTALIDADE DE <i>D. CITRI</i> OCASIONADA POR BT	47
4.1.5.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS BIOENSAIOS	48
4.2. ENSAIO DE LIGAÇÃO DAS TOXINAS CRY AOS RECEPTORES DE MEMBRANAS INTESTINAIS DE <i>D. CITRI</i>	49
4.2.1. PURIFICAÇÃO, SOLUBILIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS CRY	49
4.2.2. ATIVAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM TRIPSINA	50
4.2.3. BIOTINILAÇÃO DAS PROTEÍNAS	50
4.2.4. EXTRAÇÃO DE <i>BRUSH BORDER MEMBRANE VESICLES</i> (BBMV) DE <i>D. CITRI</i>	50
4.2.5. ENSAIO DE LIGAÇÃO.....	52
4.3. AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DAS ESTIRPES DE BT À AGROTÓXICOS UTILIZADOS EM CITROS	52
5. RESULTADOS.....	55
5.1. CONFIRMAÇÃO DA ABSORÇÃO E TRANSLOCAÇÃO DE BT IN PLANTA	55
5.1.1. ISOLAMENTO E PCR.....	55

5.1.2. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	59
5.2. BIOENSAIOS DE PATOGENICIDADE	62
5.2.1. BIOENSAIO 1 - ENSAIO SELETIVO	62
5.2.2. BIOENSAIO 2 - ENSAIO SELETIVO	64
5.2.3. CONCENTRAÇÃO LETAL DE BT PARA <i>D. CITRI</i>	66
5.2.4. VIABILIDADE DE <i>D. CITRI</i> EM MUDAS DE CITROS TRATADAS COM BT	67
5.2.5. CONFIRMAÇÃO DA MORTALIDADE DE <i>D. CITRI</i> POR OBSERVAÇÃO EM LUPA E PCR.....	69
5.3. LIGAÇÃO DAS TOXINAS CRY AOS RECEPTORES DE MEMBRANAS INTESTINAIS DE <i>D. CITRI</i>	71
5.3.1. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS CRY.....	71
5.3.2. ATIVAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM TRIPSINA	72
5.3.3. BIOTINILAÇÃO DAS PROTEÍNAS	72
5.3.4. LIGAÇÃO DAS TOXINAS CRY AOS RECEPTORES DE MEMBRANA INTESTINAIS DE <i>D. CITRI</i>	73
5.4. COMPATIBILIDADE DAS ESTIRPES DE BT À AGROTÓXICOS UTILIZADOS EM CITROS	74
6. DISCUSSÃO	77
7. CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS	91

RESUMO

Viabilização do uso de Bt para o manejo do HLB dos citros via redução da população de *Diaphorina citri*

A citricultura se destaca como uma das mais importantes atividades do agronegócio brasileiro, sendo o estado de São Paulo o principal produtor mundial de laranja e o maior exportador de suco concentrado e congelado. O psíldeo dos citros (*Diaphorina citri*) tornou-se nos últimos anos um dos mais importantes vetores na cultura, devido à transmissão de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ e ‘*Ca. L. americanus*’, bactérias associadas ao *huanglongbing* (HLB), principal doença da citricultura atual. Uma vez que não há variedades comerciais de citros resistentes ao HLB, seu manejo é baseado no uso de mudas sadias, erradicação de plantas infectadas e pelo controle químico do vetor. No entanto, o custo elevado e os significativos danos ambientais causados pelos inseticidas químicos, associados à possibilidade da seleção de populações de psíldeos resistentes a esses produtos, têm levado à busca por estratégias alternativas de manejo do vetor do HLB que sejam mais adequadas e sustentáveis. Nosso grupo tem tentado contribuir nesse sentido, com a prospecção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* (Bt) patogênicos ao psíldeo. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram: (a) Confirmar a capacidade endofítica e a patogenicidade de estirpes de Bt em *seedlings* e mudas de citros com diferentes combinações de copa/porta-enxerto; (b) Determinar a concentração letal (CL₅₀) necessária para ocasionar mortalidade em populações de *D. citri*; (c) Estudar a interação entre toxinas Cry e receptores de membrana do intestino de ninfas e (d) Avaliar a compatibilidade das estirpes selecionadas com agrotóxicos comumente utilizados na citricultura. Os bioensaios realizados com *seedlings* e mudas de citros demonstraram que as estirpes de Bt (Cyt1A, Cry2Aa, Cry4A, Cry10, Cry11, S1302, S1450 e S1989) translocaram endofiticamente nas plantas, mantendo sua viabilidade e, em sua maioria, o potencial patogênico para ninfas de *D. citri*. Para *seedlings*, os valores de mortalidade passaram de 80% para as estirpes S1302 e S1450. Foram observados esporos e células vegetativas de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* expressando *green fluorescent protein* (Btk::GFP), visualizados por microscopia de fluorescência, aderidos principalmente aos elementos de vasos e no xilema, obtidas de amostras seccionadas transversal e longitudinalmente, de caule e raiz de *seedlings* e mudas de laranja Pera. A CL₅₀ e CL₈₀ para a estirpe S1302 foi de $4,92 \times 10^4$ esporos/mL e $6,63 \times 10^7$ esporos/mL, respectivamente. Já para a estirpe S1450, 50% de mortalidade das ninfas testadas foi estimada em $2,19 \times 10^4$ esporos/mL, e a CL₈₀ foi de $6,18 \times 10^8$ esporos/mL, quando utilizadas suspensões de esporos da bactéria diretamente no substrato de *seedlings* de laranja Pera. Os ensaios de ligação demonstraram que todas as toxinas Cry presentes nas estirpes S1302, S1450 e S1989 (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab2, Cry1B e Cry11) interagiram com os receptores de membrana intestinal, *brush border membrane vesicles* (BBMV's), obtidos de ninfas de *D. citri*. Ensaios *in vivo* evidenciaram que as estirpes S1302 e S1450 mostraram-se compatíveis com todos os agrotóxicos comumente utilizados na citricultura, ainda que os produtos à base de cobre e o inseticida Dimetoato tenham sido deletérios em aplicações diretas na bactéria *in*

vitro. Esses dados evidenciam a possibilidade do uso de Bt como bioinseticida no manejo integrado do HLB.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*; *Candidatus Liberibacter asiaticus*; *Citrus* sp; Vesículas da borda escovada da membrana apical de células do intestino; Psílídeo dos citros

ABSTRACT

Feasibility of the Bt use for reduction of *Diaphorina citri* population and improved citrus HLB management

Citriculture is one the most important activities of Brazilian agribusiness, and the State of São Paulo being the world's leading orange producer and the largest juice exporter. Asian citrus psyllid – ACP (*Diaphorina citri*) has become one of the most important vectors in the citriculture in recent years, due to the transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and ‘*Ca. L. americanus*’, bacteria associated with huanglongbing (HLB), the main citrus disease worldwide. Nowadays there are no commercial citrus varieties resistant to HLB, and its management is based on the use of healthy nursery citrus trees, eradication of symptomatic plant from the orchards, and vector chemical control. However, excessive cost and environmental damage due to application of chemical insecticides associated with the possibility of selection of ACP resistant populations, have led researchers to pursue alternative strategies for the management of HLB. Our group has contributed with the screening of *Bacillus thuringiensis* (Bt) strains with potential against ACP. Therefore, our objectives were: (a) to confirm Bt endophytic translocation in citrus seedlings and nursery trees with different scion-rootstock combinations and to evaluate their pathogenicity against *D. citri*; (b) to estimate the lethal concentration (LC₅₀ and LC₈₀) to *D. citri* nymphs; (c) to study the interaction between Cry toxins and brush border membrane vesicle (BBMV) of the midgut *D. citri* nymphs, and (d) to evaluate the compatibility of pesticides with the selected Bt strains. The bioassays with citrus seedlings and nursery trees demonstrated that the Bt strains (Cyt1A, Cry2Aa, Cry4A, Cry10, Cry11, S1302, S1450 and S1989) translocated from roots to young leaves, maintaining their viability and pathogenicity against *D. citri* nymphs. For the seedlings, we found mortality values up to 80% for strains S1302 and S1450. Btk::GFP spores and vegetative cells were visualized by fluorescence microscopy in citrus seedlings and nursery trees adhered mainly to vessels and xylem, from roots to stems, in cross-section analyses. LC₅₀ and LC₈₀ for strain S1302 were 4.92×10^4 spores/mL and 6.63×10^7 spores/mL, respectively. For strain S1450, 50% mortality of nymphs tested was estimated at 2.19×10^4 spores/mL, and LC₈₀ was 6.18×10^8 spores/mL, when bacterial spore suspensions were applied to citrus seedlings. Binding assays demonstrated that all Cry toxins present in strains S1302, S1450 and S1989 (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab2, Cry1B and Cry11) interacted with the BBMV obtained from *D. citri* nymphs. *In vivo* assays showed that strains S1302 and S1450 were compatible with all pesticides commonly used in citrus orchards, although copper-based pesticides and dimethoate insecticide were incompatible *in vitro* with Bt strains. Our results demonstrate the potential of using Bt as systemic bioinsecticide in the future in HLB management.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; *Candidatus Liberibacter asiaticus*; Citrus; *Brush border membrane vesicle*; Asian Citrus Psyllid

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sintomas de HLB em plantas cítricas. (A) Presença de fluxos de ramos amarelados e setorizados na copa da planta. (B) Folha com mosqueamento e espessamento de nervura. (C) Fruto com coloração desuniforme. (D) Sementes normais e abortadas. (E) Fruto assimétrico com espessamento e distorção da columela central. (F) Queda de folhas e frutos. Imagens: A, B, D, E e F (Fundecitrus); C (Freitas-Astúa, J.) 25
- Figura 2.** *Diaphorina citri*. (A) Ovos em brotação de planta cítrica; (B) Ninfas de 1º a 5º instar; (C) Adulto se alimentando em murta. Imagens: A: Cunha, T.; B e C: Fundecitrus. 26
- Figura 3.** Modo de ação de toxinas Cry (cristal) produzidas durante a fase de esporulação do Bt no intestino de insetos na fase imatura. Fonte: Jurat-Fuentes & Jacksony (2013). 32
- Figura 4.** (A) Ninfas de *D. citri* (3º instar) em ramos de murta; (B) Transferência de ninfas para brotações de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’; (C) Ninfas transferidas em brotações de citros; (D) Ninfas se alimentando nas brotações com presença de *honeydew* (aumento de 10 ×). 46
- Figura 5.** Montagem do bioensaio 5. (A) Confinamento, em *voil*, de fêmeas de *D. citri* copuladas em brotações de *seedlings* e mudas de citros com diferentes combinações copa/porta-enxerto; (B) A seta indica a fêmea ovipositando na brotação; (C) Confirmação da presença de ovos após o período de aproximadamente 24 horas. 47
- Figura 6.** Colônias de *B. thuringiensis* isoladas a partir de brotações de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ (120 horas após a inoculação com Bt), em meio Embrapa (com eritromicina para estirpes recombinantes) após 16 horas de cultivo em B.O.D. a 28 °C ±2. 55
- Figura 7.** Confirmação das colônias de estirpes de *B. thuringiensis* obtidas do isolamento de brotações de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’. Visualização de fragmentos de DNA em gel de agarose a 1%, correspondente aos produtos de PCR com *primers* específicos para cada estirpe. 1Kb: marcador de peso molecular, N - Controle negativo. As bandas correspondem às colônias positivas para cada estirpe de Bt correspondente: Cyt1A - 522 pb; Cry2Aa - 470 pb; Cry4A - 459 pb; Cry10 - 348 pb; Cry11 - 305 pb; S1302 (gene *cryIAb* - 216 pb); S1450 (gene *cryIAb* - 216 pb) e S1989 (gene *cryII* - 305 pb). 56
- Figura 8.** Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) das estirpes de Bt após 120 horas de aplicação da suspensão bacteriana no substrato de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ utilizados nos bioensaios. As concentrações (eixo x) representam a quantidade de esporos/mL aplicada para cada estirpe correspondente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os valores correspondem à média de dois bioensaios. 57
- Figura 9.** Média de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) das estirpes de *B. thuringiensis*, obtidas pelo isolamento de folhas do ápice (brotações) de mudas utilizadas no Bioensaio 5, após 5, 10 e 30 dias da aplicação dos tratamentos (DAA). Identificação dos tratamentos: 1) Controle (água) em *seedlings* de laranjeira ‘Pera’; 2) Controle (água) em laranjeira ‘Pera’ sobre limoeiro ‘Cravo’; 3) Controle (água) em

laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro Cravo; 4) Controle (água) em laranjeira ‘Valência’ sobre citrumelo Swingle; 5) Estirpe S1302 inoculada em *seedlings* de laranjeira ‘Pera’; 6) S1302 em laranjeira ‘Pera’ sobre limoeiro ‘Cravo’; 7) S1302 em laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’; 8) S1302 em laranjeira ‘Valência’ sobre citrumelo Swingle; 9) Estirpe S1450 inoculada em *seedlings* de laranjeira ‘Pera’; 10) S1450 em laranjeira ‘Pera’ sobre limoeiro ‘Cravo’; 11) S1450 em laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’; 12) S1450 em laranjeira ‘Valência’ sobre citrumelo Swingle. 58

Figura 10. Amostras de caule e raiz retiradas de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ e utilizadas para as análises de microscopia de fluorescência para detecção de Btk::GFP. Me: Medula; Fl: Floema; Xl: Xilema; Ct: Córtex; Ep: Epiderme 59

Figura 11. Cortes transversais do caule (1, 3, 5 e 7) e raiz (2, 4, 6 e 8) de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ após 24 (1 e 2), 72 (3 e 4) e 120 horas (5 e 6) de inoculação com Btk::GFP (estirpe S2032). As imagens 7 e 8 correspondem ao controle não inoculado. As amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX61) (aumento de 1000 ×). As imagens A correspondem à luz transmitida, B ao filtro GFP, C ao filtro WG, e as imagens D correspondem às imagens compostas (projetadas no Image-Pro MC 6.1), destacando o Btk::GFP no tecido da planta. Abreviações: Ev: elemento de vaso; Xl: xilema; P: parênquima; Me: Medula; Rp: Raio parenquematóico; Cv: Câmbio vascular; Rv: raio vascular. 60

Figura 12. Cortes longitudinais do caule (1 e 2) e raiz (3 e 4) de mudas de laranjeira ‘Pera’ enxertadas sobre limoeiro ‘Cravo’ após 120 horas de inoculação com Btk::GFP (estirpe S2032). As amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência. As imagens A correspondem à luz transmitida, B ao filtro GFP, C ao filtro WG, e as imagens D correspondem às imagens compostas, destacando o Btk::GFP no tecido da planta. Abreviações: Ev: elemento de vaso; Xl: xilema; RS: raiz secundária. As setas destacam o Btk::GFP..... 62

Figura 13. Bioensaio 1 – Ensaio seletivo. Avaliação da mortalidade de ninfas de *D. citri* transferidas de murta para brotações de *seedlings* de laranjeira Pera, após 24, 72 e 120 horas de aplicação dos tratamentos diretamente no substrato (Controle - água, estirpes de *B. thuringiensis* recombinantes: Cyt1A, Cry2Aa, Cry4A, Cry10 e Cry11; estirpes selvagens: S1302, S1450 e S1989). As barras correspondem ao erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os valores correspondem à média de dois bioensaios..... 63

Figura 14. Bioensaio 2 – Ensaio seletivo. Avaliação da mortalidade de ninfas de *D. citri* transferidas para *seedlings* de laranjeira ‘Pera’, após 24, 48 e 120 horas da aplicação com os tratamentos (Controle – água; estirpes de *B. thuringiensis* recombinantes: Cry10 e Cry11; estirpes selvagens: S1302 e S1450). As barras correspondem ao erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os valores correspondem à média de dois bioensaios..... 65

Figura 15. Bioensaio com diferentes concentrações de esporos de Bt entomopatogênicos para ninfas de *D. citri*, transferidas de murta para brotações de *seedlings* de laranjeira Pera, após 120 horas de inoculação com os tratamentos diretamente no substrato (estirpes S1302 e S1450 nas concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 esporos/mL, água como controle). As barras correspondem ao erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os valores correspondem à média de dois bioensaios. 67

Figura 16. Avaliação da viabilidade de ninfas de *D. citri*, após a oviposição de fêmeas em brotações de diferentes combinações de copa/porta-enxerto. Os tratamentos correspondem às estirpes de Bt S1302, S1450 (107 esporos/mL) e controle (água destilada). As letras maiúsculas correspondem às combinações de copa/porta-enxerto: P: seedlings de laranjeira ‘Pera’; P/R: laranjeira ‘Pera’ sobre limoeiro ‘Cravo’; V/R: laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ e V/CS: laranjeira ‘Valência’ sobre citrumelo Swingle. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. As barras correspondem ao erro padrão. Os valores correspondem à média de dois bioensaios..... **68**

Figura 17. Avaliação visual, em microscópio estereoscópico binocular (Olympus), da mortalidade de ninfas de *D. citri* durante os bioensaios de patogenicidade. As setas pretas indicam as ninfas mortas e as setas vermelhas a exúvia das ninfas. A) Controle (água destilada), B) estirpe S1302 e C) estirpe S1450..... **70**

Figura 18. Isolamento das estirpes de Bt a partir do *pool* de ninfas mortas que se alimentaram em *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ inoculados com Bt. As ninfas foram coletadas durante as avaliações diárias de mortalidade e avaliadas em *pool* de amostras. As colônias obtidas foram visualizadas em lupa estereoscópica binocular (Olympus) após 16 horas de cultivo em B.O.D. a 28 °C ±2..... **70**

Figura 19. Confirmação de colônias de Bt obtidas a partir de *pool* de ninfas de *D. citri* mortas, após a alimentação em *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ tratados com a bactéria. 1Kb: marcador de peso molecular, N - Controle negativo para cada estirpe, as bandas correspondem às colônias positivas para cada estirpe de Bt correspondente visualizadas em gel de agarose a 1% utilizando produtos de PCR com *primers* específicos: Cyt1A – fragmento de 522 pb; Cry2Aa - 470 pb; Cry4A - 459 pb; Cry10 - 348 pb; Cry11 - 305 pb; S1302 (gene cry1Ab – 216 pb); S1450 (gene cry1Ab – 216 pb) e S1989 (gene cry11 – 305 pb)..... **71**

Figura 20. Ativação das proteínas de Bt com tripsina (SDS-PAGE a 12%). M: Marcador de massa molecular Rainbow da GE Healthcare. Proteínas ativadas: 1) Cry1Aa, 2) Cry1Ab, 3) Cry1Ac, 4) Cry2Aa, 5) Cry2Ab2, 6) Cry1B e 7) Cry11..... **72**

Figura 21. Biotinilação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab2, Cry1B e Cry11 observadas em SDS-PAGE a 12%. As bandas correspondem às proteínas ativas e biotiniladas..... **72**

Figura 22. Proteínas ativadas e biotiniladas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab2, Cry1B e Cry11, ligadas aos receptores intestinais de *D. citri*. Os sinais positivos indicam a ligação das proteínas aos receptores..... **73**

Figura 23. Proteínas ativadas e biotiniladas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry11, ligadas aos receptores intestinais de *D. citri*. Os sinais positivos indicam a ligação das proteínas aos receptores..... **73**

Figura 24. Unidade formadora de colônias (UFC) por mililitro das estirpes S1302 e S1450 em placas de Petri contendo meio de cultura Embrapa acrescido de agrotóxicos, conforme recomendação do fabricante. Identificação dos tratamentos: 1) Abamectina; 2) Espirodiclofeno; 3) Hidróxido de cobre; 4) Imidacloprido; 5) Oxícloreto de cobre; 6) Óxido cuproso; 7) Piraclostrobina; 8) Dimetoato; 9) Trifloxistrobina + Tebuconazole; 10) Controle - meio Embrapa sem a adição de agrotóxicos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade..... **74**

Figura 25. Colônias de *B. thuringiensis* das estirpes S1302 (A) e S1450 (B) em placas de Petri contendo meio de cultura Embrapa acrescido de agrotóxicos, conforme recomendação do fabricante. Identificação dos tratamentos: 1) Abamectina; 2) Espirodiclofeno; 3) Hidróxido de cobre; 4) Imidacloprido; 5) Oxicloreto de cobre; 6) Óxido cuproso; 7) Piraclostrobina; 8) Dimetoato; 9) Trifloxistrobina + Tebuconazole; 10) Controle meio Embrapa sem a adição de agrotóxicos. As setas destacam as colônias de Bt. 75

Figura 26. Unidade formadora de colônias (UFC) por mililitro das estirpes S1302 e S1450 em placas de Petri contendo meio de cultura Embrapa, após o isolamento de folhas (brotações) do ápice de *seedlings* de laranjeira Pera inoculados com as estirpes de *B. thuringiensis* e posteriormente tratados com os seguintes tratamentos: 1) Abamectina; 2) Espirodiclofeno; 3) Hidróxido de cobre; 4) Imidacloprido; 5) Oxicloreto de cobre; 6) Óxido cuproso; 7) Piraclostrobina; 8) Dimetoato; 9) Trifloxistrobina + Tebuconazole; 10) Controle – água. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. 75

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** *Primers* utilizados para a detecção das estirpes de Bt recombinantes (expressando somente o gene *cyt1A*, *cry2Aa*, *cry4A*, *cry10* ou *cry11*) e selvagens (estirpe S1989 - gene para detecção *cry11*; estirpes S1302 e S1450 - gene para detecção *cry1Ab*), por PCR convencional..... **44**
- Tabela 2.** Agrotóxicos registrados para a cultura de citros no Brasil e utilizados nos testes de compatibilidade com as estirpes de *B. thuringiensis* (S1302 e S1450)..... **54**
- Tabela 3.** Estimativa das CL_{50} e CL_{80} (em esporos mL^{-1}) e intervalo de confiança de estirpes de *B. thuringiensis* para ninfas de *D. citri* em *seedlings* de laranjeira Pera..... **66**
- Tabela 4.** Análise fatorial referente ao bioensaio de viabilidade de ninfas de *D. citri* em mudas de citros tratadas com Bt (média de dois bioensaios). As médias do Fator 1 (com e sem a aplicação das estirpes de *B. thuringiensis*) e Fator 2 (*seedlings* ou mudas de citros com diferentes combinações de copa/porta-enxerto) são referentes à porcentagem de viabilidade de *D. citri* após a oviposição de fêmeas nas brotações de citros. Os tratamentos correspondem às estirpes de Bt S1302, S1450 (10^7 esporos/mL) e controle (água destilada), assim como as combinações de copa/porta-enxerto..... **69**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\times g$	Velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
μg	micrograma
μL	microlitro
ALP	fosfatase alcalina
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APN	aminopeptidase N
B.O.D.	<i>Incubator Bio-Oxygen Demand</i>
BBMV	<i>Brush border membrane vesicles</i>
BSA	Albumina sérica bovina
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Btk	<i>Bacillus thuringiensis</i> subespécie kurstaki
CaLaf	<i>Candidatus Liberibacter africanus</i>
CaLam	<i>Candidatus Liberibacter americanus</i>
CaLas	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>
CCSM	Centro de Citricultura Sylvio Moreira
CDR	receptores do tipo caderina
CL ₅₀	Concentração letal que mata 50% da população testada
CL ₈₀	Concentração letal que mata 80% da população testada
cm	centímetros
Cry	<i>Crystal insecticidal protein</i>
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Cyt	<i>Cytolytic insecticidal protein</i>
DAA	dias após a aplicação
DAI	dias após a inoculação
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	Ácido etileno glicol tetracético
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA	<i>Enviromental Protection Agency</i>
EUA	Estados Unidos da América
Fundecitrus	Fundo de Defesa da Citricultura
<i>gfp</i>	<i>green fluorescent protein</i>

GL	Graus de liberdade
GPI	glicosil fosfatidil-inositol
h	horas
HAA	horas após a aplicação
HAI	horas após a inoculação
HLB	<i>Huanglongbing</i>
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
kDa	Kilodalton
m	Massa
M	Massa molar
mA	miliampère
MDa	Megadalton
mg	miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	mililitros
mM	milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
nM	nanomolar
OGM	Organismo geneticamente modificado
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoride
RNA	Ácido ribonucléico
RPM	Rotação por minuto
UFC	Unidade formadora de colônia
UR	Umidade relativa
UV	ultravioleta
v	volume
VIP	<i>Vegetative insecticidal protein</i>
W	<i>Watts</i>

1. INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das mais importantes atividades do agronegócio, sendo os cítricos o quarto grupo de frutas mais consumidas no mundo e o suco, derivado da laranja, a bebida de fruta mais consumida (Neves et al. 2010). Dentre os citros, as laranjas doce são as mais plantadas e consumidas, principalmente como suco *in natura* e concentrado (Bové & Ayres, 2007). A última estimativa de safra de laranja realizada no cinturão citrícola, abrangendo municípios do estado de São Paulo e Minas Gerais, situados nas regiões do Triângulo Mineiro e Sudoeste do estado, prevê que para 2017/18, a safra deverá ser de 385,20 milhões de caixas (Fundecitrus, 2017a). Entretanto, apesar dos elevados números relacionados ao setor, a incidência de pragas e doenças tem causado muitos prejuízos, e consequentemente, danos econômicos. Esses danos estão correlacionados à redução do parque citrícola devido, principalmente, a problemas ocasionados pelo *huanglongbing* (HLB), principal e mais importante doença dos citros no mundo (Bové, 2006).

O HLB está associado a bactérias Gram negativas, restritas ao floema, pertencentes ao gênero *Candidatus Liberibacter* (Gottwald, 2010). Essas bactérias espalham-se sistemicamente pela planta que, depois de infectada, se torna importante fonte de inóculo. A transmissão dessas bactérias ocorre via psílídeos, sendo *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae), o mais importante (Yamamoto et al., 2006). Uma vez infectada, não se conhecem métodos que curem a planta doente, que pode apresentar morte econômica em poucos anos e finalmente morte biológica (Bové, 2006).

O manejo do HLB inclui o uso de material vegetativo sadio produzido sob telado, a remoção e destruição de plantas contaminadas e sintomáticas, e o controle local e regional do vetor por meio de inseticidas (Belasque Jr. et al., 2009; Bassanezi et al., 2013). No entanto, o uso contínuo e intenso de agrotóxicos, além de onerar o produtor, pode ocasionar efeitos colaterais, como surtos de pragas secundárias, aparecimento de populações de psílídeos resistentes, além de significativos danos ambientais e à saúde do consumidor (Yamamoto et al., 2009; Tiwari et al., 2012).

Dessa forma, esforços visando estratégias menos nocivas e mais sustentáveis para manejar o psílídeo e, consequentemente, o HLB, vêm sendo realizado por vários grupos de pesquisa. Dentre as principais alternativas estudadas estão o uso de inimigos naturais, como o parasitoide *Tamarixia radiata* (Waterson) (Hymenoptera: Eulophidae) (Aubert et al., 1996; Parra et al., 2010), a utilização de ferramentas biotecnológicas, como o silenciamento de genes do psílídeo por meio de RNA de interferência (RNAi) (El-Shesheny et al., 2013; Hajeri et al., 2014; Hawkings et al., 2014; Killiny, et al. 2014; Ramos et al., 2014; Galdeano et al., 2017) e a utilização de fungos

entomopatogênicos ao psílídeo, como *Isaria fumosorosea* (Samson, 1974; Subandiyah et al., 2000; Meyer et al., 2008; Mascarín et al., 2015; Ausique et al., 2017).

Dentro da linha de controle biológico com a utilização de entomopatógenos, nosso grupo inovou ao testar estirpes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), amplamente utilizada como agente de controle biológico de insetos, para controlar o psílídeo dos citros (Balbinotte, 2011; Dorta, 2014; Cunha et al., 2017). O que diferencia o Bt de outras bactérias é a síntese de inclusões cristalinas que contêm tipicamente proteínas inseticidas conhecidas como δ -endotoxinas ou protoxinas Cry (cristal) e Cyt (citolítica), produzidas durante a fase de esporulação (Bideshi et al., 2013; Crickmore et al., 2015). Essas proteínas, quando ingeridas, possuem ação tóxica específica a diversas ordens de insetos, principalmente Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, mas há relatos do efeito patogênico para mais de 150 espécies de insetos (Jisha et al., 2013). Entretanto, até recentemente, não parecia viável a utilização de Bt para insetos sugadores, uma vez que o modo de ação dessas bactérias ocorre pela ingestão, e seu uso era associado, no caso de pragas agrícolas, principalmente a insetos mastigadores. Foi então que o grupo de pesquisa da Dra. Monnerat descobriu estirpes de Bt que se movimentam de maneira endofítica em plantas de algodão (Monnerat et al., 2003). A partir desses resultados, pesquisas foram conduzidas na tentativa de se ampliar o espectro de ação de Bt para outras ordens de insetos, incluindo Hemiptera, à qual pertence *D. citri*.

Em trabalho pioneiro com citros, nosso grupo desenvolveu bioensaios com ninfas de *D. citri* e verificou que as estirpes testadas possuem potencial de utilização para o controle do psílídeo. As estirpes de Bt, cedidas pela Dra. Monnerat, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foram capazes de movimentar-se em *seedlings* de laranjeira Pera e ocasionar mortalidade em ninfas de 3º ínstar do psílídeo que delas se alimentavam (Balbinotte, 2011; Dorta, 2014; Cunha et al., 2017). Estas estirpes foram selecionadas para continuação dos experimentos, em duas linhas de pesquisa, sendo uma linha voltada para a produção de plantas geneticamente modificadas expressando genes *cry* (dados não publicados) e outra voltada para a avaliação do seu potencial no controle de *D. citri* em diferentes combinações de copa/porta-enxerto, visando à viabilização de Bt como ferramenta no manejo do HLB.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A citricultura e o *Huanglongbing* (HLB)

A citricultura destaca-se como uma das mais importantes atividades do agronegócio brasileiro, com grande visibilidade internacional em função da produção e comercialização de suco de laranja concentrado e congelado. Segundo o Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), a estimativa de safra de laranja para 2017/18 do principal parque citrícola do Brasil - que engloba municípios de São Paulo e Minas Gerais – está prevista para 385,20 milhões de caixas de 40,8 kg, sendo Pera e ‘Valência’ as variedades responsáveis pela maior parte desta produção (Fundecitrus, 2017a). Entretanto, a área de laranja plantada vem caindo ao longo dos anos, tanto no Brasil, como nos Estados Unidos, que atualmente ocupam o quarto lugar na produção mundial de laranja (USDA, 2015; Fundecitrus, 2017a). Essa queda deve-se à redução do parque citrícola devido, principalmente, a problemas ocasionados pelo HLB, a principal e mais importante doença de citros no mundo (Bové, 2006).

A citricultura está alicerçada em uma estreita variabilidade genética, que associada a problemas de déficit hídrico e incidência de pragas e doenças, diminuem a produtividade nacional. Dentre as principais doenças dos citros, o HLB é considerado a mais devastadora em todo o mundo. Em países da Ásia, onde o HLB é endêmico e ocorre há décadas, a enfermidade foi responsável pelo declínio do agronegócio citrícola em diversas regiões (Bové, 2006). Nas Américas, foi observado pela primeira vez em São Paulo, Brasil, em 2004 (Coletta Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005). Em 2008, a instrução normativa (IN) 53 determinou que plantas sintomáticas para HLB devem ser eliminadas dos pomares. A doença está presente em 16,73% das laranjeiras do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro. A incidência, divulgada pelo Fundecitrus, permanece no mesmo patamar há dois anos – 17,89% em 2015 e 16,92% em 2016. Apesar da estabilização, o índice de plantas doentes é alto (Fundecitrus, 2017a). O HLB foi relatado pela primeira vez no mundo em 1919, no sul da China, disseminando-se por países da Ásia, África, Oceania e América. Atualmente, o HLB está presente em todas as regiões produtoras de citros no mundo, com exceção do mediterrâneo (Kuchment, 2013; Parra et al., 2017).

Dos 402.566 hectares de laranja plantados no cinturão citrícola, 97% equivalem às variedades Hamlin, Westin, Rubi, Valência Americana, Valência Argentina, Seleta, Pineapple, Pera Rio, João Nunes, Valência, Valência Folha Murcha e Natal. Dentre essas variedades, Pera Rio e Valência representam a maior área, com 34 e 29%, respectivamente (Fundecitrus, 2017b).

Com relação aos porta-enxertos, apesar de uma tendência lenta de substituição do tradicional limoeiro Cravo por outros genótipos, principalmente citrumelo Swingle, a citricultura nacional ainda é amplamente amparada no primeiro, com 85% e 90% da produção de laranjeiras sobre Cravo em São Paulo e na Bahia, respectivamente (Almeida & Passos, 2011).

O HLB está associado às bactérias '*Candidatus Liberibacter africanus*' (CaLaf, que ocorre apenas na África), '*Ca. L. americanus*' (CaLam, que ocorre apenas no Brasil, de maneira cada vez mais esporádica), '*Ca. L. asiaticus*' (CaLas, que é a espécie prevalente em todo o mundo). Essas bactérias, pertencentes ao grupo das α -Proteobactérias, são Gram-negativas e restritas ao floema (Coleta Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005; Bové, 2006; Gottwald, 2010), espalham-se sistemicamente pela planta e, portanto, borbulhas infectadas também são capazes de transmiti-las e têm se mostrado importantes fontes de inóculo em países sem políticas rígidas de produção de matrizes e mudas, como em vários países da América Central e do Caribe (Gottwald, 2010). Experimentalmente, podem ser transmitidas por *Cuscuta* spp. e apresentam como hospedeiras alternativas vinca (*Catharanthus rosea*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e fumo (*Nicotiana tabacum*) (Hilf et al., 2013).

Bactérias associadas ao HLB são encontradas, na maioria das vezes, individualmente no floema, e devido ao seu tamanho reduzido (dois μm de comprimento; 0,1 - 0,2 μm de diâmetro), translocam livremente pelas placas crivadas, não formando agregados visíveis, capazes de bloquear o floema. Entretanto, com o aumento da colonização da bactéria *in planta*, observa-se um aumento da expressão dos genes envolvidos com a síntese de proteína P e calose, e com o acúmulo e deposição dessas substâncias nos poros da placa crivada, o transporte de fotoassimilados para órgãos-drenos, como folhas, flores, frutos e raízes são impedidos e/ou dificultados. Devido a este fator, o amido fica acumulado nos plastídeos no parênquima vascular, em elementos do floema e pecíolo, contribuindo para o desenvolvimento dos sintomas da doença (Kim et al., 2009; Koh et al., 2012).

Em condições de campo, as bactérias são transmitidas por psilídeos, sendo *D. citri* (Yamamoto et al., 2006) responsável pela disseminação da doença nos países asiáticos e americanos; *Trioza erytreae* (Hemiptera: Triozidae) (Del Guercio, 1918), espécie vetora de CaLaf nos países africanos (Bové, 2006). A inoculação da bactéria por vetores geralmente ocorre nos tecidos jovens das plantas, de onde as bactérias migram do floema até as raízes, onde se replicam, causando perda destes tecidos, e na ocorrência de novos fluxos vegetativos, a bactéria se movimenta sistemicamente pela planta (Johnson et al., 2014; Sales, 2015).

Uma vez infectada, não se conhecem métodos que curem a planta doente. O tempo necessário para o aparecimento dos sintomas de HLB varia de acordo com o genótipo, a fase

fisiológica e a idade da planta, o tecido utilizado como fonte de inóculo, a intensidade da inoculação pelo psíldeo e a estação do ano, podendo variar entre seis meses e mais de um ano (Mafra et al., 2013). Os sintomas da doença são similares àqueles causados por deficiência de micronutrientes em folhas jovens ou ainda pela presença de fluxos de ramos amarelados e setorizados na copa da planta cítrica (Figura 1). Ocorre queda de folhas e frutos, que apresentam tamanho reduzido e assimétrico, columela central distorcida, abortamento de sementes e coloração desuniforme com predomínio da cor verde na face voltada para o interior da planta. Há significativa redução do número de radículas, sendo que plantas infectadas com HLB apresentam morte econômica em poucos anos e morte biológica com o ataque severo da bactéria (Bové, 2006).

Figura 1. Sintomas de HLB em plantas cítricas. (A) Presença de fluxos de ramos amarelados e setorizados na copa da planta. (B) Folha com mosqueamento e espessamento de nervura. (C) Fruto com coloração desuniforme. (D) Sementes normais e abortadas. (E) Fruto assimétrico com espessamento e distorção da columela central. (F) Queda de folhas e frutos. Imagens: A, B, D, E e F (Fundecitrus); C (Freitas-Astúa, J.).

Todas as variedades comerciais de citros são comprovadamente suscetíveis ao HLB, mas há clara resposta diferencial de *Citrus* spp. em relação à doença, sendo que algumas espécies podem ser consideradas mais tolerantes (Folimonova et al., 2009; Wang & Trivedi, 2013). Recentemente, Ramadugu et al. (2016) avaliaram a resposta de citros e plantas próximas quanto à

tolerância ao HLB e identificaram dois genótipos aparentemente imunes, seis resistentes e 14 tolerantes, sendo a resistência e alto nível de tolerância observadas em gêneros próximos a citros.

2.2. *Diaphorina citri* Kuwayama

D. citri (Figura 2), principal vetor de bactérias associadas ao HLB, é um inseto pequeno, com comprimento médio de 3 mm na fase adulta. O psíldeo se alimenta em folhas de qualquer estágio de desenvolvimento, sendo facilmente reconhecido por se posicionarem com a linha do corpo formando um ângulo de 45° com a superfície da planta (Hall et al., 2013). Segundo Nava et al. (2007), os adultos atingem maturidade sexual por volta de 10 dias após emergência, sendo que as fêmeas podem colocar até 800 ovos, a maioria logo na primeira semana após o início do período de oviposição. A cópula varia de 18 a 50 minutos e as fêmeas colocam seus ovos, preferencialmente, em gemas foliares novas, axila das folhas e em brotações entre o estágio vegetativo V1 a V3 (Cifuentes-Arenas et al., 2018).

A duração do ciclo biológico da *D. citri* é bastante variada e dependente da temperatura, podendo ser de 43,5 dias a 18° C ou de apenas 12,1 dias a 32° C (Nava et al., 2007). O psíldeo pode se desenvolver em várias espécies da família Rutacea, sendo os hospedeiros mais adequados a murta (*Murraya paniculata*) e a laranjeiras da variedade ‘Valência’ (Tsai & Liu, 2000; Alves et al., 2014; Sales, 2015).

Figura 2. *Diaphorina citri*. (A) Ovos em brotação de planta cítrica; (B) Ninfas de 1° a 5° instar; (C) Adulto se alimentando em murta. Imagens A: Cunha, T.; B e C: Fundecitrus.

O psíldeo adquire a bactéria ao ingerir a seiva do floema a partir de plantas infectadas e transmite para plantas saudáveis ao salivar nos vasos do floema (Aubert, 1987; Ferreira et al., 2013). Canale et al. (2016) verificaram que o período latente médio (tempo de aquisição após o qual 50% dos indivíduos podem inocular a bactéria) foi de 16,8 e 17,8 dias, para psídeos adquirirem *Ca. L. asiaticus* por ninfas e adultos, respectivamente, após um período de acesso a aquisição de 48 horas.

Um menor período de latência foi observado quando ninfas adquiriam a bactéria durante 96 horas, demonstrando que a aquisição da bactéria por ninfas é mais eficiente.

Estudos demonstraram que além da bactéria se multiplicar no vetor, pode ocorrer transmissão transovariana, ou seja, fêmeas infectivas são capazes de transmitir a bactéria verticalmente para sua progênie. ‘*Ca. L. asiaticus*’ também pode ser transmitida horizontalmente, durante a cópula, de machos infectados para fêmeas, porém com baixa eficiência. Entretanto não foi observada a transmissão da bactéria de fêmeas para machos durante a cópula (Pelz-Stelinski et al., 2010; Mann et al., 2011)

2.3. Medidas de manejo do HLB

Na falta de genótipos resistentes ao HLB, as medidas de controle recomendadas têm sido baseadas nos princípios de exclusão e erradicação de Whetzel, citadas por Gottwald (2010). As medidas de erradicação incluem a remoção e a destruição das plantas contaminadas e sintomáticas, o que no Brasil tem caráter legal em função da Instrução Normativa (IN 53) de 16 de outubro de 2008 (Belasque Jr. et al., 2009). As medidas de exclusão incluem o uso de material vegetativo sadio, produzido sob telado.

Apesar da severidade da doença e dos danos causados por ‘*Ca. Liberibacter spp.*’, essas bactérias são extremamente dependentes de insetos vetores para que ocorra sua disseminação (Da Graça, 1991; Miranda et al., 2011); sendo assim, o controle químico (com inseticidas sistêmicos e/ou de contato) do vetor é uma das principais formas de controle. Tem sido recomendado o manejo regional do psíldeo, pois o inseto é capaz de migrar para outras áreas e ampliar os focos da doença (Bassanezi et al., 2013). Assim, o que se vê no campo é grande frequência de pulverizações, sendo comum aplicações quinzenais - e, em algumas propriedades, semanais - de inseticidas.

No entanto, o uso contínuo, intenso e indiscriminado de agrotóxicos, além de onerar o produtor, pode levar a efeitos colaterais, como surtos de pragas secundárias, aparecimento de populações de psíldeos resistentes a inseticidas, além de significativos danos ambientais (Tiwari et al., 2012; Miranda et al., 2017; Pardo et al., 2017). Dessa forma, esforços visando estratégias alternativas menos nocivas e mais sustentáveis para manejar o psíldeo e, conseqüentemente, o HLB, vêm sendo despendidos por vários grupos de pesquisa, as quais serão apresentadas a seguir. Algumas pesquisas estão sendo voltadas para o controle de *Candidatus Liberibacter sp.*, agente causal do HLB, diretamente com a utilização de antibióticos combinados ou não com termoterapia (Doud et al., 2014; Fan et al., 2014, 2016; Liu et al., 2014; Zhang et al., 2014; Canales et al., 2016).

Estes estudos, apesar de apresentarem resultados significativos de redução da bactéria *in planta*, tornam-se pouco viáveis economicamente para aplicação em campo, pois além do elevado custo para utilização destas tecnologias, existe ainda a possibilidade de surgir linhagens da bactéria resistentes aos antibióticos, além da possibilidade de os mesmos deixarem algum resíduo nos frutos, consumidos *in natura*.

Dentro do controle cultural de *D. citri*, novas tecnologias vêm sendo consideradas promissoras, como a utilização de manto metalizado (*mulching*), que reduziu significativamente as populações do inseto e a incidência de HLB (Croxtton & Stansly, 2014); plásticos filmes bloqueadores de UV – que diminuem a habilidade do psíldeo em encontrar a planta hospedeira (Miranda et al., 2015); ou até mesmo a cobertura de plantas com um filme de partículas minerais, como o caulim, visando diminuir os estímulos visuais do inseto para a localização do hospedeiro (Miranda et al., 2017).

Dentre as alternativas biotecnológicas que vêm sendo buscadas para o controle do vetor, destaca-se o uso de silenciamento de genes do psíldeo por RNA de interferência (RNAi) (El-Shesheny et al., 2013; Hajeri et al., 2014; Hawkings et al., 2014; Killiny, et al. 2014; Ramos et al., 2014; Galdeano et al., 2017). El-Shesheny et al. (2013) conseguiram silenciar um gene responsável pela formação de asas em ninfas de 5º ínstar de *D. citri* e a expectativa é que essa técnica possibilite a diminuição da população do inseto e/ou de sua capacidade vetora. Outra ferramenta promissora é a produção de plantas repelentes ao inseto, como recentemente reportado por Alquézar et al. (2017), ao demonstrar que a liberação de compostos voláteis oriundos de goiaba e expressos em *Arabidopsis* geneticamente modificadas, repelem o psílido e inibem sua resposta de atração ao odor cítrico.

Na cultura dos citros, o controle biológico clássico, com o emprego de parasitoides e/ou predadores, tem demonstrado potencial de utilização prática (Parra et al., 2010; Miranda et al., 2011). Um dos inimigos naturais mais tradicionais para *D. citri* é o parasitoide *T. radiata*, usado com sucesso, em conjunto com mudas saudáveis, nas Ilhas Reunião (Aubert et al., 1996). Nos países com relatos recentes de HLB, como o Brasil, EUA, México e Costa Rica, criações desse parasitoide têm sido estabelecidas visando ao controle do psíldeo (Parra et al., 2016). No entanto, seu uso na citricultura industrial é restrito em função da utilização de inseticidas, que também afetam *T. radiata* (Lira et al., 2015; Santos et al., 2015). No Brasil, a utilização do parasitoide tem sido empregada em áreas de produção orgânica, devido às diferentes táticas de manejo utilizadas; em áreas de grande ocupação de murta – hospedeira natural de *D. citri*, visando incrementar a população do parasitoide no campo; além da possibilidade de liberações

inoculativas em áreas urbanas, principalmente em municípios produtores de laranja (Carvalho, 2008; Parra et al., 2010).

O controle biológico do psíldeo com a utilização de predadores já foi relatado para joaninhas das espécies *Harmonia axyridis* (Pallas), *Olla v-nigrum* (Mulsant), *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus) e *Exochomus cildreni* Mulsant (Michaud, 2004), estudadas como potenciais agentes de controle. No entanto, de acordo com Parra et al. (2010), no Brasil, o controle do psíldeo dos citros por meio da atividade predatória é relativamente baixo se comparado ao verificado nos EUA, provavelmente em função da excessiva aplicação de inseticidas para o controle do vetor.

Na linha microbiológica, estudos têm relatado elevada eficiência de fungos entomopatogênicos em colonizar psíldeos, incluindo *Isaria fumosorosea* Wize (*Paecilomyces fumosoroseus*) (Samson, 1974; Subandiyah et al., 2000; Meyer et al., 2008; Mascarin et al., 2015; Ausique et al., 2017); *Hirsutella citriformis* Speare (Rivero-Aragon & Grillo-Ravelo, 2000; Subandiyah et al., 2000; Étienne et al., 2001); *Lecanicillium longisporum* e *Lecanicillium muscarium* (Petch) R. Zare and W. Gams (*Verticillium lecanii*) (Xie et al., 1988; Rivero-Aragon & Grillo-Ravelo 2000); *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Rivero-Aragon & Grillo-Ravelo 2000; Yang et al., 2006); *Cladosporium* sp. nr. *oxysporum* Berk. & M.A. Curtis (Aubert, 1987); *Capnodium citri* Berk. (Aubert, 1987) e *Metarhizium anisopliae* (Lezama-Gutiérrez et al., 2016).

Entre os fungos entomopatogênicos, destaca-se *I. fumosorosea* utilizado como base para formulação de produtos, principalmente na América do Norte e Europa para o controle de mosca branca, afídeos e pulgão (Avery et al., 2014; Orduño-Cruz et al., 2015). Nesse âmbito, pesquisas têm sido conduzidas utilizando isolados de *I. fumosorosea* para produzir o primeiro biopesticida à base de fungo contra *D. citri* no Brasil (Ausique et al., 2017).

Na busca por novas ferramentas para o manejo do inseto vetor do agente causal do HLB, nosso grupo inovou ao prospectar estirpes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), amplamente utilizada como agente de controle biológico de insetos, para controlar o psíldeo dos citros (Balbinotte, 2011; Dorta, 2014; Cunha et al., 2017).

2.4. *Bacillus thuringiensis* (Bt), suas toxinas e modos de ação

B. thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram positiva em forma de bastonete, aeróbia, podendo crescer facultativamente em anaerobiose (Praça et al., 2007). Foi encontrada pela primeira vez em 1901 no Japão pelo bacteriologista Ishiwata em larvas do bicho-da-seda, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae), mas apenas em 1911, na Alemanha, o pesquisador Berliner conseguiu isolá-la e caracterizá-la. Bt é conhecida como a bactéria mais bem-sucedida no controle

microbiano contra diferentes ordens de insetos pragas na agricultura. Além disso, os genes da bactéria também são utilizados, eficientemente, para o aumento da resistência de plantas a insetos em culturas geneticamente modificadas (Carrière et al., 2015).

Recentemente, novos estudos avaliaram o potencial da utilização de Bt na toxicidade contra nematóides, ácaros e carrapatos; efeitos antagônicos contra patógenos a plantas, animais e/ou fungos; promoção do crescimento de plantas; biorremediação de metais pesados e outros poluentes; biossíntese de nanopartículas de metal; produção de poli-hidroxialcanoato e em propriedades biopolímeras e anticancerígenas (devido às parasporinas) (Jouzani et al., 2017). Na agricultura, o principal interesse ao Bt ocorre devido à produção de inclusões cristalinas que contêm tipicamente proteínas inseticidas conhecidas como δ -endotoxinas ou protoxinas Cry (cristal) e Cyt (citolítica) produzidas durante a fase de esporulação (Bideshi et al., 2013; Crickmore et al., 2015).

Além da produção das proteínas Cry, o Bt pode produzir outras toxinas inseticidas como α -exotoxina (Krieg, 1971); β -exotoxina ou thuringiensina (Habib & Andrade, 1998) e Vip (*vegetative insecticidal protein*) (Estruch et al., 1996); entretanto, as mais estudadas são as δ -endotoxinas.

Uma estirpe de Bt pode produzir mais de um tipo de cristal, que podem ser bipiramidais, cuboides, romboides, ovóides, esféricos ou, ainda, sem forma definida (Habib & Andrade, 1998), formados por uma ou mais toxinas. O peso molecular dessas proteínas pode variar entre 13,6 e 142 kDa. Uma espécie de inseto pode ser afetada por mais de uma estirpe da bactéria, pois esta frequentemente produz diferentes proteínas inseticidas (Fiúza & Berlitz, 2009). As proteínas Cry são codificadas por genes *cry* que estão localizados, em sua maioria, em grandes plasmídeos (Crickmore et al., 2016). A expressão das toxinas é regulada por dois mecanismos, sendo que o primeiro é dependente de fatores sigma específico da fase de esporulação, onde está baseada a classificação da maioria dos genes *cry*, e o outro independente do processo de esporulação, como o gene *vip δ* , cujos fatores são típicos da fase de crescimento vegetativo (Valadares-Inglis et al., 1998; Polanczyk & Alves, 2003).

As proteínas Cry estão classificadas em 74 grupos organizados em diferentes subgrupos, e são codificadas nos genes *cry*, sendo atualmente descritas mais de 950 genes de toxinas. Bt produz ainda três grupos de toxinas Cyt, que são codificadas por 11 genes *cyt*, e quatro grupos de proteínas Vip, agrupadas em função do grau de identidade de seus aminoácidos (Crickmore et al., 2016).

Dentre as proteínas Cry, existem três grandes grupos: o Cry de três domínios, (3d-Cry), o Cry tipo binário (Bin-like Cry) e o Cry mosquitocida (Mtx-like Cry), sendo o 3d-Cry o

mais bem caracterizado (Palma & Berry, 2016; Berry & Crickmore, 2017). As toxinas 3d-Cry determinam a interação entre os receptores de membrana e os oligômeros, no processo de ligação, conferindo a especificidade na inserção das proteínas (Bravo et al., 2011). Dentro do grupo das proteínas de 3 domínios, encontramos toxinas com atividade contra insetos de várias ordens, principalmente para Lepidoptera e um menor número de toxinas são conhecidas para Diptera, Coleoptera, e com pequenos números ativos para Hymenoptera e Hemiptera, bem como toxinas que afetam nematóides e gastrópodes; entretanto, há relatos do efeito patogênico em mais de 150 espécies de insetos (Jisha et al., 2013; Palma et al., 2014a; Berry & Crickmore, 2017).

As δ -endotoxinas (Valadares-Inglis et al., 1998) apresentam individualmente um espectro de ação, normalmente, restrito a uma ordem em particular (De Maagd et al., 2001). As proteínas Cry são inclusões parasporais de Bt que exibem efeito tóxico a um organismo alvo ou possuem uma sequência bastante similar a uma proteína Cry conhecida. Já as proteínas Cyt são inclusões proteicas parasporais de Bt que exibem atividade citolítica ou possuem sequência similar a uma proteína Cyt conhecida. O cristal é formado a partir do segundo estágio de esporulação e é liberado no momento em que as células são lisadas (Monnerat & Bravo, 2000).

Uma vez ingeridas por insetos, as protoxinas, que possuem tamanho aproximado de 130kDa, são proteoliticamente ativadas em peptídeos tóxicos, pela ação do pH alcalino ou ácido do intestino do inseto, liberando proteínas de menor massa molecular (aproximadamente 60 kDa) (Bravo et al., 2011; Chougule & Bonning, 2012; Soberón et al., 2012). Após a ativação, as proteínas são ligadas a receptores específicos localizados na membrana de células do intestino médio, ocasionando lise das células epiteliais e consequente morte das larvas ou ninfas por inanição (Figura 3). Adicionalmente, os esporos podem colonizar, germinar e se replicar na hemolinfa dos insetos, ocasionando morte por septicemia (Palma et al., 2014a).

As proteínas Cry possuem pelo menos três diferentes mecanismos de ação (Palma et al., 2014a; Melo et al., 2016; Bravo et al., 2017). Em dois deles, ocorre um desequilíbrio osmótico em resposta à formação de poros na membrana celular, seguida de morte pelo choque osmótico nas células intestinais, e diferem-se pelas interações com os receptores e a inserção na membrana intestinal. O terceiro modelo caracteriza-se pela transdução de sinal presente em receptores de caderina, levando à morte das células do intestino médio (Melo et al., 2014; 2016; Bravo et al., 2017).

Figura 3. Modo de ação de toxinas Cry (cristal) produzidas durante a fase de esporulação do Bt no intestino de insetos na fase imatura. Fonte: Jurat-Fuentes & Jacksony (2013).

Os receptores responsáveis pela ligação da toxina à membrana de células intestinais têm sido alvo de estudos, a fim de determinar a especificidade, toxicidade e mecanismo de ação das toxinas Cry para diferentes ordens de insetos (Bravo et al., 2017). A especificidade do inseto pode ser mediada por qualquer uma das etapas supracitadas, como por exemplo, mudanças na atividade da proteinase; entretanto, um dos fatores mais determinantes para a ligação das toxinas é a especificidade dos receptores de membrana intestinal (Berry & Crickmore, 2017).

Muitos receptores de toxina Cry presentes na superfície do intestino médio têm sido relatados, dos quais os mais bem caracterizados são os receptores aminopeptidase N (APN), fosfatase alcalina (ALP) e caderina (CDR) (Bravo et al., 2017). Estudos demonstram que a caderina desempenha papel fundamental sobre o mecanismo de ação de toxinas Cry1A em lepidópteros, sendo que esta toxina tem a função de direcionar a ligação para um segundo receptor que pode ser uma APN ou ALP, facilitando a inserção da toxina na membrana (Bravo et al., 2012; Gomez et al., 2014).

A estrutura tridimensional das toxinas 3d-Cry está diretamente ligada ao tipo de interação com os diferentes tipos de receptores presentes no intestino médio dos insetos da ordem Lepidoptera. Cada domínio tem uma participação dentro do mecanismo, sendo o domínio I composto por várias estruturas α -hélices (7 a 8) em volta da α -hélice 5, que possui

característica hidrofóbica, interferindo nos eventos de inserção na membrana e formação do poro. O domínio II possui uma estrutura em β -folha e está envolvido com a união das proteínas aos receptores da membrana e oligomerização. O domínio III atua na união com o receptor e possivelmente na inserção na membrana (Adang et al., 2014). O processo de ligação das toxinas Cry aos receptores de membrana é considerado um passo crítico, porém não suficiente para determinar a atividade patogênica, sendo esta determinada por meio de bioensaios (Jurat-Fuentes & Crickmore, 2016).

2.4.1. Aplicação de Bt na agricultura

O uso do Bt na agricultura tem grandes vantagens, uma vez que essas bactérias não poluem o ambiente, são de fácil manipulação, inócuas ao homem e aos animais domésticos. Esta bactéria tem grande importância no controle biológico de pragas, seja por meio de biopesticidas ou da produção de plantas transgênicas (Carrière et al., 2016).

No mercado de bioinseticidas, os produtos à base de *B. thuringiensis* têm a maior quota de mercado (Glare & O'Callaghan, 2000) e representavam 53% dos bioinseticidas vendidos mundialmente na primeira década deste século (CPL Business Consultants, 2010), sendo utilizados com sucesso em programas de proteção de culturas, principalmente para lagartas, e controle vetorial em todo o mundo. No entanto, produtos à base de Bt permanecem ativos no campo por curto período de tempo após a sua aplicação, devido principalmente à exposição a fatores ambientais, como chuva e radiação UV (Joung & Côté, 2000), além da inviabilidade do uso para insetos sugadores e/ou com habitats crípticos (ou seja, perfuradores), que não são atingidos pela pulverização usual por contato (Soberón & Bravo, 2007).

A maior parte dos bioinseticidas baseia-se em preparações de esporos-cristais derivados de algumas estirpes do tipo selvagem, tais como *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) HD1 que expressam as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa; HD73 que produz Cry1Ac; *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD137 que sintetiza Cry1Aa, Cry1B, Cry1Ca e Cry1Da; *B. thuringiensis* subsp. San Diego e *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, que produzem a toxina Cry3Aa; e *B. thuringiensis* subsp. *israelenses* (Bti) contendo as toxinas Cry4A, Cry4B, Cry11A e Cyt1Aa (Bravo et al., 2011). Essas formulações podem ser na forma sólida (em pó ou granulada) ou líquida, e grande parte dos produtos formulados é aplicada em pulverizações visando ao controle de larvas jovens. Há pouca informação disponível sobre a persistência de Bt e de suas protoxinas no solo; no entanto, estudos demonstram que esporos de *Bacillus* spp. podem permanecer viáveis em laboratórios ou ambientes rurais por décadas (Van Cuyk et al., 2011). De

acordo com Vettori et al. (2003), foram encontradas células e toxinas de Btk no solo 28 meses após a pulverização. Entretanto, a exposição a fatores ambientais como lixiviação e radiação UV diminuem a atividade patogênica após a aplicação, sendo esta viável por aproximadamente dois dias apenas (Joung & Côté, 2000). Duchet et al. (2014) verificaram que Bti persistiu por um período de 75 dias em campo, sendo encontrada com maior abundância em substratos que contêm matéria orgânica em comparação com aqueles contendo apenas areia.

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 2014), as vantagens dos biopesticidas sobre os agrotóxicos convencionais são, basicamente: menor toxicidade, maior especificidade e menor poluição ambiental. Biopesticidas à base de Bt correspondem a apenas 1% do “share” de agroquímicos (Jisha et al., 2013). Por outro lado, vem crescendo constantemente a produção e o uso de plantas transgênicas expressando genes que codificam as toxinas produzidas por Bt. O uso de culturas Bt aumentou consideravelmente desde a sua introdução há mais de 20 anos, quando, em 1996, o algodão-Cry1Ac foi comercializado para melhorar o controle das maiores pragas de Lepidoptera: *Heliothis virescens* F. (Lepidoptera: Noctuidae), *Helicoverpa zea*, Boddie, (Lepidoptera: Noctuidae) and *Pectinophora gossypiella*, Saunders, (Lepidoptera: Gelechiidae). De 1996 a 2014, o total mundial de culturas Bt plantadas foi de 648 milhões de hectares, sendo milho e algodão, a maioria (James, 2014). A soja Bt foi plantada no Brasil em 2013 e 2014 com total cumulativo de 7,4 milhões de hectares (James, 2014). Em 2015, o milho Bt representou 81% do milho e o algodão Bt 84% de algodão plantados nos EUA (USDA, 2015; Carrière et al., 2016).

Dois são os motivos principais para o aumento da área plantada de organismos geneticamente modificados expressando toxinas Bt ao invés do uso de bioinseticidas à base dessa bactéria: o primeiro é a disponibilização das toxinas-Bt aos insetos-alvo, normalmente lepidópteros ou coleópteros, uma vez que, como bioinseticidas, as toxinas precisam estar disponíveis na superfície da planta para serem ingeridas por eles, e a lixiviação reduz a disponibilidade de toxinas. O segundo motivo é a sensibilidade das toxinas Cry à luz ultravioleta (UV), podendo causar a degradação, reduzindo assim a eficiência do produto (Sanahuja et al., 2011).

Com a característica de estirpes de Bt colonizarem plantas endofiticamente identificada por Monnerat et al. (2003), talvez seja possível preparar formulações que possam minimizar os problemas supracitados. Uma formulação biopesticida deve assegurar a estabilidade durante os processos de produção, processamento e armazenamento do bioproduto; proteger a formulação em condições ambientais e pode ainda aumentar a atividade biopesticida (Jones & Burges, 1998; Hynes & Boyetchko, 2006; Chen et al., 2013). Dentre as várias substâncias utilizadas em

formulações experimentais incluem-se a lactose, peptona, goma arábica, xantana, celulose, alginato de potássio, alginato de sódio, talco, caulim, vermiculita, terra de diatomácea, entre outras (Schisler et al., 2004; Moretini & Melo, 2007; Özaktan & Bora, 2004; Araújo, 2008). Outra tecnologia recentemente aplicada em formulações de biopesticidas é a encapsulação. Esta técnica não só fornece proteção em ambientes desfavoráveis, mas também melhora a sua estabilidade (Brar et al., 2006; Chen et al., 2013).

Considerando todos esses fatores, as pesquisas estão sendo voltadas para a identificação de novas toxinas Cry, desenvolvimento de novas formulações e plantas geneticamente modificadas expressando genes *cry*. As culturas Bt têm sido amplamente utilizadas para o controle de insetos-praga nos últimos 20 anos e embora sejam identificados claros benefícios ambientais e econômicos, o uso desta ferramenta é ameaçado pela rápida evolução da resistência de artrópodos-alvo às toxinas. Para dificultar essa ameaça, são utilizadas principalmente áreas de refúgios e plantas e/ou produtos piramidados, que possuem duas ou mais toxinas Bt efetivas contra a mesma praga (Carrière et al., 2016).

No Brasil, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) estabeleceu normas de segurança e pareceres técnicos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente para todas as atividades com organismos geneticamente modificados (OGM) e seus derivados, as quais estão disponíveis no site da CTNBio (<http://www.ctnbio.gov.br>) com normas específicas para a liberação planejada no meio ambiente de OGMs (Instrução Normativa CTNBio nº 17, de 17.11.98). Essa normativa apresenta procedimentos que se aplicam à liberação, no Brasil, de OGMs no meio ambiente para experimentos em campo ou em outro meio (Pinto & Fiuza, 2008).

2.4.2. Bt endofítico

Microrganismos endofíticos vivem no interior das plantas sem causar prejuízos à hospedeira, sendo que muitas vezes contribuem para sua defesa por meio da competição com fitopatógenos, produção de metabólitos e indução de resistência sistêmica, além de em alguns casos atuarem como bactérias promotoras de crescimento vegetal pela produção ou indução da síntese de substâncias reguladoras (Polli et al., 2012; Costa, 2014; Lacava & Azevedo, 2014; Vaz, 2014). Bt é uma bactéria de ocorrência ubíqua (Krywunczyk & Fast, 1980), sendo encontrada em todas as partes do mundo, e seus esporos podem ser isolados de diversos ambientes como o solo, rizosfera, filoplano, água, a partir de pós de grãos e de insetos e crustáceos, anelídeos e mamíferos insetívoros (Raymond et al., 2010). Embora muito se saiba sobre a patologia de *B. thuringiensis*

contra invertebrados, a compreensão de sua ecologia natural ainda é limitada (Vidal-Quist et al., 2013).

O primeiro relato de Bt como endofítico foi feito por Monnerat et al. (2003) ao isolarem a bactéria a partir de tecido de plantas de algodão. Bt endofítico foi relatado também para plantas de feijão (Maduell et al., 2007; Maduell et al., 2008; García-Suárez et al., 2017), repolho (Praça et al., 2012; Vaz, 2014), leguminosas (Tanuja & Pankaj, 2013), café (Miguel et al., 2013), milho, soja (Vaz, 2014; Costa, 2014) e em *Arabidopsis thaliana* (García-Suárez et al., 2017). A partir desses resultados, pesquisas foram feitas na tentativa de se ampliar o espectro de ação de Bt para outras ordens de insetos, incluindo os sugadores (Jurat-Fuentes & Jackson, 2013; Costa, 2014; Caixeta, 2015, García-Suárez et al., 2017). Monnerat et al. (2009) inocularam uma estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* marcada com o gene *gfp* (Btk::GFP) e comprovaram que plantas de algodão foram capazes de absorver a bactéria aplicada no solo, protegendo-as contra insetos que se alimentam do floema por várias semanas. Melatti et al. (2010) estudaram a ação patogênica de algumas estirpes de Bt para *Aphis gossypii*, e verificaram a mortalidade do pulgão em folhas de algodoeiro tratadas com Bt.

Estudos sugerem que o mecanismo de penetração de *B. thuringiensis* na planta pode ocorrer por aberturas e lesões nas raízes, estômatos, ferimentos e até mesmo por meio de enzimas hidrolíticas, translocando-se pelo xilema até atingir as folhas apicais (Hallmann et al., 1997; McCully, 2001; Praça et al., 2012). O potencial endofítico de Bt pode ser melhorado artificialmente, tornando-se uma estratégia alternativa de controle de pragas, semelhante às culturas Bt, onde cristais são protegidos da luz solar e da lixiviação pela chuva (Raymond et al., 2010). Recentemente, García-Suárez et al. (2017) comprovaram a transmissão de uma estirpe de Bt para uma próxima geração (F1) de *A. thaliana* obtidas a partir de sementes tratadas com a bactéria. Estes resultados indicam que o Bt foi capaz de translocar das raízes ao meristema floral das plantas parentais, onde permaneceu viável dentro das sementes diferenciadas até a germinação, provando a transferência vertical da bactéria e demonstrando que o Bt endofítico pode ser transmitido por gerações.

A colonização endofítica de plantas por Bt tem amplo interesse em diversas áreas, como na fitorremediação de metais pesados (Babu et al., 2013), no controle de fitopatógenos (Zhou et al., 2008; Hong et al., 2016; Djenane et al., 2017) e de insetos sugadores e/ou perfuradores (Monnerat et al., 2009; Melatti et al., 2010; Praça et al., 2012). Visando a utilização de Bt endofítico para controle de fitopatógenos, estudos realizados por Tao et al. (2014) comprovaram que estirpes de Bt foram capazes de controlar *Urocystis tritici*, fungo patogênico ao trigo. Gond et al. (2015) relataram que espécies endofíticas de *Bacillus* produziram lipopeptídeos antifúngicos

que induziram a expressão de genes de defesa em plantas de milho. Recentemente, análises de sequências do genoma de uma estirpe endofítica de Bt (KB1) mostraram um agrupamento de genes que poderiam sintetizar metabólitos que auxiliam na resistência de plantas a fitopatógenos (Hong et al., 2016; Jeong et al., 2016). Já no controle de insetos, Melatti et al. (2010) utilizaram estirpes de Bt endofíticas para o controle de *A. gossypii* em algodão. Praça et al. (2012) estudaram a utilização de estirpes de Bt para o controle de *Plutella xylostella* Linnaeus, (Lepidoptera: Yponomeutidae), inseto críptico em repolho, e demonstraram que o Bt foi capaz de se movimentar endofiticamente, controlando o inseto. Entretanto, ainda são necessários mais estudos visando à utilização de Bt endofítico para uma agricultura viável e mais sustentável.

2.4.3. Bt para controle de *D. citri* em citros

Insetos sugadores (Hemiptera) não são particularmente suscetíveis às toxinas de Bt encontradas naturalmente na superfície das plantas (Chougule & Bonning, 2012; Rausch et al., 2016). *D. citri*, por exemplo, utiliza aparatos bucais estiletares para se alimentar no floema (Bonani et al., 2010), resultando em uma exposição natural mínima às toxinas de Bt que, geralmente, estão presentes no solo e/ou nas superfícies das folhas. Em trabalhos pioneiros com citros, nosso grupo desenvolveu bioensaios com *D. citri* e verificou que a bactéria foi capaz de movimentar-se em *seedlings* de laranjeira Pera e ser recuperada pelo isolamento de folhas do ápice (Balbinotte, 2011). O fato da bactéria se movimentar endofiticamente em plantas é extremamente interessante, principalmente visando ao controle de insetos sugadores (como mencionado no item 2.4.2). Após o screening com 21 estirpes de Bt, provenientes do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, coordenado pela Dra. Rose Monnerat, três foram consideradas promissoras, pois ocasionaram mortalidade de até 75% das ninfas de 3º instar do psílideo (Balbinotte, 2011; Dorta, 2014).

Essas três estirpes, já caracterizadas pelo grupo da Dra. Monnerat, produzem várias toxinas, sendo que a estirpe S1989 possui seis genes *cry/cyt*, a estirpe S1302 dois genes *cry* e a estirpe S1450 seis genes *cry*. Assim, Dorta (2014) obteve com a Dra. Monnerat estirpes de Bt transformadas com genes únicos para 10 das 13 toxinas identificadas e testou cada um deles individualmente. Estas estirpes foram selecionadas para continuação dos experimentos em duas linhas de pesquisa, sendo uma linha voltada para a produção de plantas geneticamente modificadas expressando genes *cry* (dados não publicados) e outra voltada para avaliar o potencial destas estirpes como potenciais bioinseticidas e selecionar a melhor delas para o controle de *D. citri* em

diferentes combinações de copa/porta-enxerto, visando à viabilização de Bt endofítico para o controle do psílídeo, vetor de bactérias associadas ao HLB.

3. OBJETIVO

Selecionar estirpes de *Bacillus thuringiensis* com capacidade de translocar endofiticamente em citros e reduzir a população de ninfas de *Diaphorina citri*.

3.1. Objetivos específicos

- a) Confirmar a translocação endofítica e a patogenicidade de estirpes de Bt a *D. citri* em *seedlings* e em mudas de laranja doce com diferentes combinações copa/porta-enxerto;
- b) Verificar a translocação de Btk::GFP em *seedlings* de laranjeira Pera;
- c) Determinar a concentração letal necessária para ocasionar mortalidade da população de ninfas de *D. citri* para as estirpes selecionadas;
- d) Avaliar a interação das toxinas Cry (presentes nas estirpes de Bt selecionadas) com os receptores de membrana intestinal - *brush border membrane vesicles* (BBMV's) - de ninfas de *D. citri*;
- e) Determinar a compatibilidade de agrotóxicos, comumente utilizados na cultura dos citros, com as estirpes de Bt selecionadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Bioensaios de capacidade endofítica e patogenicidade

4.1.1. Obtenção de ninfas e adultos de *Diaphorina citri*

Adultos e ninfas de *D. citri* foram obtidos da colônia do Fundecitrus, originada da colônia do Departamento de Entomologia da Esalq utilizando murta [*Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae)] como hospedeira. Os insetos eram livres da bactéria *Ca. L. asiaticus*, e mantidos em mudas de murta em sala climatizada (25 ± 2 °C; UR $60\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas). Para a oviposição, murtas com brotações novas foram infestadas com 60 adultos/muda com idade de uma a três semanas após a emergência, considerando-se uma proporção de machos e fêmeas de 1:1 (Nava et al., 2007). Após um período de sete dias de oviposição, os adultos foram retirados, e os insetos que emergiram foram utilizados nos experimentos.

4.1.2. Obtenção e manutenção de plantas

Para os bioensaios foram utilizadas plantas de laranja doce em pé franco sendo: a) *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] com cerca de seis meses de idade e aproximadamente 15 cm de comprimento produzidas em tubetes (100 mL). Para os experimentos envolvendo mudas, foram testadas combinações copa/porta-enxerto (com aproximadamente 50 cm de comprimento, após a realização da poda para indução de brotação), selecionadas em função da importância atual (área plantada) e perspectiva de importância futura (produção de mudas em viveiros comerciais), sendo estas: a) mudas de laranjeira ‘Pera’ sobre limoeiro ‘Cravo’ [*Citrus limonia* (L.) Osbeck]; c) ‘Valência’ (*C. sinensis*) sobre limoeiro ‘Cravo’ e d) ‘Valência’ sobre citrumelo Swingle [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf $\times$ *Citrus paradisi* Macf] com um ano e meio de idade, produzidas em sacos plásticos de 5 L. Todas as plantas foram produzidas em substrato MultplantCitrus® (casca de pinus 80%, carvão vegetal 5% e vermiculita 15%), em viveiro certificado e mantidas no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” (CCSM) e no Fundecitrus.

4.1.3. Estirpes de Bt

Para os bioensaios, foram utilizadas estirpes de Bt selecionadas em testes preliminares, que demonstraram potencial para o controle de ninfas de *D. citri* (Balbinotte, 2011; Dorta, 2014). Foram utilizadas três estirpes selvagens, contendo dois ou mais genes *cry/cyt*, sendo estas: S1302 - *B. thuringiensis* (que sintetiza as toxinas Cry1Ab e Cry3A), S1450 - *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* - HD-1 (Btk) (sintetizando as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry2Aa e Cry2Ab) e S1989 - *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) (com a produção das toxinas Cry4A, Cry4B, Cry10, Cry11, Cyt1A e Cyt1B) e cinco estirpes recombinantes com apenas um gene *cry* ou *cyt* (expressando as toxinas Cyt1A, Cry2Aa, Cry4A, Cry10 ou Cry11).

Em adição, a estirpe S2032 (Btk) transformada, que expressa *green fluorescent protein* (*gfp*), foi utilizada para investigar a absorção e translocação de Bt em *seedlings* de laranja Pera. Essa proteína, quando exposta à luz ultravioleta, emite fluorescência verde permitindo a detecção da bactéria no material observado (Azevedo et al., 2002).

As estirpes foram cedidas pela Dra. Rose Monnerat, curadora da coleção de *B. thuringiensis* do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e mantidas de acordo com a metodologia descrita no Protocolo da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*), conforme descrito em Monnerat et al. (2001).

4.1.3.1. Preparo do inóculo de Bt

As estirpes foram multiplicadas de acordo com o protocolo de conservação de microrganismos estabelecido no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Tiras de papel filtro de 1,5 × 0,5 cm contendo esporos de Bt foram colocadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 30 mL de meio de cultura Embrapa (8 g/L caldo nutriente; 1 g/L extrato de levedura; 1 g/L KH₂PO₄; 1 mg/L CaCO₃; 1 mg/L MgSO₄ 7H₂O; 0,1 mg/L FeSO₄ 7H₂O; 0,1 mg/L MnSO₄ 7H₂O; 0,1 mg/L ZnSO₄ 7H₂O; pH 7,0), acrescido de eritromicina (15 mg/mL) para as estirpes recombinantes (Monnerat et al., 2007) e mantidas a 28°C em incubador rotativo a 200 rpm por 72 h (tempo normalmente necessário para esporulação máxima).

O cultivo foi acompanhado em microscópio Leica DM750 P em aumento de 1000 vezes. Após 72-76 h, uma alíquota foi retirada da cultura e verificada a presença de esporos e cristais. A concentração foi ajustada por meio de diluições seriadas utilizando água destilada autoclavada e com auxílio de uma câmara de Neubauer foi realizada a contagem de esporos, para

a padronização dos experimentos. Esse procedimento foi realizado anteriormente à montagem de cada bioensaio para garantir a qualidade do inóculo.

4.1.4. Avaliação da capacidade endofítica de Bt em citros

4.1.4.1. Isolamento e PCR

Para confirmar a translocação da bactéria em *seedlings* de laranjeira ‘Pera’, utilizados nos bioensaios seletivos e de concentração letal (item 4.1.5.), foram feitos isolamentos de Bt a partir de folhas (uma folha/repetição) do ápice (brotações onde os insetos se alimentaram), 120 horas após a aplicação (HAA). Para confirmar a translocação de Bt em mudas de citros com diferentes combinações de copa/porta-enxerto foram avaliadas folhas (uma folha/repetição) de brotações das mudas utilizadas no bioensaio de viabilidade de *D. citri* (item 4.1.5.), sendo que para mudas foram realizados isolamentos 5, 10 e 30 dias após a aplicação (DAA). As folhas coletadas foram esterilizadas superficialmente em soluções de hipoclorito de sódio 2,5%, etanol 70% e água Milli-Q (duas vezes) e maceradas, individualmente, em almofariz contendo 1 mL de solução salina (8,5 g/L NaCl).

Para a detecção das estirpes de Bt, uma alíquota de 100 µL do macerado foi cultivada em meio Embrapa sólido (acrescido de eritromicina para as estirpes recombinantes) e incubada por 16-24 h a 28°C. As colônias obtidas foram confirmadas a partir da purificação do DNA. Uma alçada de cada colônia foi transferida para tubos contendo 100 µL de água destilada esterilizada e as suspensões foram congeladas a -80 °C durante 20 min e em seguida, transferidas para blocos de aquecimento (100 °C) durante 10 min para a lise celular. O lisado de células resultante foi centrifugado por 5 min a 10.000 rpm, e 2 µL do sobrenadante foi utilizado como molde de DNA para a PCR (adaptado de Bravo et al., 1998). A confirmação das unidades formadoras de colônias (UFC) de Bt obtidas do isolamento das brotações foi realizada por PCR convencional utilizando *primers* específicos para cada gene *cry* ou *cyt* (Tabela 1) e pela visualização em aparelho MVX10® Stereomicroscope (Olympus).

Tabela 1. *Primers* utilizados para a detecção das estirpes de Bt recombinantes (expressando somente o gene *cyt1A*, *cry2Aa*, *cry4A*, *cry10* ou *cry11*) e selvagens (estirpe S1989 - gene para detecção *cry11*; estirpes S1302 e S1450 - gene para detecção *cry1Ab*), por PCR convencional.

Nome da Sequência	Sequência 5' - 3'	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de Anelamento (°C)	Referência
Gral-cyt(d) (cyt1A) (<i>forward</i>)	AACCCCTCAATCAACAGCAAGG	522	51	Bravo et al. (1998)
Gral-cyt(d) (cyt1A) (<i>reverse</i>)	GGTACACAATACATAACGCCACC			
cry1 esp. cry1Ab (<i>forward</i>)	AACAACCTATCTGTTCTTGAC	216	53	Cerón et al. (1995)
cry1 esp. cry1Ab (<i>reverse</i>)	CTCTTATTATACTTACACTAC			
spe-cry2Aa (<i>forward</i>)	CAAGCGAATATAAGGGAGT	470	50	Mendoza et al. (2012)
spe-cry2Aa (<i>reverse</i>)	TAGCGCCAGAAGATACCA			
cry4Aspe (<i>forward</i>)	TCAAAGATCATTTCAAAATTACATG	459	50	Ibarra et al. (2003)
cry4Aspe (<i>reverse</i>)	CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT			
cry10spe (<i>forward</i>)	TCAATGCTCCATCCAATG	348	51	Ibarra et al. (2003)
cry10spe (<i>reverse</i>)	CTTGTATAGGCCTTCCTCCG			
cry11spe (<i>forward</i>)	TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC	305	51	Bravo et al. (1998)
cry11spe (<i>reverse</i>)	CATTGTACTTGAAGTTGTAATCCC			

4.1.4.2. Análise estatística da capacidade endofítica

Para avaliar a capacidade endofítica de *B. thuringiensis* em citros, dados das unidades formadoras de colônias (UFC) das estirpes de Bt foram analisados no software estatístico "R", versão 3.4.2 (R Development Core Team, 2016), sendo seis repetições/tratamento para os bioensaios seletivos e de concentração letal, e 10 repetições/tratamento para os ensaios de viabilidade (item 4.1.5.). Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado e quando houve diferença significativa entre os tratamentos, múltiplas comparações (teste de Tukey, $P < 0,05$) foram realizadas por meio da função “*glht*” do pacote “*multcomp*” com ajustes nos valores de P . Cada ensaio foi repetido duas vezes.

4.1.4.3. Microscopia de fluorescência

Para detectar a absorção e translocação de Bt nos tecidos das plantas, a estirpe recombinante Btk::GFP (S2032), contendo o gene *gfp*, foi cultivada em meio Embrapa líquido. Após 24h de crescimento (conforme item 4.1.3.1.), o inóculo foi aplicado diretamente no substrato de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ e em mudas de laranjeira ‘Pera’ sobre limoeiro ‘Cravo’, na concentração de 10^7 esporos/mL, sendo 10 mL para *seedlings* e 300 mL para mudas [quantidade estipulada em ensaios preliminares segundo Dorta, (2014), considerando a capacidade de campo do substrato de *seedlings* e mudas de citros]. Após 24, 72 e 120 horas da aplicação, amostras destrutivas do caule e raiz dos *seedlings* foram analisadas em 10 cortes

transversais e longitudinais sequenciais seccionados em micrótomo (25 µm de espessura), para cada repetição (10 repetições/tratamento/tempo de avaliação). Os cortes foram analisados em microscópio de fluorescência (Olympus BX61) e a fluorescência foi capturada utilizando o filtro GFP (comprimento de onda de 520 nm) e filtro WG (comprimento de onda de 594 nm). Plantas tratadas somente com água destilada foram utilizadas como controle negativo de fluorescência. As imagens obtidas foram capturadas utilizando o software *DP Controller* e as imagens compostas foram projetadas no *Image-Pro MC 6.1*.

4.1.5. Bioensaios de patogenicidade

Os bioensaios foram realizados no Centro de Citricultura Sylvio Moreira – CCSM/IAC, conduzidos em sala climatizada, com controle de temperatura e fotoperíodo (25 ± 2 °C; UR $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas). Após o preparo (item 4.1.3.1.), as suspensões de Bt diluídas em água destilada autoclavada foram aplicadas diretamente no substrato, sendo 10 mL para *seedlings* e 300 mL para mudas enxertadas. Foram realizados diferentes bioensaios, os quais estão detalhados a seguir:

a) Bioensaio 1 – Ensaio seletivo

No primeiro bioensaio de patogenicidade, foi realizado um *screening* com as oito melhores estirpes de 13 avaliadas por Dorta (2014). Foram avaliadas três estirpes selvagens: S1302, S1450 e S1989, e cinco recombinantes, contendo os genes individualizados: *cyt1A*, *cry2Aa*, *cry4A*, *cry10* e *cry11*. Em todos os casos, a proporção entre estirpe de Bt cultivada em meio Embrapa e água destilada autoclavada foi de 2,5:10 mL.

Dez ninfas de *D. citri* (3° instar) foram transferidas, utilizando um pincel macio para não danificar os estiletes, de murtas para brotações de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ (Figura 4). Após a transferência, os tratamentos foram aplicados diretamente no substrato e a mortalidade foi avaliada diariamente até o 5° DAA, conforme detalhado no item 4.6.1. O desenho experimental foi composto por seis repetições/tratamento. Para o controle foi aplicado somente água destilada. O bioensaio foi realizado duas vezes.

Figura 4. (A) Ninfas de *D. citri* (3º instar) em ramos de murta; (B) Transferência de ninfas para brotações de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’; (C) Ninfas transferidas em brotações de citros; (D) Ninfas se alimentando nas brotações com presença de *honeydew* (aumento de 10 ×).

b) Bioensaio 2 – Ensaio seletivo

No segundo bioensaio, foram avaliadas as estirpes selvagens S1302, S1450 e as recombinantes Cry10 e Cry11, conforme metodologia descrita para o ensaio anterior.

c) Determinação da CL₅₀ e CL₈₀

Com base nos bioensaios anteriores, foram selecionadas duas estirpes de Bt (S1302 e S1450), para determinar a concentração letal necessária para ocasionar mortalidade em 50% e em 80% da população de ninfas de *D. citri* testada. Foram testadas as concentrações de 10^2 a 10^7 esporos/mL.

Dez ninfas de *D. citri* (3º instar) foram transferidas para cada *seedling* de laranjeira ‘Pera’. Após a transferência, os tratamentos foram aplicados diretamente no substrato e a mortalidade avaliada após 120 h. O desenho experimental foi semelhante ao utilizado nos bioensaios 1 e 2.

d) Viabilidade de *D. citri* em mudas de citros tratadas com Bt

Após o *screening*, duas estirpes que apresentaram maiores valores de mortalidade para ninfas em *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ foram selecionadas para testes em diferentes combinações de copa/porta-enxerto (laranjeira ‘Pera’ enxertada em limoeiro Cravo, laranjeira ‘Valência’ em limoeiro Cravo e laranjeira ‘Valência’ em citrumelo Swingle, além de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ como controle varietal). Cinco fêmeas copuladas de *D. citri* foram confinadas, com auxílio de um *voil*, em brotações novas para todas as combinações. Aproximadamente 24 horas após o confinamento, as fêmeas foram retiradas e verificou-se a presença de ovos (Figura 5). Os tratamentos foram, então,

aplicados diretamente no substrato (na concentração de 10^7 esporos/mL para ambas as estirpes de Bt). Foi realizada a contagem de ovos e foi feito o acompanhamento do desenvolvimento das ninfas até a fase adulta. Para determinação da viabilidade da fase ninfal, foi realizada uma correlação entre o número total de ninfas emergidas e o número total de adultos obtidos ao final das avaliações. O desenho experimental foi composto por 10 repetições/tratamento, sendo que no controle negativo foi aplicado somente água destilada. O bioensaio foi realizado duas vezes.

Figura 5. Montagem do bioensaio 5. (A) Confinamento, em *voil*, de fêmeas de *D. citri* copuladas em brotações de *seedlings* e mudas de citros com diferentes combinações copa/porta-enxerto; (B) A seta indica a fêmea ovipositando na brotação; (C) Confirmação da presença de ovos após o período de aproximadamente 24 horas.

4.1.5.1. Confirmação da mortalidade de *D. citri* ocasionada por Bt

Para todos os tratamentos, em todos os bioensaios de patogenicidade, a mortalidade de *D. citri*, devido à ação entomopatogênica das estirpes de *B. thuringiensis*, foi confirmada diariamente (bioensaios seletivos 1 e 2) ou a cada 2-3 dias (para os bioensaios de Concentração Letal e de viabilidade de ninfas de *D. citri* em mudas tratadas com Bt). A confirmação da mortalidade foi realizada por meio da observação em lupa estereoscópica binocular (Olympus) considerando mortas as ninfas que não apresentaram mobilidade ao serem tocadas por um pincel, com coloração amarelo-alaranjada, opacas e desidratadas/ressecadas. Após a confirmação visual, as ninfas mortas foram coletadas e armazenadas em tubos de polietileno (1,5 mL) em câmara fria ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) para posterior detecção da bactéria por isolamento e PCR.

O isolamento de Bt das ninfas mortas era feito a partir de *pools* de até cinco insetos coletados durante as avaliações diárias para cada repetição de cada tratamento, seguindo

protocolo de Dorta (2014). Após a coleta 200µL de água Milli-Q autoclavada foram adicionadas ao *pool* de ninfas, as quais foram maceradas com o auxílio de um pistilo de plástico esterilizado. O macerado foi incubado por 12 min a 80 °C em banho seco e cinco minutos em gelo. Este processo foi realizado para matar as células vegetativas de outras bactérias, deixando viáveis apenas esporos de Bt (Praça et al., 2011). Após esse processo, uma alíquota de 100 µL do macerado foi plaqueada em meio Embrapa sólido, as culturas foram incubadas e confirmadas pela observação de colônias de Bt e por PCR utilizando *primers* específicos, conforme descrito no item 4.5.

4.1.5.2. Análise estatística dos bioensaios

Tanto os bioensaios 1 e 2, quanto o ensaio de viabilidade de *D. citri* em mudas de citros tratadas com Bt foram analisados no software estatístico "R", versão 3.4.2 (R Development Core Team, 2016). Os dados da porcentagem de mortalidade foram analisados por meio de modelos lineares generalizados (Nelder & Wedderburn, 1972) com distribuição quase-binomial. A qualidade do ajuste foi feita por meio do gráfico meio-normal de probabilidade com um envelope de simulação (Hinde & Demétrio, 1998).

Para os bioensaios seletivos 1 e 2 e o de teste de viabilidade foram utilizados delineamentos inteiramente casualizados (DIC). Quando houve diferença significativa entre os tratamentos, múltiplas comparações (teste de Tukey, $P < 0,05$) foram realizadas por meio da função "*glht*" do pacote "*multcomp*" com ajustes nos valores de P .

No bioensaio de viabilidade de ninfas de *D. citri* em mudas tratadas com Bt, além do DIC, foi realizada Análise Fatorial, com características explanatórias: Tratamento (com e sem a aplicação das estirpes de *B. thuringiensis*) $\times$ *seedlings* ou mudas de citros com diferentes combinações de copa/porta-enxerto. O desmembramento da interação foi realizado usando a função "*fat2.crd*" do pacote "*ExpDes*" e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) com ajustes nos valores de P .

Para a estimativa das concentrações letais (CL_{50} e CL_{80}) necessárias para ocasionar mortalidade em ninfas de *D. citri* foi utilizado um modelo binomial com função de ligação complemento log-log (modelo de Gompit), utilizando-se o "*Probit Procedure*" do software SAS versão 9.2 (Finney, 1971; SAS Institute, 2011).

4.2. Ensaio de ligação das toxinas Cry aos receptores de membranas intestinais de *D. citri*

4.2.1. Purificação, solubilização e quantificação das proteínas Cry

Para os ensaios de ligação foram utilizadas as proteínas purificadas das estirpes recombinantes expressando apenas as proteínas Cry1Ab (encontradas nas estirpes S1450 e S1302), Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab2 e Cry1B (encontrada na estirpe S1450) ou Cry11 (encontrada na estirpe S1989). As estirpes foram cultivadas em meio Embrapa sólido a 28 °C por 72 horas (com adição de eritromicina a 10 µL/mL). Após o cultivo, as culturas foram transferidas para tubos Falcon e o complexo de esporo-cristal foi centrifugado a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos, com tampão contendo 0,3 M de NaCl e 0,01 M de EDTA (pH 8,0) e em seguida com tampão contendo PMSF (fenilmetilsulfonil fluoride) a 1 mM. O sobrenadante foi descartado e o sedimento recuperado em tampão TTN [20 mM de Tris, 300 mM de NaCl, 0,1% de Triton X-100 (pH7,2)] e centrifugado a 10.000 rpm a 4°C por 10 minutos. Este procedimento de lavagem foi repetido três vezes.

Após o processo de lavagem, o material foi sonificado a três pulsos por minuto com intervalos de um minuto a 15 W (*VirSonic Cel Disrupter* 16-850). A purificação das proteínas foi realizada por meio de gradiente de sacarose, de acordo com o protocolo descrito por Thomas & Ellar (1983). Posteriormente, foram recuperadas com adição de Triton 1% (v/v) e PMSF 1 mM e solubilizadas em tampão alcalino [carbonato de sódio 50 mM (pH 10,5), β-mercaptoetanol 0,2% (v/v)] por duas horas a 37 °C. Após esse processo, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 12.000 × g o sobrenadante recuperado e o *pellet* descartado. Em seguida a proteína solúvel foi quantificada com *Protein Assay* (Bio Rad®) pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Para observação da integridade e massa molecular das proteínas, foi feito um gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12 %, de acordo com Laemmli (1970). O gel foi corado e fixado com 20 mL de solução corante de *Coomassie blue* (40% metanol, ácido acético 10% e *Coomassie blue* 0,1%) por cerca de 16 horas, sob leve agitação e descorado com 20 mL de solução descorante (40% de metanol, 10% de ácido acético) por 1-2 horas até a visualização dos perfis protéicos das estirpes.

4.2.2. Ativação das proteínas com tripsina

Os cristais foram purificados e as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab2, Cry1B e Cry11 foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e, em seguida, incubadas com a enzima tripsina durante duas horas a 37 °C. A concentração da tripsina foi ajustada conforme a concentração das proteínas (proporção de 10:1 de proteína:enzima, respectivamente). Para a inativação da enzima, foi adicionado tampão PMSF a 1 mM, e em sequência, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante recuperado.

4.2.3. Biotinilação das proteínas

Após a ativação das proteínas com tripsina, as proteínas ativas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab2, Cry1B e Cry11 foram biotiniladas utilizando o *kit ECL Protein Biotinylation System* (Amersham®), conforme as recomendações do fabricante. Para a marcação das proteínas com biotina, 1 mg das proteínas foi incubado com tampão bicarbonato (Amersham®) e 40 µL de biotina pelo período de uma hora em temperatura ambiente. Após esse processo, as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1970) e foi feito um “*Western-blotting*” para confirmação da biotinilação, analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida SDS-PAGE a 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond ECL - nitrocellulose membrane* - Amersham®). A transferência foi realizada a corrente constante de 350 mA em sistema submarino (Hoefer) por 40 min em tampão de transferência [25 mM Tris, 192 mM glicina e metanol 20% (v/v)]. A membrana foi incubada por 16 h com PBS 1x para que fosse renaturada e incubada com streptoavidina – peroxidase conjugada (Amersham®) diluída 1:4000 em 30 mL de PBS 1x durante uma hora. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS 1x contendo Tween 20 a 0,05% (v/v) e revelada utilizando o *kit SuperSignal chemiluminescence substrate* (Pierce®) de acordo com as especificações do fabricante.

4.2.4. Extração de *Brush border membrane vesicles* (BBMV) de *D. citri*

As BBMV's ou vesículas da borda escovada da membrana apical das células do intestino médio de *D. citri* foram extraídas a partir de quatro tubos de 1,5 mL contendo ninfas inteiras do psílideo (aproximadamente 60 mil ninfas entre 2º a 4º ínstaes, obtidas de murtas). As ninfas foram homogeneizadas com o auxílio de um homogeneizador *Glas-Col*, em 10 pulsos

de 3.000 rpm em 12 mL de tampão MET gelado (20 mM Tris, 300 mM manitol, 5 mM de EGTA, pH 7,3). Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 200 rpm por 5 minutos, reservando-se o sobrenadante (SI).

O sedimento foi ressuspensionado em 4 mL de tampão MET e homogeneizado em 10 pulsos a 3.000 rpm, centrifugado novamente a 2.000 rpm por 5 minutos, descartando-se o sedimento. O sobrenadante (SII) foi misturado ao SI e homogeneizados novamente com 15 pulsos a 3.000 rpm. Após essa etapa, adicionou-se 842 μ L de $MgCl_2$ 240 mM e incubou-se em gelo por 15 minutos. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram centrifugados a 5.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante resultante foi reservado (SIII). O sedimento foi novamente ressuspensionado em 4 mL de tampão MET e homogeneizado em 15 pulsos a 3.000 rpm. Após a adição de 210 μ L de $MgCl_2$ 240 mM ao homogeneizado, a mistura foi centrifugada a 2.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi adicionado aos sobrenadantes obtidos anteriormente. Este processo foi repetido mais uma vez com o sedimento obtido, para a otimização da obtenção de BBMV's e os sobrenadantes obtidos foram adicionados aos anteriores.

Os sobrenadantes foram misturados e centrifugados a $12.000 \times g$ por 90 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 4 mL de tampão MET e homogeneizado com 15 pulsos a 3.000 rpm. Ao homogeneizado, adicionou-se $MgCl_2$ 240 mM (210 μ L) e procedeu-se com a centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi reservado e o sedimento novamente ressuspensionado em 4 mL de tampão MET com auxílio do homogeneizador *Glas-Col*. Após esse processo, o sedimento foi armazenado em alíquotas de 30 μ L à $-80^\circ C$ (neste material encontram-se as BBMV's, porém em menor concentração).

Com o sobrenadante reservado, foi realizada uma nova etapa de centrifugação a $12.000 \times g$ por 90 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi ressuspensionado em 1 mL de tampão MET e homogeneizado. As BBMV's obtidas de *D. citri* foram armazenadas em alíquotas de 30 μ L à $-80^\circ C$ (nesta fração, encontram-se as membranas em alta concentração utilizadas para o ensaio de ligação). Após a extração das BBMV's, as mesmas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

4.2.5. Ensaio de ligação

O ensaio de ligação foi realizado de acordo com Aranda et al. (1996). Para este ensaio, utilizaram-se as proteínas puras: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab2, Cry1B e Cry1I marcadas com biotina (item 4.7.3), juntamente com as BBMV's (em alta concentração) extraídas de ninfas de *D. citri* (item 4.7.4).

As proteínas biotiniladas, na concentração de 100 nM, foram incubadas com 10 µg de BBMV em 100 µL (volume final) de tampão de ligação [PBS 1× (pH 7,6), BSA 0,1% (m/v), Tween 20 0,1% (v/v)] em temperatura ambiente, durante uma hora. Para remover as proteínas não ligadas às BBMV's, procedeu-se uma centrifugação durante 10 minutos a $12.000 \times g$.

Após a centrifugação, 90 µL do sobrenadante foram retirados com auxílio de uma pipeta e foram adicionados 90 µL de tampão de ligação [PBS 1× (pH 7,6), Tween 20 0,1% (v/v)], centrifugando novamente por 10 minutos a $14.000 \times g$. Após a centrifugação, foram retirados 90 µL do sobrenadante, com auxílio de uma pipeta, e foram adicionados 5 µL de tampão de amostra de proteína [Glicerol concentrado, Tris HCl 0,5 M pH6,8, SDS, Bromophenol *blue*, β-mercaptoetanol 10%]. As amostras foram fervidas por três minutos a 100 °C e, em seguida, aplicadas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 9% (Cuba Hoefer miniVE – *Vertical electrophoresis system*). A transferência foi realizada em corrente constante de 350 mA em sistema submarino (Hoefer®) por aproximadamente uma hora em tampão de transferência [Tris Base 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20% (v/v)]. As membranas de nitrocelulose foram incubadas por 16 horas a 4 °C com PBS 1x para a renaturação. Em seguida, as membranas contendo as ligações das proteínas marcadas com as BBMV's foram incubadas em streptovidina conjugada com peroxidase (Amersham®) na proporção de 1:6000 em 30 mL de PBS 1x por uma hora, para ativar a marcação das toxinas presentes na membrana. A revelação das membranas foi feita com auxílio do *Kit Super Signal Chemiluminescence Substrate* (Pierce®), de acordo com as especificações do fabricante.

4.3. Avaliação da compatibilidade das estirpes de Bt a agrotóxicos utilizados em citros

O efeito de agrotóxicos comumente utilizados na citricultura (Tabela 2) sobre as estirpes de Bt selecionadas (S1450 e S1302) foi estudado avaliando-se o crescimento vegetativo dos entomopatógenos na presença ou ausência dos ingredientes ativos, visando a uma futura utilização das estirpes como base para bioinseticidas sistêmicos.

Os produtos foram adicionados em meio Embrapa ainda líquido ($\pm 40^{\circ}\text{C}$), de modo que a concentração final do produto no meio correspondesse às recomendações de cada fabricante para a aplicação em campo. Em seguida, o meio de cultura foi vertido em placas de Petri e, após a solidificação, foi utilizada a metodologia simplificada para a determinação do número de UFC de *Bacillus* spp. Alíquotas de 100 μL de uma suspensão contendo cada estirpe de Bt (na concentração de 10^{-5} células/mL, ajustada com auxílio de uma câmara de Neubauer, a partir de diluições seriadas da bactéria em água destilada autoclavada) foram inoculadas na superfície do meio de cultura, sendo 10 placas por tratamento. Após a inoculação, as placas foram deixadas abertas no interior de uma câmara de fluxo laminar até a secagem da suspensão inoculada (adaptada de Alves & Moraes, 1998).

As culturas foram incubadas em estufa B.O.D a 28°C , por 12-14 horas e a avaliação da sobrevivência do Bt nos diferentes ingredientes ativos foi realizada por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento, sendo o experimento repetido duas vezes. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Adicionalmente, a compatibilidade das estirpes de Bt com os agrotóxicos foi verificada *in vivo*, utilizando-se *seedlings* de laranjeira ‘Pera’. Para este experimento, as estirpes foram cultivadas conforme item 4.1.3.1. e aplicadas diretamente no substrato (10 mL por *seedling* na concentração de 10^7 esporos/mL). Após a aplicação, os *seedlings* foram pulverizados com os produtos químicos, conforme recomendações dos fabricantes (Tabela 2). Como controle negativo, foi aplicada somente água destilada. Após 120 HAA, amostras de folhas do ápice dos *seedlings* (brotações) foram utilizadas para a detecção das estirpes de Bt, conforme item 4.5. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com 10 repetições (*seedlings*) por tratamento para cada estirpe (S1302 e S1450), com repetição do ensaio. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Agrotóxicos registrados para a cultura de citros no Brasil e utilizados nos testes de compatibilidade com as estirpes de *B. thuringiensis* (S1302 e S1450).

Ingrediente Ativo	Produto registrado	Classe	Dose utilizada (produto comercial)	Grupo químico
Abamectina	Vertimec 18 EC	Inseticida/Acaric.	400 mL/2000L	Avermectina
Espirodiclofeno	Envidor	Acaricida	400 mL/2000L	Cetoenol
Hidróxido de Cobre	Kocide	Bacteric./Fungic.	3 kg/2000 L	Inorgânico
Imidacloprido	Provado 200 SC	Inseticida sistêmico	400 mL/2000L	Neonicotinoide
Oxicloreto de Cobre	Recop	Fungic./Bacteric.	3,6 kg/2000 L	Inorgânico
Óxido Cuproso	Redshield	Bacteric./Fungic.	1,5 kg/2000 L	Inorgânico
Piraclostrobina	Comet	Fungicida	300 mL/2000 L	Estrobilurina
Dimetoato	Dimetoato 500 EC Nortox	Inseticida/Acaric. Sistêmico	2,5 L/2000 L	Organofosforado
Trifloxistrobina + Tebuconazole	Nativo	Fungicida	800 mL/2000 L	Estrobilurina

5. RESULTADOS

5.1. Absorção e translocação de Bt *in planta*

5.1.1. Isolamento e PCR

A obtenção de colônias em meio Embrapa a partir do isolamento de brotações de citros demonstrou a capacidade de absorção e translocação de *B. thuringiensis* do sistema radicular até o ápice foliar dos *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ assim como em mudas com diferentes combinações copa/porta-enxerto. As colônias foram identificadas morfológicamente apresentando superfície enrugada e borda irregular (Figura 6), sendo posteriormente confirmadas molecularmente por PCR, utilizando *primers* específicos para cada estirpe (Figura 7).

Figura 6. Colônias de *B. thuringiensis* isoladas a partir de brotações de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ (120 horas após a inoculação com Bt), em meio Embrapa (com eritromicina para estirpes recombinantes) após 16 horas de cultivo em B.O.D. a 28 °C $\pm$ 2.

Figura 7. Confirmação das colônias de estirpes de *B. thuringiensis* obtidas do isolamento de brotações de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’. Visualização de fragmentos de DNA em gel de agarose a 1%, correspondente aos produtos de PCR com *primers* específicos para cada estirpe. 1Kb: marcador de peso molecular, N - Controle negativo. As bandas correspondem às colônias positivas para cada estirpe de Bt correspondente: Cyt1A - 522 pb; Cry2Aa - 470 pb; Cry4A - 459 pb; Cry10 - 348 pb; Cry11 - 305 pb; S1302 (gene *cryIAb* - 216 pb); S1450 (gene *cryIAb* - 216 pb) e S1989 (gene *cryII* - 305 pb).

A partir do plaqueamento do macerado de folhas do ápice de *seedlings* de laranjeira previamente inoculados com Bt, foi mensurado o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) observadas no meio de cultivo. No Bioensaio 1, a estirpe S1989 proporcionou o maior número de colônias, com aproximadamente $3,0 \times 10^4$ UFC/mL, seguida pela estirpe S1450. No Bioensaio 2, todas as estirpes proporcionaram entre $1,8$ a $2,4 \times 10^4$ UFC/mL (Figura 8).

No bioensaio de determinação da concentração letal, as menores concentrações aplicadas proporcionaram também menores números de UFC/mL após o isolamento, sendo que foram obtidas até 2×10^4 UFC/mL de *B. thuringiensis* ao final do bioensaio, quando utilizada a concentração de 10^7 esporos/mL para ambas as estirpes testadas – S1302 e S1450 (Figura 8).

Figura 8. Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) das estirpes de Bt após 120 horas de aplicação da suspensão bacteriana no substrato de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ utilizados nos bioensaios. As concentrações (eixo x) representam a quantidade de esporos/mL aplicada para cada estirpe correspondente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os valores correspondem à média de dois bioensaios.

Quanto à persistência das estirpes S1450 e S1302 em mudas enxertadas, durante os tempos avaliados (5, 10 e 30 dias após a aplicação dos tratamentos), observaram-se colônias da bactéria até 30 DAA, sendo que a estirpe S1302 persistiu por mais tempo nas combinações de citros do que a estirpe S1450 (encontrada somente para *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ 30 DAA). Houve uma redução do número de colônias de Bt em relação ao 5º DAA, sendo que, em algumas repetições, não foram observadas colônias da bactéria após esse período. A estirpe S1302 proporcionou o maior número de UFC/mL para os tempos avaliados, sendo a maior concentração da bactéria observada em plantas de laranjeira ‘Pera’ pé franco aos 5 DAA. A redução na população bacteriana com o passar do tempo também foi observada para a estirpe S1450 (Figura 9).

Figura 9. Média de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) das estirpes de *B. thuringiensis*, obtidas pelo isolamento de folhas do ápice (brotações) de plantas utilizadas no ensaio de viabilidade de *D. citri* em mudas tratadas com Bt, após 5, 10 e 30 dias da aplicação dos tratamentos (d.a.a.). Identificação dos tratamentos: 1) Controle (água) em *seedlings* de laranja 'Pera'; 2) Controle (água) em laranja 'Pera' sobre limoeiro 'Cravo'; 3) Controle (água) em laranja 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo'; 4) Controle (água) em laranja 'Valência' sobre citrumelo Swingle; 5) Estirpe S1302 inoculada em *seedlings* de laranja 'Pera'; 6) S1302 em laranja 'Pera' sobre limoeiro 'Cravo'; 7) S1302 em laranja 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo'; 8) S1302 em laranja 'Valência' sobre citrumelo Swingle; 9) Estirpe S1450 inoculada em *seedlings* de laranja 'Pera'; 10) S1450 em laranja 'Pera' sobre limoeiro 'Cravo'; 11) S1450 em laranja 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo'; 12) S1450 em laranja 'Valência' sobre citrumelo Swingle.

5.1.2. Microscopia de fluorescência

Foram retiradas amostras de caule e raiz de *seedlings* de laranja 'Pera' e mudas de 'Pera' sobre limoeiro 'Cravo' para a confirmação da translocação do Btk::GFP (Figura 10). A absorção e a translocação de Bt *in planta* foram confirmadas pela observação direta da bactéria nos tecidos por microscopia de fluorescência, após a aplicação da bactéria no substrato. Nos cortes transversais e longitudinais de caule e raiz, foi possível visualizar células vegetativas e esporos em todos os tempos avaliados (24, 72 e 120 HAA), após a aplicação com o Btk::GFP (Figura 11).

As imagens demonstram as bactérias aderidas principalmente à parede do xilema e a elementos de vasos (câmbio vascular) (Figura 11, 1-D, 3-D). A figura 11 (2-D) demonstra bactérias alojadas nas paredes do xilema e do parênquima. Na figura 11 (4-D) é possível observar fluorescência no raio parenquematístico com o Btk::GFP associado à parede das fibras (Figura 11 - 5-D).

Figura 10. Amostras de caule e raiz retiradas de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ e utilizadas para as análises de microscopia de fluorescência para detecção de Btk::GFP. Me: Medula; Fl: Floema; Xl: Xilema; Ct: Córtex; Ep: Epiderme.

Figura 11. Cortes transversais do caule (1, 3, 5 e 7) e raiz (2, 4, 6 e 8) de *seedlings* de laranja 'Pera' após 24 (1 e 2), 72 (3 e 4) e 120 horas (5 e 6) de inoculação com Btk::GFP (estirpe S2032). As imagens 7 e 8 correspondem ao controle não inoculado. As amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX61) (aumento de 1000 ×). As imagens A correspondem à luz transmitida, B ao filtro GFP, C ao filtro WG, e as imagens D correspondem às imagens compostas (projetadas no Image-Pro MC 6.1), destacando o Btk::GFP no tecido da planta. Abreviações: Ev: elemento de vaso; XI: xilema; P: parênquima; Me: Medula; Rp: Raio parenquematístico; Cv: Câmbio vascular; Rv: raio vascular. As setas destacam o Btk::GFP.

Para os cortes longitudinais de amostras de caule e raiz de mudas de laranjeira, foi possível observar a presença de células vegetativas aderidas, principalmente, nos vasos do xilema 120 HAA (Figura 12). Durante as análises, foi possível verificar que as células vegetativas se encontravam aderidas principalmente próximo a pontuações nos elementos de vasos do xilema (Figura 12, 1-D), o que poderia indicar que a translocação *in planta* ocorre por meio da movimentação do Bt por essas pontuações. Foi possível observar também, que a maioria das células vegetativas encontradas nas raízes estavam aderidas aos vasos do xilema, principalmente próximos as regiões de formações de raízes secundárias (Figura 12, 3 e 4-D).

Não foi observada a presença de células vegetativas de Bt no floema de raízes/caule de *seedlings* e mudas de laranjeira Pera. Não foi observada fluorescência, após a composição das imagens, no controle não inoculado.

Figura 12. Cortes longitudinais do caule (1 e 2) e raiz (3 e 4) de mudas de laranjeira ‘Pera’ enxertadas sobre limoeiro ‘Cravo’ após 120 horas de inoculação com Btk::GFP (estirpe S2032). As amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência. As imagens A correspondem à luz transmitida, B ao filtro GFP, C ao filtro WG, e as imagens D correspondem às imagens compostas, destacando o Btk::GFP no tecido da planta. Abreviações: Ev: elemento de vaso; Xi: xilema; RS: raiz secundária. As setas destacam a presença de Btk::GFP.

5.2. Bioensaios de patogenicidade

5.2.1. Bioensaio 1 - Ensaio seletivo

Durante as avaliações diárias, observou-se que as estirpes de *B. thuringiensis* - S1989, S1302, S1450 e Cry10 - proporcionaram mortalidade desde o primeiro dia após a aplicação dos tratamentos, com valores entre 30 a 40%, sendo que o controle ocasionou 10% de mortalidade ($F: 4,66$; GL: 8, $P < 0,0005$). Após 72 horas os maiores valores de mortalidade foram observados para as estirpes selvagens S1450 e S1302, e a estirpe recombinante Cry10, todas com 56%, seguida da estirpe Cyt1A com 38% de mortalidade de ninfas (Figura 13) ($F: 10,77$; GL: 8, $P < 0,0001$). Esse resultado se confirmou após 120 HAA, proporcionando mortalidade de 70%, 68% e 66%, respectivamente (Figura 13) ($F: 13,65$; GL: 8, $P < 0,0001$).

Figura 13. Bioensaio 1 – Ensaio seletivo. Avaliação da mortalidade de ninfas de *D. citri* transferidas de murta para brotações de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’, após 24, 72 e 120 horas de aplicação dos tratamentos diretamente no substrato (Controle - água, estirpes de *B. thuringiensis* recombinantes: Cyt1A, Cry2Aa, Cry4A, Cry10 e Cry11; estirpes selvagens: S1302, S1450 e S1989). As barras correspondem ao erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os valores correspondem à média de dois bioensaios.

5.2.2. Bioensaio 2 – Ensaio seletivo

No Bioensaio 2, nas primeiras 24 HAA, a estirpe S1450 proporcionou a maior taxa de mortalidade de ninfas de *D. citri*, com 38% ($F: 3,5$; GL: 4, $P < 0,0254$). No terceiro dia de avaliação, as estirpes S1450, S1302 e Cry10 proporcionaram valores de mortalidade acima de 50% e as mesmas foram os melhores tratamentos ao final das avaliações (120 HAA) ($F: 13,3$; GL: 4, $P < 0,0001$). Para o Bioensaio 2, a estirpe S1302 proporcionou uma mortalidade de até 90% das ninfas, e uma redução de 82% em relação ao controle. A estirpe S1450 promoveu 80% de mortalidade e de redução em relação ao controle, seguidos dos tratamentos Cry10 e Cry11 (74% e 56% de mortalidade, respectivamente) (Figura 14) ($F: 22,58$; GL: 4, $P < 0,0001$).

Figura 14. Bioensaio 2 – Ensaio seletivo. Avaliação da mortalidade de ninfas de *D. citri* transferidas de murta para brotações de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’, após 24, 72 e 120 horas da aplicação com os tratamentos diretamente no substrato (Controle – água; estirpes de *B. thuringiensis* recombinantes: Cry10 e Cry11; estirpes selvagens: S1302 e S1450). As barras correspondem ao erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os valores correspondem à média de dois bioensaios.

5.2.3. Concentração letal de Bt para *D. citri*

Para determinar a concentração de esporos necessários para ocasionar 50% e 80% de mortalidade da população de ninfas de *D. citri* (CL₅₀ e CL₈₀, respectivamente), foram avaliadas as estirpes S1302 e S1450 nas concentrações de 10² a 10⁷ esporos/mL, aplicadas diretamente no substrato de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’. A estirpe S1302 apresentou CL₅₀ de $4,92 \times 10^4$ esporos/mL e CL₈₀ de $6,63 \times 10^7$ esporos/mL. Já a estirpe S1450 foi capaz de ocasionar mortalidade em 50% das ninfas testadas quando utilizada na concentração de $2,19 \times 10^4$ esporos/mL, e a CL₈₀ foi de $6,18 \times 10^8$ esporos/mL (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativa das CL₅₀ e CL₈₀ (em esporos mL⁻¹) e intervalo de confiança de estirpes de *B. thuringiensis* para ninfas de *D. citri* em *seedlings* de laranjeira ‘Pera’.

Estirpe	Tempo de exposição (h)	N ¹	² Slope ± EP (valor de P)	CL ₅₀ (IC) ³	CL ₈₀ (IC)	⁴ χ ²	GL ⁵	h ⁶
S1302	120	420	0,33 ± 0,06 (P < 0,0001)	4,92×10 ⁴ (1,03×10 ⁴ - 2,07×10 ⁵)	6,63×10 ⁷ (5,28×10 ⁶ - 9,95×10 ⁸)	2,10	4	0,52
S1450	120	420	0,19 ± 0,04 (P < 0,0001)	2,19×10 ⁴ (1,41×10 ³ - 1,97×10 ⁵)	6,18×10 ⁸ (1,97×10 ⁷ - 3,29×10 ¹²)	2,59	4	0,65

¹N: número de ninfas testadas. ²Slope: Coeficiente angular. ³IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro. ⁴χ²: Valor de qui-quadrado de Pearson. ⁵GL: Graus de liberdade. ⁶h.: Fator de heterogeneidade.

Foi realizado mais um bioensaio para verificar se uma maior concentração aplicada diretamente no substrato de *seedlings* poderia ocasionar maior mortalidade de ninfas. Para este bioensaio foram testadas concentrações entre 10⁶ a 10⁸ de esporos/mL, e pode-se observar que não houve diferença entre as concentrações avaliadas. Entretanto, a concentração de 10⁷ proporcionou os maiores valores de mortalidade para ambas as estirpes, ocasionando 76% de mortalidade para a estirpe S1302 e 80% de mortalidade para S1450. A redução de ninfas em relação ao controle foi de 82% e 83% para S1302 e S1450, respectivamente (Figura 15). Sendo assim, a concentração de 10⁷ esporos/mL foi selecionada, para ambas as estirpes, para a condução dos bioensaios posteriores (F: 21,08; GL:6, P <0,0001).

Figura 15. Bioensaio com diferentes concentrações de esporos de estirpes de *B. thuringiensis* aplicadas diretamente no substrato de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ com ninfas de 3º instar de *D. citri* transferidas nas brotações. O eixo y corresponde a mortalidade (%) de ninfas após 120 horas de aplicação dos tratamentos – eixo x (estirpes S1302 e S1450 nas concentrações de 10⁶, 10⁷ e 10⁸ esporos/mL, água como controle). As barras correspondem ao erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os valores correspondem à média de dois bioensaios.

5.2.4. Viabilidade de *D. citri* em mudas de citros tratadas com Bt

Neste bioensaio, foi observada maior viabilidade de ninfas de *D. citri* no controle (água) (média de 94,9%) independentemente da combinação copa/porta-enxerto, comprovando o efeito patogênico de *B. thuringiensis* ao psíldeo em mudas de citros. Para a estirpe S1302, maior relação de ninfas vivas foi observada em mudas de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro Cravo (74,1%), seguida de ‘Valência’ sobre Citrumelo Swingle (66,7), ‘Pera’ sobre limoeiro Cravo (63,4%) e *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ (50,9%) (Figura 16). A redução da viabilidade de ninfas em relação ao controle para a estirpe S1302 foi de até 44,4% em *seedlings* de laranjeira ‘Pera’, 33,5% para mudas de ‘Pera’ sobre limoeiro Cravo, 23,3% para ‘Valência’ sobre limoeiro Cravo e 30,7% para ‘Valência’ sobre citrumelo Swingle.

A estirpe S1450 proporcionou até 78,1% de viabilidade de *D. citri* para a combinação ‘Pera’ sobre Cravo, 68,4% para ‘Valência’ sobre Citrumelo Swingle, 61,7% em *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ e 56,1% de insetos vivos em ‘Valência’ sobre Cravo (Figura 16). Quanto à

redução da viabilidade de ninfas de *D. citri* em relação ao controle não inoculado com a bactéria, foram observadas reduções de 18,0%, 29,0%, 33,2% e 41,9%, respectivamente para cada combinação de copa/porta-enxerto.

Figura 16. Avaliação da viabilidade de ninfas de *D. citri*, após a oviposição de fêmeas em brotações de diferentes combinações de copa/porta-enxerto. Os tratamentos correspondem às estirpes de Bt S1302, S1450 (10^7 esporos/mL) e controle (água destilada). As letras maiúsculas correspondem às combinações de copa/porta-enxerto: P: *seedlings* de laranja ‘Pera’; P/R: laranja ‘Pera’ sobre limoeiro ‘Cravo’; V/R: laranja ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ e V/CS: laranja ‘Valência’ sobre citrumelo Swingle. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. As barras correspondem ao erro padrão. Os valores correspondem à média de dois bioensaios.

Para verificar se a aplicação de Bt e/ou diferentes combinações de copa/porta-enxerto influenciaram na viabilidade ninfal, foi realizada uma análise fatorial (Tabela 4), a qual demonstrou que as duas estirpes de Bt avaliadas ocasionaram menor viabilidade de *D. citri*, independentemente das combinações utilizadas. Entretanto, o tipo de planta (mudas ou *seedlings*) influenciou a viabilidade de *D. citri*, quando tratadas com Bt, sendo que menores valores de viabilidade foram observados em *seedlings* de laranja ‘Pera’ (Tabela 4).

Tabela 4. Análise fatorial referente ao bioensaio de viabilidade de ninfas de *D. citri* em mudas de citros tratadas com Bt (média de dois bioensaios). As médias do Fator 1 (com e sem a aplicação das estirpes de *B. thuringiensis*) e Fator 2 (*seedlings* ou mudas de citros com diferentes combinações de copa/porta-enxerto) são referentes à porcentagem de viabilidade de *D. citri* após a oviposição de fêmeas nas brotações de citros. Os tratamentos correspondem às estirpes de Bt S1302, S1450 (10^7 esporos/mL) e controle (água destilada), assim como as combinações de copa/porta-enxerto.

Análise fatorial - Viabilidade de ninfas de <i>D. citri</i> em mudas e <i>seedlings</i> de citros tratados com Bt				
Tratamentos	Viabilidade (%) Fator 1 (F1)		% Redução *	
Controle	94,9 b**			
S1302	63,8 a		30,8	
S1450	65,9 a		30,6	
Combinação Copa/PE	Viabilidade (%) Fator 2 (F2)			
‘Pera’ (<i>Seedling</i>)	67,8 a		28,5	
‘Pera’/limoeiro ‘Cravo’	78,9 b		16,8	
‘Valência’/limoeiro ‘Cravo’	75,6 b		20,3	
‘Valência’/citrumelo Swingle	77,1 b		18,7	
Viabilidade (%) da interação (F1 xF2)				
Tratamentos x Combinação Copa/PE	‘Pera’ (<i>Seedling</i>)	‘Pera’/ limoeiro ‘Cravo’	‘Valência’/ limoeiro ‘Cravo’	‘Valência’/ citrumelo Swingle
Controle	91,5 bA	95,3 cA	96,6 cA	96,3 bA
S1302	50,9 aA	63,4 aAB	74,1 cB	66,7 aB
S1450	61,1 aA	78,1 bB	56,1 aA	68,4 aAB

Fator 1: GL: 2, *F*: 112,18, *P* < 0,01; Fator 2: GL: 3, *F*: 6,65, *P* < 0,01; Interação F1 × F2: GL: 11, *F*: 5,48, *P* < 0,01.

*Redução, em porcentagem, da viabilidade de *D. citri* em relação ao controle (água). **Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (colunas). ***Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (linhas).

5.2.5. Confirmação da mortalidade de *D. citri* por observação em lupa e PCR

A mortalidade das ninfas, ocasionadas pelas estirpes de Bt, foi confirmada pela visualização diária em microscópio estereoscópio (Figura 17) e pelo isolamento de colônias da bactéria obtidas do *pool* de ninfas mortas (Figura 18). Todas as colônias selecionadas para as análises de PCR foram positivas para a presença de genes *cry* ou *cyt* conforme *primers* específicos para a identificação de cada estirpe (Figura 19).

Durante as avaliações observou-se que a maioria das ninfas que se alimentavam em *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ e em mudas de citros, tratadas com Bt, morreram durante a troca de instar (Figura 17).

Figura 17. Avaliação visual, em microscópio estereoscópico binocular (Olympus), da mortalidade de ninfas de *D. citri* durante os bioensaios de patogenicidade. As setas pretas indicam as ninfas mortas e as setas vermelhas a exúvia das ninfas. A) Controle (água destilada), B) estirpe S1302 e C) estirpe S1450.

Figura 18. Isolamento das estirpes de Bt a partir do *pool* de ninfas mortas que se alimentaram em brotações de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ inoculados com Bt. As ninfas foram coletadas durante as avaliações diárias de mortalidade e avaliadas em *pool* de amostras. As colônias obtidas foram visualizadas em lupa estereoscópica binocular (Olympus) após 16 horas de cultivo em B.O.D. a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$.

Figura 19. Confirmação de colônias de Bt obtidas a partir de *pool* de ninfas de *D. citri* mortas, após a alimentação em *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ tratados com a bactéria. 1Kb: marcador de peso molecular, N - Controle negativo para cada estirpe. As bandas correspondem às colônias positivas para cada estirpe de Bt correspondente visualizada em gel de agarose a 1% utilizando produtos de PCR com *primers* específicos: Cyt1A – fragmento de 522 pb; Cry2Aa - 470 pb; Cry4A - 459 pb; Cry10 - 348 pb; Cry11 - 305 pb; S1302 (gene cry1Ab – 216 pb); S1450 (gene cry1Ab – 216 pb) e S1989 (gene cry11 – 305 pb).

5.3. Ligação das toxinas Cry aos receptores de membranas intestinais de *D. citri*

5.3.1. Purificação das proteínas Cry

As proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab2 e Cry1B e Cry11 foram adequadamente purificadas. A integridade e massa molecular das proteínas foram visualizadas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, apresentando padrão de banda esperado para cada proteína (dados não mostrados).

5.3.2. Ativação das proteínas com tripsina

As proteínas purificadas: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab2, Cry1B e Cry11 foram quantificadas pelo método de Bradford e ativadas com tripsina (Figura 20). A ativação das proteínas está correlacionada ao mecanismo de ação das toxinas Cry no intestino dos insetos, sendo este passo fundamental para a liberação dos fragmentos tóxicos das protoxinas. A interação da toxina ativa com os possíveis receptores de membrana presentes nas BBMV's depende da conformação em que as duas estruturas se encontram, sendo assim, a tripsina é uma enzima que simula essa condição que ocorre naturalmente no intestino dos insetos.

Figura 20. Ativação das proteínas de Bt com tripsina (SDS-PAGE a 12%). M: Marcador de massa molecular Rainbow da GE Healthcare. Proteínas ativadas: 1) Cry1Aa, 2) Cry1Ab, 3) Cry1Ac, 4) Cry2Aa, 5) Cry2Ab2, 6) Cry1B e 7) Cry11.

5.3.3. Biotinilação das proteínas

As proteínas ativas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab2, Cry1B e Cry11 foram biotiniladas e apresentaram banda principal de 65 kDa (Figura 21).

Figura 21. Biotinilação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab2, Cry1B e Cry11 observadas em SDS-PAGE a 12%. As bandas correspondem às proteínas ativas e biotiniladas.

5.3.4. Ligação das toxinas Cry aos receptores de membrana intestinais de *D. citri* (BBMV)

As vesículas da borda escovada da membrana apical das células do intestino (BBMV's) foram extraídas de ninfas *D. citri* e utilizadas para o ensaio de ligação. As membranas contendo as BBMV's de *D. citri* apresentaram ligações para todas as toxinas Cry testadas, quando submetidas à marcação das proteínas biotiniladas. A presença do sinal positivo significa que ocorreu a ligação entre as proteínas Cry e os receptores presentes na superfície do intestino médio de *D. citri* (Figura 22).

Figura 22. Proteínas ativadas e biotiniladas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab2, Cry1B e Cry11, ligadas aos receptores intestinais de *D. citri*. Os sinais positivos indicam a ligação das proteínas aos receptores.

Para as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry11, no ensaio de ligação com as BBMV's de ninfas de *D. citri*, as bandas de 65 kDa não apareceram no primeiro momento após a exposição ao filme, porém, a mesma membrana foi exposta por mais tempo (aproximadamente 2 h), onde foi possível observar as bandas correspondentes (Figura 23).

Figura 23. Proteínas ativadas e biotiniladas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry11 ligadas aos receptores intestinais de *D. citri*. Os sinais positivos indicam a ligação das proteínas aos receptores.

5.4. Compatibilidade das estirpes de Bt à agrotóxicos utilizados em citros

Para a estirpe S1302, dentre os agrotóxicos testados quanto à compatibilidade *in vitro*, somente o espiroclorofeno não afetou o crescimento de colônias. Os agrotóxicos imidacloprido e piraclostrobina diminuíram a formação de colônias de Bt (com até $8,0 \times 10^5$ UFC/mL), e a piraclostrobina, além de reduzir a UFC/mL, proporcionou colônias menores. A trifloxistrobina + tebuconazole, apesar de não inibir por completo o aparecimento das colônias de Bt, diminuiu a formação e o tamanho das mesmas. Os demais agrotóxicos testados foram incompatíveis com o crescimento de S1302 (Figura 24 e 25).

A estirpe S1450 foi compatível com espiroclorofeno e imidacloprido, proporcionando aproximadamente $6,0 \times 10^9$ UFC/mL, sem diferença com o tratamento controle. Os agrotóxicos abamectina, piraclostrobina e trifloxistrobina + tebuconazole, apesar de não terem impedido o crescimento da bactéria, diminuíram a formação de colônias *in vitro* e, com exceção da abamectina, reduziram o tamanho das colônias. A estirpe S1450 não foi compatível com agrotóxicos cúpricos e com o inseticida dimetoato (Figura 24 e 25).

Figura 24. Unidade formadora de colônias (UFC) por mililitro das estirpes S1302 e S1450 em placas de Petri contendo meio de cultura Embrapa acrescido de agrotóxicos, conforme recomendação do fabricante. Identificação dos tratamentos: 1) Abamectina; 2) Espiroclorofeno; 3) Hidróxido de cobre; 4) Imidacloprido; 5) Oxícloreto de cobre; 6) Óxido cuproso; 7) Piraclostrobina; 8) Dimetoato; 9) Trifloxistrobina + Tebuconazole; 10) Controle - meio Embrapa sem a adição de agrotóxicos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 25. Colônias de *B. thuringiensis* das estirpes S1302 (A) e S1450 (B) em placas de Petri contendo meio de cultura Embrapa acrescido de agrotóxicos, conforme recomendação do fabricante. Identificação dos tratamentos: 1) Abamectina; 2) Espirodiclofeno; 3) Hidróxido de cobre; 4) Imidacloprido; 5) Oxicloreto de cobre; 6) Óxido cuproso; 7) Piraclostrobina; 8) Dimetoato; 9) Trifloxistrobina + Tebuconazole; 10) Controle meio Embrapa sem a adição de agrotóxicos. As setas destacam as colônias de Bt.

Entretanto, quando avilou-se a compatibilidade de Bt aos agrotóxicos em *seedlings* de laranjeira ‘Pera’, todos os produtos foram compatíveis para ambas as estirpes (S1302 e S1450), demonstrando que a capacidade endofítica da bactéria não foi afetada pela aplicação dos agrotóxicos (Figura 26).

Figura 26. Unidade formadora de colônias (UFC) por mililitro das estirpes S1302 e S1450 em placas de Petri contendo meio de cultura Embrapa, após o isolamento de folhas (brotações) do ápice de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ inoculados com as estirpes de *B. thuringiensis* e posteriormente tratados com os seguintes tratamentos: 1) Abamectina; 2) Espirodiclofeno; 3) Hidróxido de cobre; 4) Imidacloprido; 5) Oxicloreto de cobre; 6) Óxido

cuproso; 7) Piraclostrobina; 8) Dimetoato; 9) Trifloxistrobina + Tebuconazole; 10) Controle – água. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

6. DISCUSSÃO

O primeiro relato de Bt endofítico foi realizado por Monnerat et al. (2003) em plantas de algodão, tendo sido posteriormente relatados para feijão (Maduell et al., 2007; Maduell et al., 2008, García-Suárez et al., 2017), repolho (Praça et al., 2012; Vaz, 2014), leguminosas (Tanuja & Pankaj, 2013), café (Miguel et al., 2013), milho, soja (Vaz, 2014; Costa, 2014) e *A. thaliana* (García-Suárez et al., 2017). *B. thuringiensis* é uma bactéria amplamente utilizada no manejo de pragas agrícolas, e a descoberta de estirpes de Bt endofíticas abriu novas perspectivas para o controle de insetos sugadores, como *D. citri*, vetor de *Ca. Liberibacter* spp., bactérias associadas ao HLB, principal doença dos citros do mundo na atualidade.

Microrganismos endofíticos podem ser encontrados em partes aéreas vegetais e em raízes, que inclusive são uma das principais portas de entrada dos mesmos (Azevedo et al., 2002). A introdução de microrganismos endofíticos em plantas hospedeiras pode ocorrer ativamente, pela produção de enzimas e/ou estruturas que facilitam a penetração do microrganismo na planta, ou por meio de aberturas naturais como estômatos, hidatódios, ferimentos, via raiz e sementes (Döbereiner et al., 1993; Costa, 2014). A emergência de raízes secundárias laterais, assim como o próprio crescimento por meio da penetração no solo, pode gerar abrasões que facilitam a entrada de microrganismos (Azevedo et al., 2002). Possivelmente o mecanismo de penetração de *B. thuringiensis* em citros ocorra via raiz, uma vez que o inóculo é utilizado diretamente no substrato como “drench”. Estudos demonstraram que a penetração de Bt *in planta* pode ocorrer por aberturas e lesões nas raízes translocando-se pelo xilema até atingir as folhas (Praça et al., 2012). No presente estudo, foi possível observar esporos-células de Btk::GFP principalmente no xilema e em elementos de vasos de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’, demonstrando o potencial de utilização desta bactéria como um produto sistêmico para, futuramente, controlar populações de *D. citri* em casa-de-vegetação e/ou campo.

Para *Citrus* sp. o primeiro relato de Bt endofítico foi realizado em 2011 por Balbinotte, que utilizou suspensões de Btk::GFP em ramos destacados de murta e no substrato de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ e recuperou a bactéria fluorescente pelo isolamento de folhas do ápice das plantas em meio de cultura seletivo. Dorta (2014) utilizou estirpes de *B. thuringiensis* em *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ e confirmou a absorção da bactéria pela planta por meio do isolamento e PCR de colônias. No presente estudo, a capacidade endofítica de Bt foi confirmada pela aplicação de estirpes selvagens (S1302, S1450 e S1989) e recombinantes (Cyt1A, Cry2Aa, Cry4A, Cry10 e Cry11), via sistema radicular (no substrato) em *seedlings* de laranja; e pela primeira vez em mudas de citros com diferentes combinações de copa/porta-enxerto, demonstrando a capacidade

da bactéria em translocar em mudas enxertadas. Foi possível observar também que neste porte de planta, a bactéria persistiu por até 30 dias em algumas combinações (copa/porta-enxerto), porém em níveis menores do que aqueles observados no 5º DAA. No presente estudo, os dados sugerem uma colonização por Bt mais efetiva em *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ do que em mudas enxertadas, possivelmente devido ao tamanho das plantas, ou em função das variedades utilizadas na combinação copa/ porta-enxerto. Estudos realizados por Costa (2014) demonstraram que estirpes de Bt endofíticas podem estabelecer diferentes padrões de colonização e interação em distintos genótipos de algodão.

Neste estudo, confirmamos a capacidade do complexo esporo-cristal em translocar da raiz para as partes aéreas de citros, mantendo sua viabilidade e, o mais importante, a sua toxicidade contra as ninfas *D. citri*. A bactéria *B. thuringiensis* possui célula vegetativa de 1,0 a 1,2 µm de largura por 3,0 a 5,0 µm de comprimento, geralmente móveis, contendo esporo com formato elipsoidal, localizados na região central ou paracentral quando no interior da célula-mãe (Glare et al., 2000). As análises de microscopia de fluorescência demonstraram que o entomopatógeno foi absorvido pelas plantas e translocou por meio dos vasos do xilema até o ápice foliar de *seedlings* e mudas de laranjeira ‘Pera’. As imagens de microscopia demonstram que o Btk::GFP foi encontrado, principalmente, no xilema secundário e em elementos de vasos, aderidos na parede interna, próximos as pontuações. Esse fato é importante, pois a planta possui comunicação radial por feixes vasculares, e sendo a bactéria observada nesses locais, isso pode significar que o Bt está translocando do xilema para o floema por meio de conexões vasculares. Apesar de não ter sido observada fluorescência nos vasos do floema, uma hipótese levantada é que, provavelmente, somente os esporos e cristais conseguem translocar pelos tubos crivados, por serem de menor tamanho que a célula vegetativa. Por outro lado, a marcação dos esporos com GFP não é tão efetiva quanto a das células vegetativas. Dessa forma, uma vez que plantas de citros emitem auto-fluorescência, é possível os esporos não sejam visualizados com tanta facilidade como as células vegetativas, dificultando a identificação do Btk::GFP. Sendo assim, seria mais adequado uma microscopia de varredura, para comprovar a presença de esporos assim como de cristais no floema.

Feixes vasculares do xilema e do floema estão dispostos paralelamente, lado-a-lado, tendo a mesma origem: o pró-câmbio e o câmbio, nos crescimentos primários e secundários, respectivamente. Assim ocorre uma “comunicação” entre os dois, ao longo de seus percursos na planta, resultando numa troca de materiais, de forma que um pode ser contaminado pelo material do outro (Benincasa & Leite, 2002). Outro fato que pode consolidar a hipótese de que a bactéria esteja presente no floema, é que os genes *cry* ou *cyt*, encontrados nas estirpes de Bt

utilizadas neste estudo, foram confirmados por meio de isolamento e PCR de ninfas mortas, que por sua vez, se alimentavam nas brotações de plantas tratadas com Bt diretamente no substrato. Entretanto, Bonani et al. (2010) observaram que ninfas de *D. citri* também se alimentam do xilema, e consequentemente a bactéria pode ser adquirida nesse momento. A forma pela qual os feixes do xilema podem se comunicar com o floema ainda não é bem esclarecida, mas estudos demonstram que células do parênquima que separam os dois feixes, funcionam como vias de passagem, num mecanismo que parece exigir energia metabólica das células de transferência e das células companheiras, permitindo um equilíbrio dinâmico entre as soluções dos dois sistemas de transporte (Benincasa & Leite, 2002).

Recentemente, García-Suárez et al. (2017) comprovaram que estirpes de *B. thuringiensis* foram capazes de translocar das raízes ao meristema floral das plantas parentais de *A. thaliana*, permanecendo viáveis em sementes, provando a transferência vertical da bactéria. Para citros, não foi verificado se uma planta colonizada com a bactéria é capaz de produzir sementes com a mesma, porém, o tratamento de sementes pode ser interessante para produção de porta-enxertos pré-inoculados com o entomopatógeno futuramente, o que certamente demanda mais estudos.

As avaliações da persistência da bactéria em mudas de citros demonstraram que houve uma redução do número de unidades formadoras de colônias do 5º para o 10º DAA, independentemente da estirpe testada (S1302 e S1450) e da combinação de copa/porta-enxerto avaliada. Esse fato pode estar correlacionado com alguma característica fisiológica, estrutural ou até mesmo com a comunidade endofítica presente *in planta*. Outro fato que pode explicar a redução de UFC *in planta* é que a bactéria pode estar sendo apenas absorvida por meio das raízes e não se multiplicando endofiticamente, sendo que, com o tempo, o inóculo vai diminuindo e, consequentemente, a população de Bt *in planta* é reduzida.

Durante os bioensaios de determinação da concentração letal, foram realizados isolamentos de folhas do ápice foliar ao final dos experimentos, e, após 120 h de aplicação das estirpes no substrato, observou-se que menores concentrações proporcionaram menores níveis de UFC/mL. Foi observado também que os *seedlings* não absorveram a quantidade total de esporos aplicada no substrato, sendo observadas até $2,0 \times 10^4$ UFC/mL quando utilizada a concentração de 10^7 esporos/mL para ambas estirpes. Isto pode ser explicado pela capacidade de absorção de esporos a partir do substrato, sendo que, possivelmente a planta não consegue absorver uma concentração muito elevada da bactéria. Germani et al. (2004) estudaram uma série de endófitos marcados com GFP quanto à sua capacidade de colonização, verificando níveis entre 10^2 a 10^4 UFC/g de tecido de plantas de ervilha, semelhante ao observado no presente estudo.

Para a detecção de *B. thuringiensis* foi utilizada a técnica de PCR convencional, a qual tem sido amplamente utilizada para determinar a presença ou ausência de genes alvos, objetivando a identificação de genes-Bt previamente reportados (Cerón et al., 1995). Esta estratégia é eficiente e prática, uma vez que é altamente sensível, requer pouco DNA para análise e permite o processamento de um grande número de amostras em um período relativamente curto de tempo (Bravo et al., 2017).

Uma vez comprovada a capacidade de translocação das estirpes de *B. thuringiensis* para citros, o próximo passo do estudo foi confirmar o potencial patogênico para ninfas de *D. citri*. Insetos sugadores não são particularmente suscetíveis às toxinas de Bt. Esses insetos utilizam aparelhos bucais para se alimentar da seiva, resultando em uma exposição natural mínima às toxinas de Bt, que estão normalmente presentes no solo e/ou nas superfícies das folhas. Assim, provavelmente houve pouca seleção natural de Bt tóxico à Hemiptera (Chougule & Bonning, 2012; Rausch et al., 2016). Até esta data, poucos estudos com estirpes ou toxinas Bt foram relatadas para Hemiptera (Pocar et al., 2009; Baum et al., 2012; Palma et al., 2014b; Liu et al., 2017). Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a estirpe S1302 causou mortalidade de até 90% em ninfas do psilídeo dos citros que se alimentavam de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’, comprovando o potencial deste entomopatógeno para o controle de *D. citri*. Entretanto, para mudas de laranjeira ‘Pera’ sobre limoeiro Cravo, a mesma estirpe proporcionou valores bem menores de mortalidade (36%).

Chougule et al. (2013) demonstraram que a adição de uma sequência peptídica curta ligada ao intestino de algumas espécies de insetos aumentou sua sensibilidade à toxinas de Bt. Esta estratégia pode permitir a supressão transgênica mediada por plantas para pragas/vetores hemipteras. Sendo assim, os resultados de entomopatogenicidade de Bt para *D. citri* podem estar subestimados, devido ao uso de esporos e cristais em suspensão para montagem dos bioensaios, ao invés de toxinas pré-solubilizadas. Chougule & Bonning (2012) observaram que a pré-solubilização pode melhorar a ação das toxinas, como por exemplo Cry2, Cry3 e Cry4 para Hemiptera. Entretanto, a solubilização da toxina pode ser ineficiente devido ao pH ácido no estômago, como relatado para pulgão *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae) (Cristofolletti et al., 2003). Para *D. citri* até a presente data, não foram encontradas informações sobre o pH do intestino, sendo que essa área de estudo ainda precisa ser explorada. A maioria dos insetos sugadores importantes na agricultura, possui proteases de cisteína no intestino que são ativas em pH mais ácido em relação às condições alcalinas otimizadas para a atividade das proteases (Chougule & Bonning, 2012).

A solubilização e ativação das toxinas Cry ocorrem por meio da clivagem de parte da proteína, nas pontes de dissulfeto entre os aminoácidos das frações C-terminal e N-terminal, por enzimas proteolíticas presentes no mesêntero larval/ninfal. As enzimas mais comumente encontradas são tripsina e quimiotripsina, sendo essa fase influenciada principalmente pela condição físico-química do mesêntero e da composição do cristal, ocorrendo em condições de pH alcalino para lepidópteros (Adang et al., 2014).

As formas solubilizadas de quatro δ -endotoxinas Cry (Cry1Ab, Cry3A, Cry4Aa e Cry11Aa) impactaram a sobrevivência do pulgão *A. pisum* e retardaram o crescimento de sobreviventes (Pocar et al., 2009). Embora os mesmos autores tenham observado maior toxicidade ao pulgão, os níveis de toxicidade ainda foram menores que os de toxinas Cry usadas para o manejo de lepidópteros e coleópteros (Chougule & Bonning, 2012).

Alguns estudos relatam proteínas de Bt tóxicas a insetos sugadores como afídeos, sendo Cry2 e Cry3A tóxicas para o afídeo da batata (Walters et al., 1995), Cry4 para o pulgão *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera: Aphididae), Cry4Aa e Cry11Aa para *A. pisum* (Ali & Luttrell, 2009) e Cry3A, Vip1Ae-Vip2Ae para *A. gossypii* em algodão (Sattar & Maiti, 2011). Melatti et al. (2010) avaliaram, por meio de bioensaios, mais de 400 estirpes de Bt, e encontraram cinco (S29, S40, S616, S1168 e S1576) que ocasionaram mortalidade superior a 50% à *A. gossypii*, quando utilizadas de forma sistêmica em plantas de algodão. Konecka et al. (2012) relataram a toxina Cry2Aa como tóxica para Diptera e Hemiptera. Nos bioensaios de patogenicidade, das oito estirpes (selvagens e recombinantes) avaliadas, duas demonstraram potencial para controle de *D. citri*, com valores de mortalidade acima de 80% (S1450 e S1302).

Após o *screening* realizado, o próximo passo foi verificar a concentração letal de esporos de Bt necessária para ocasionar mortalidade na população de *D. citri* avaliada, sendo que a estirpe S1302 apresentou CL_{50} de $4,92 \times 10^4$ esporos/mL e CL_{80} de $6,63 \times 10^7$ esporos/mL. A estirpe S1450 foi estimada em $2,19 \times 10^4$ esporos/mL para a CL_{50} e em $6,18 \times 10^8$ esporos/mL para a CL_{80} (Tabela 3). Costa et al. (2010) estudaram diferentes isolados de Bt para ocasionar mortalidade em larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae), e observaram CL_{50} , após uma hora da aplicação da suspensão bacteriana, com os isolados 188, 577 e a linhagem padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* nas concentrações de 0,116; 0,133 e $0,332 \times 10^5$ esporos/mL, respectivamente. Palma et al. (2014b) observaram que a CL_{50} da toxina Cry51Aa2 foi de 72,9 μ g/mL contra *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae) e Cry41Aa de 32,7 μ g/mL para *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae).

A maioria dos estudos avalia a CL_{50} utilizando diferentes concentrações ou doses de proteínas purificadas de Bt em dietas artificiais que são oferecidas para a população de inseto

testada (Santos et al., 2009; Caccia et al. 2010; Sellami et al., 2015; Oyediran et al., 2016; Narkhede et al., 2016). Proteínas purificadas adicionadas em uma dieta artificial poderiam ser utilizadas para estimar a concentração letal de Bt para ninfas de *D. citri*. Hall et al. (2010) obtiveram 72% de sobrevivência de insetos adultos de *D. citri* em dieta artificial de sacarose após sete dias de avaliação. Entretanto, estudando a ação de RNAi em ninfas de *D. citri*, Galdeano et al. (2017) observaram que o sistema de dieta artificial não foi eficaz para avaliar a sobrevivência de ninfas, ocasionando até 100 % de mortalidade dos insetos no controle, após 120 h. Russell & Pelz-Stelinski (2015) desenvolveram um sistema de dieta artificial para ninfas de *D. citri*, confinando as mesmas entre membranas de Parafilm® para se alimentar, porém, apesar do sistema permitir que o inseto consiga atingir a fase adulta, apresentou altas taxas de mortalidade de ninfas. Sendo assim, neste estudo avaliamos a concentração letal de Bt em populações de *D. citri* através da aplicação de suspensões de esporos diretamente no substrato de *seedlings* de laranja.

No bioensaio de viabilidade de *D. citri* em diferentes combinações de copa/porta-enxerto, para S1302 a maior viabilidade foi observada na combinação ‘Valência’ sobre limoeiro Cravo. Para a mesma estirpe, *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ proporcionaram menores valores de viabilidade e maior redução de ninfas em relação ao controle. Já a estirpe S1450 de Bt proporcionou menor viabilidade de *D. citri* quando aplicada em *seedlings* de laranjeira ‘Pera’, sendo que as combinações de ‘Valência’ sobre limoeiro Cravo e ‘Valência’ sobre citrumelo Swingle proporcionaram maior viabilidade do psilídeo, quando tratadas com essa bactéria.

Durante os bioensaios de patogenicidade, foi possível observar que a maioria das ninfas de *D. citri* morreu durante a troca de ínstar, em *seedlings* ou mudas de citros tratadas com Bt. O psilídeo é um inseto hemimetabólico, sendo que o ínstar é considerado como a duração entre uma ecdise e outra, principal mecanismo de crescimento do inseto (metamorfose). O controle da metamorfose e da ecdise é de natureza hormonal, por meio de hormônios endócrinos produzidos por glândulas desprovidas de ducto próprio, que lançam suas secreções na hemolinfa. Sendo assim, essa é uma fase crítica para o inseto, que uma vez debilitado pela ingestão de esporos-cristais de Bt, fica mais vulnerável ao ataque do entomopatógeno (Nakano et al., 2002; El-Sheshney et al., 2016).

A ligação específica das proteínas Cry aos receptores presentes na superfície das microvilosidades apicais das células colunares do intestino médio dos insetos (BBMV's) é um passo crítico no mecanismo de ação dessas proteínas. Diferentes receptores têm sido descritos como do tipo caderina e aminopeptidase N, ou fosfatase alcalina ancoradas a glicosil fosfatidil-inositol (GPI) (Bravo et al., 2011; Zhou et al., 2016; Bravo et al., 2017).

As protoxinas Cry, para serem ativas, precisam ser solubilizadas no lúmen do intestino médio pelo pH alcalino, no caso de insetos lepidópteros e dípteros, e ácidos para coleóptero, e posteriormente clivadas por proteases, contidas no suco gástrico, liberando fragmentos tóxicos por meio da perda de metade da porção C-terminal e de 20-50 aminoácidos na porção N-terminal, liberando assim um fragmento ativo de aproximadamente 65 kDa (Bravo et al., 2007; Bravo et al., 2012). Esta etapa é necessária para que a proteína ativa possa passar por complexos eventos sequenciais de ligação com diferentes receptores presentes nas BBMV's, levando à sua inserção à membrana, formação de poros, intumescimento e ruptura celular, extravasamento do conteúdo intestinal para hemocele do inseto ocasionando morte do mesmo (Soberón et al., 2010). Nos ensaios de ligação *in vitro*, esse processo é simulado pela tripsina, que é uma enzima utilizada para ativar as protoxinas Cry. Para *D. citri*, não se sabe exatamente como ocorre esta ligação, sendo necessários mais estudos nessa área.

Nos ensaios de ligação, realizados com algumas toxinas presentes nas estirpes S1302, S1450 e S1989, foi possível verificar que todas as toxinas Cry testadas se ligaram as BBMV's de ninfas de *D. citri*. A união das toxinas Cry às vesículas de membrana da microvilosidade apical dos insetos suscetíveis é bifásica, sendo composta por um passo reversível e outro irreversível (Hoffman et al., 1988; Van Rie et al., 1989). O primeiro passo envolve a interação entre a toxina e seu sítio de ligação (união reversível), que é um requisito básico para que ocorra toxicidade, mas não suficiente (Schnepf et al., 1998). No entanto, a união irreversível a receptores específicos e a inserção na membrana parece estar mais relacionada com a toxicidade (Monnerat & Bravo, 2000). O processo de ligação das toxinas Cry aos receptores de membrana é considerado um passo crítico, porém não suficiente para determinar a atividade patogênica, sendo esta determinada por meio de bioensaios (Jurat-Fuentes & Crickmore, 2016). No presente estudo, foi possível verificar a união reversível das toxinas testadas com as BBMV's, sendo que a patogenicidade foi comprovada pelos bioensaios com as estirpes expressando essas proteínas. Entretanto, ainda são necessários mais estudos com as proteínas puras, a fim de verificar qual a toxina responsável pela maior mortalidade de ninfas, além de verificar se existe um efeito sinérgico entre as proteínas para *D. citri*.

Entre as toxinas testadas quando a ligação aos receptores de membrana, Cry1Ab e Cry1Ac apresentaram bandas com padrão diferente das marcadas somente com Biotina sem a presença da BBMV. Possivelmente, esse fato pode ter ocorrido devido à presença de proteases presentes nas BBMV's que poderia estar degradando parcialmente essas toxinas. Para diminuir esse efeito foi utilizado um inibidor de protease (PMSF 1 mM) durante a obtenção da BBMV; entretanto, esse ensaio deve ser repetido futuramente com outros inibidores de proteases. Li et

al. (2011) estudaram a ligação das toxinas Cry1A e Cry3Aa em *A. pisum* e verificaram que as toxinas se ligaram as BBMV's do pulgão; porém, demonstraram baixa toxicidade nos bioensaios. Os resultados deste mesmo estudo sugerem que a ligação intestinal da toxina Cry1Ac no intestino de pulgão é mediada por glicano. Um dos modelos propostos para o modo de ação de toxinas Cry1A é o de receptores do tipo caderina e aminopeptidase N (Bravo et al., 2011). Foi proposto para Lepidoptera que a toxina Cry1A se liga primeiramente a uma proteína do tipo caderina e, após sofrer uma modificação proteolítica, um oligômero é formado. Este se liga a APN ou ALP e se insere na membrana das células colunares (Rodrigo-Simón et al., 2008; Bravo et al., 2011).

O reconhecimento da toxina Cry por receptores específicos é um fator determinante para a sua especificidade e atividade, sendo que o principal mecanismo de resistência às toxinas Cry são mutações que ocorrem na interação toxina-receptor (Fernandez et al., 2008). Liu et al. (2017) estudaram as proteínas Cry64Ba e Cry64Ca, para controle de pragas hemípteras do arroz, e demonstraram ligação específica do complexo das toxinas em BBMV's isoladas de *Laodelphax striatellus* (Fallén) (Hemiptera: Delphacidae).

Este é o primeiro trabalho que mostra a ligação entre toxinas Cry e receptores de membrana de ninfas de *D. citri*, sendo necessários mais estudos para melhor caracterização e compreensão destes mecanismos de reconhecimento e ligação neste inseto, o que será útil para o desenvolvimento de bioinseticidas e/ou plantas transgênicas, contendo genes *cry*, com diferentes toxinas, podendo agir em diferentes sítios de ligação. Sendo assim, um próximo passo deste estudo será determinar os possíveis receptores de toxinas presentes nas BBMV's, para deste modo compreender o mecanismo de ação de *B. thuringiensis* em ninfas de *D. citri*, contribuindo para um melhor manejo da resistência do psilídeo no campo, por exemplo através da utilização de produtos e/ou plantas piramidadas, com diferentes toxinas e/ou com efeito sinérgico entre elas, como relatado por Monnerat et al. (2014) e Carrière et al. (2016). Outra perspectiva futura, além de identificar a proteína receptora presente na BBMV de *D. citri*, será realizar ensaios de competição heteróloga entre as proteínas Cry utilizando vesículas de ninfas do psilídeo, a fim de verificar se a proteína receptora para estas toxinas é a mesma ou não.

Após confirmada a capacidade endofítica, a patogenicidade de Bt a ninfas do psilídeo e verificar a ligação das toxinas ativas na membrana do intestino de *D. citri*, o último passo deste projeto foi avaliar a compatibilidade das estirpes de Bt com agrotóxicos, característica desejável visando uma futura aplicação das estirpes selecionadas de Bt (S1302 e S1450) como biopesticidas sistêmicos no contexto de manejo integrado dos citros.

A utilização de produtos seletivos aos agentes de controle biológico pode ser uma estratégia segura e eficiente. Além disso, a ação dos agentes de controle microbiano pode ser estimulada, reprimida ou permanecer inalterada mediante aplicação de agrotóxicos, sendo que os mesmos podem inibir o crescimento, reprodução, ocasionar mutações, e até mesmo inativar os microrganismos diminuindo sua virulência à praga específica (Alves et al., 1998; Sosa-Gómez & Moscardi, 2003; Silva et al., 2006; Silva et al., 2012; Agostini et al., 2014).

Um exemplo de controle eficiente, mas incompatível com a maioria dos inseticidas, é o do parasitoide *T. radiata*, que apesar de ser altamente eficaz no controle de *D. citri*, tem seu uso limitado devido a frequentes pulverizações em campo, sendo empregado apenas em áreas de produção orgânica, com grande ocupação de murta, ou em áreas urbanas (Parra et al., 2010; Lira et al., 2015; Santos et al., 2015).

Dentre os agrotóxicos testados, espiroclorfenol, imidacloprido, piraclostrobina e trifloxistrobina + tebuconazole foram compatíveis com o crescimento vegetativo *in vitro* das colônias de Bt (estirpes S1302 e S1450). Estudando a influência de agrotóxicos em estirpes de *B. thuringiensis*, Batista Filho et al. (2001) também observaram que o imidacloprido, em dose máxima e mínima de aplicação recomendada, apresentou compatibilidade com a bactéria entomopatogênica, assim como observado no presente estudo.

Os agrotóxicos cúpricos e o inseticida dimetoato inibiram completamente o desenvolvimento vegetativo de Bt (S1302 e S1450) *in vitro*, demonstrando a incompatibilidade das estirpes testadas com esses produtos químicos. O ingrediente ativo, a formulação e os adjuvantes utilizados, podem influenciar na compatibilidade de *B. thuringiensis* com agrotóxicos, além da dose testada (Morris, 1975; Batista Filho et al., 2001; Silva et al., 2006). Os ensaios *in vitro* demonstraram que três agrotóxicos (piraclostrobina e trifloxistrobina + tebuconazole), com efeitos fungicidas foram compatíveis com o crescimento vegetativo da bactéria. Para fungicidas, Silva et al. (2006) verificaram que os ingredientes ativos epoxiconazole, tebuconazole, azoxystrobin e fentin hidróxido influenciaram significativamente na UFC/mL independentemente da concentração do produto comercial utilizado. A compatibilidade com agrotóxicos pode estar relacionada com a capacidade que algumas espécies de *Bacillus* sp. têm em degradar alguns produtos químicos e utilizar os seus ingredientes para o seu desenvolvimento (Das et al., 2003). Neste contexto, em alguns casos, uma combinação de um produto químico com um produto biológico pode controlar as pragas agrícolas de modo mais eficiente, pois muitas vezes o produto químico convencional pode agir como um agente estressor para um inseto-praga, que por sua vez, torna-se mais vulnerável e

susceptível a doenças infecciosas, como a ocasionada por *B. thuringiensis* (Hardman & Gaul, 1990; Polanczyk & Alves, 2005).

Estudos realizados por Pinto et al. (2012) demonstraram que estirpes de *B. thuringiensis* foram compatíveis com quatro agrotóxicos, dentre eles o tiametoxan (na dose de 150g/ha). Por outro lado, quando os autores utilizaram doses maiores que as recomendadas, alguns inseticidas como tiametoxan, malation e fipronil apresentaram efeito inibitório no desenvolvimento da bactéria. Outros autores também relatam que tiametoxan inibiu a formação de colônias de Bt quando testado na dose máxima (Batista-Filho et al., 2001; 2003; Almeida et al., 2003). Desse modo, a dose recomendada dos produtos fitossanitários testados pode ser um fator determinante para a compatibilidade entre os produtos químicos e biológicos (Batista-Filho et al., 2001; Agostini et al., 2014; Veiga, 2014).

Dentre os agrotóxicos avaliados, todos demonstraram compatibilidade a ambas as estirpes de Bt quando avaliados *in vivo*, proporcionando o crescimento de colônias após seu isolamento de colônias obtidas de brotações de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’ previamente inoculados e tratados com os agrotóxicos. A grande maioria dos trabalhos avalia a compatibilidade de microrganismos *in vitro*, cuja vantagem é a exposição máxima dos entomopatógenos aos agrotóxicos. Sendo assim, se o microorganismo for compatível com um produto em condições laboratoriais, sua inocuidade em campo é praticamente garantida em relação ao efeito testado. Entretanto, a incompatibilidade *in vitro* não significa que o mesmo se refletirá em condições de campo, pois não são considerados alguns aspectos que minimizam ou anulam efeitos negativos, como por exemplo, a deriva, a diminuição gradativa da concentração do produto em função de fatores abióticos, ou até mesmo a deposição irregular do produto no campo (Alves et al., 1998; Rossi-Zalaf et al., 2008).

Os resultados sugerem que a capacidade do Bt em translocar endofiticamente em citros pode tê-lo protegido do contato com os produtos, uma vez que, quando expostas diretamente aos agrotóxicos nos ensaios *in vitro*, as estirpes foram incompatíveis com alguns deles. A compatibilidade com produtos químicos é desejável para a utilização de estirpes de Bt como alternativa de controle ao psilídeo em casa de vegetação e/ou campo, dentro de um manejo integrado. Recomenda-se, no entanto, que os produtos químicos sejam utilizados nas doses recomendadas para a citricultura.

7. CONCLUSÕES

- As estirpes de *B. thuringiensis* (Cyt1A, Cry2Aa, Cry4A, Cry10, Cry11, S1302, S1450 e S1989) translocam endofiticamente em *seedlings* de laranjeira ‘Pera’, sendo que as estirpes S1302 e S1450 translocam em mudas de citros de diferentes combinações copa/porta-enxerto, mantendo sua viabilidade e potencial patogênico para ninfas de *D. citri*;
- Células vegetativas da estirpe Btk::GFP podem ser visualizados, por microscopia de fluorescência, aderidas, principalmente, aos elementos de vasos e no xilema de amostras de caule e raiz de *seedlings* e mudas de laranjeira ‘Pera’, comprovando a capacidade de translocação endofítica de *B. thuringiensis* em citros;
- A concentração letal de esporos necessária para ocasionar mortalidade em 50% e em 80% da população de ninfas de *D. citri* é de $4,92 \times 10^4$ esporos/mL e $6,63 \times 10^7$ esporos/mL, para a estirpe S1302, respectivamente. Para a estirpe S1450, a CL₅₀ é de $2,19 \times 10^4$ esporos/mL, e a CL₈₀ é $6,18 \times 10^8$ esporos/mL, quando aplicada diretamente no substrato de *seedlings* de laranjeira ‘Pera’;
- Houve interação das toxinas Cry (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab2, Cry1B e Cry11), presentes nas estirpes S1302, S1450 e S1989, com os receptores de membrana intestinal - *Brush border membrane vesicles* (BBMV), sendo que todas as toxinas testadas possuem ligação aos receptores de membrana de ninfas de *D. citri*;
- Apesar dos agrotóxicos cúpricos e do inseticida dimetoato não terem se mostrado compatíveis *in vitro* com as estirpes de Bt - S1302 e S1450, os resultados *in planta* evidenciaram total compatibilidade dessas estirpes com todos os agrotóxicos testados. Esses resultados sugerem que a capacidade da bactéria em translocar endofiticamente em citros pode proteger o entomopatógeno do contato com os agrotóxicos, viabilizando seu uso como agente de controle biológico no manejo integrado do HLB.

REFERÊNCIAS

- ADANG, M. J., CRICKMORE, N., JURAT-FUENTES, J. L. (2014) Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. *In*: DHADIALLA, T. S. & GILL, S. S. (Ed). **Advances in Insect Physiology: Insect Midgut and Insecticidal Proteins**, Elsevier, v.47, cap. 2, p. 39-87.
- AGOSTINI, L. T., DUARTE, R. T., VOLPE, H. X. L., AGOSTINI, T. T., CARVALHO, G. A., ABRAHÃO, Y. P., POLANCZYK, R. A. (2014) Compatibility among insecticides, acaricides and *Bacillus thuringiensis* used to control *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) in cotton fields. **African Journal of Agricultural**, v. 9, n. 11, p. 941-949.
- ALI, M.I. & LUTTRELL, R.G. (2009) Response estimates for assessing heliothine susceptibility to Bt toxins. **Journal of Economic Entomology**, v.102, p. 1935–1947.
- ALMEIDA, C.O. & PASSOS, O.S. (2011) **Citricultura brasileira em busca de novos rumos: Desafios e oportunidades na região Nordeste**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 160 pp.
- ALMEIDA, J. E. M., BATISTA-FILHO, A., LAMAS, C., LEITE, L. G., TRAMA, M., SANO, A. H. (2003) Assessing the compatibility of pesticides in the conservation of pathogenic bacteria in pest management of coffee. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, p. 79-84.
- ALQUÉZAR, B., VOLPE, H. X. L., MAGNANI, R. F., MIRANDA, M. P., SANTOS, M. A., WULFF, N. A., BENTO, J.M.S., PARRA, J.R.P., BOUWMEESTER, H., PEÑA, L. (2017) β -caryophyllene emitted from a transgenic *Arabidopsis* or chemical dispenser repels *Diaphorina citri*, vector of *Candidatus liberibacters*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 5639, p 1-9.
- ALVES, G.R., DINIZ, A.J.F., PARRA, J.R.P. (2014) Biology of the Huanglongbing vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on different host plants. **Journal of Economic Entomology**, v.107, p.691-696.
- ALVES, S.B. & MORAES, S.A. (1998) Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. *In*: S. B. ALVES (Ed.), **Controle Microbiano de Insetos**, FEALQ Piracicaba, p.765-778.
- ARANDA, E., SANCHEZ, J., PERFEROEN, M., GÜERECA, L., BRAVO, A. (1996) Interactions of *Bacillus thuringiensis* Crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 68, p. 203-212.
- ARAÚJO, F.F. (2008) Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência Agropecuária**, v. 32, p. 456-462.
- AUBERT, B. (1987). *Trioza erytrae* (del Guercio) and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, v. 42, p. 149-162.
- AUBERT, B., GRISONI, M. VILLEMIN, M., ROSSO-LIN, G. (1996) **A case study of huanglongbing (greening) control in Réunion**, p. 276-278. *In*: DA GRAÇA, J. V., MORENO, P., YOKOMI, R. K. (Ed.), Proc. 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV). University of California, Riverside.
- AUSIQUE, J. J. S., D’ALESSANDRO, C. P., CONCESCHI, M. R., MASCARIN, G. M., JÚNIOR, I. D. (2017) Efficacy of entomopathogenic fungi against adult *Diaphorina citri* from laboratory to field applications. **Journal of Pest Science**, v. 90, n. 3, p. 947-960.

- AVERY, P.B., QUEELEY, G.L., FAULL, J., SIMMONDS, M.S.J. (2010) Effect of photoperiod and host distribution on the horizontal transmission of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) in greenhouse whitefly assessed using a novel model bioassay. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, n.10, p. 1097-1111.
- AZEVEDO, J.L., JÚNIOR, W.M., ARAÚJO, W.L., PEREIRA, J.O. (2002) Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L.A., BARROS, N.M., AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. EDUCS Caxias do Sul, 433 pp.
- BABU, A.G., KIM, J., OH, B. (2013) Enhancement of heavy metal phytoremediation by *Alnus firma* with endophytic *Bacillus thuringiensis* GDB-1. **Journal of Hazardous Materials**, v. 250, p. 477-483.
- BALBINOTTE, J. (2011) **Desenvolvimento de sistemas de aquisição de *Bacillus thuringiensis* por *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) para estudos de patogenicidade**. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 93 pp.
- BASSANEZI, R. B., MONTESINO, L. H., GIMENES-FERNANDES, N., YAMAMOTO, P. T., GOTTWALD, T. R., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A. (2013) Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of Huanglongbing in young sweet orange plantings. **Plant Disease**, v. 97, p.789-796.
- BAUM, J.A., SUKURU, U.R., PENN, S.R., MEYER, S.E., SUBBARAO, S., SHI, X., FLASINSKI, S., HECK, G.R., BROWN, R.S., CLARK, T.L. (2012) Cotton plants expressing a hemipteran-active *Bacillus thuringiensis* crystal protein impact the development and survival of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) nymphs. **Journal of Economic Entomology**, v. 105, p. 616-624.
- BELASQUE JR., J., BERGAMIN FILHO, A., BASSANEZI, R.B., BARBOSA, J.C., GIMENES FERNANDES, N., YAMAMOTO, P.T., LOPES, S.A., MACHADO, M.A., LEITE JR., R.P., AYRES, A.J., MASSARI, C.A. (2009) Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p.137-145.
- BENINCASA, M.M.P & LEITE, I.C. (2002) **Fisiologia Vegetal**, Funep Jaboticabal, 169 pp.
- BERRY, C. & CRICKMORE, N. (2017) Structural classification of insecticidal proteins – Towards an in silico characterisation of novel toxins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 142, p.16-22.
- BIDESHI, D.K., WALDROP, G., FERNANDEZ-LUNA, M.T., DIAZ-MENDOZA, M., WIRTH, M.C., JOHNSON, J.J., PARQUE, H.W., FEDERICI, B.A. (2013) Intermolecular interaction between Cry2Aa and Cyt1Aa and its effect on larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 23, n. 8, p. 1107-1115.
- BONANI, J.P., FERERES, A., GARZO, E., MIRANDA, M. P., APPEZZATO-DA-GLORIA, B., LOPES, J.R.S. (2010) Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.134, n. 1, p. 35-49.
- BOSCARIOL-CAMARGO RL, CRISTOFANI-YALY, M., MALOSSO, A., COLETTA-FILHO, H.D., MACHADO, M.A. (2010) Avaliação de diferentes genótipos de citros à infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.1, p.85-90.
- BOVÉ, J.M. & AYRES, A.J. (2007) Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo State: sudden death, variegated chlorosis and Huanglongbing. **IUBMB Life**, v. 59, p.346-354.

- BOVÉ, J.M. (2006) Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, p. 7-37.
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254.
- BRAR, S. K., VERMA, M., TYAGI, R. D., & VALÉRO, J. R. (2006) Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 323-342.
- BRAVO A., PACHECO S., GÓMEZ I., GARCIA-GÓMEZ B., ONOFRE J., SOBERÓN M. (2017) Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and their mechanism of action. In: FIUZA, L., POLANCZYK, R., CRICKMORE, N. (Ed) ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus***. Springer, Cham, p. 53-66.
- BRAVO, A. G., I, HELENA PORTA, H., GARCÍA-GÓMEZ, B.I., RODRIGUEZ-ALMAZAN, C., PARDO, L., SOBERÓN, M. (2012) Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial Biotechnology**, v. 6, p. 17-26. 2012.
- BRAVO, A., GÓMEZ, I., PORTA, H., GARCÍA-GÓMEZ, B.I., RODRIGUEZ-ALMAZAN, C., PARDO, L., SOBERÓN, M. (2012) Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial Biotechnology**, v. 6, p. 17-26.
- BRAVO, A., LIKITVIVATANAVONG, S., GILL, S.S., SOBERÓN, M. (2011) *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, p. 423-431.
- BRAVO, A., SARABIA, S., LOPEZ, L., ONTIVEROS, H., ABARCA, C., ORTIZ, A., ORTIZ, M., LINA, L., VILLALOBOS, F.J., PEÑA, G., NUÑEZ-VALDEZ, M.E., SOBERÓN, M., QUINTERO, R. (1998) Characterization of cry genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection applied and environmental microbiology. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n.12, p. 4965-4972.
- CACCIA, S., HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S., MAHON, R. J., DOWNES, S., JAMES, W., BAUTSOENS, N., RIE, J.V., FERRE, J. (2010) Binding site alteration is responsible for field-isolated resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins in two *Helicoverpa* species. **Plos One**, v. 5, n. 4, e9975.
- CAIXETA, C. F. (2015) **Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas à *Helicoverpa armigera* e promotoras de crescimento vegetal**. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 82 pp.
- CANALE, M. C., TOMASETO, A. F., HADDAD, M. D. L., DELLA COLETTA-FILHO, H., LOPES, J. R. S. (2016) Latency and Persistence of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in its psyllid vector, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Phytopathology**, v. 107, n. 3, p. 264-272.
- CANALES, E., COLL, Y., HERNÁNDEZ, I., PORTIELES, R., RODRÍGUEZ GARCÍA, M., LÓPEZ, Y., ET AL. (2016) ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*,’ causal agent of citrus huanglongbing, is reduced by treatment with brassinosteroids. **Plos One**, v. 11, n. 1, p. e0146223.
- CARRIÈRE, Y., CRICKMORE, N., TABASHNIK, B. E. (2015) Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 161-168.
- CARRIÈRE, Y., FABRICK, J.A., TABASHNIK, B.E. (2016) Advances in managing pest resistance to Bt crops: pyramids and seed mixtures. In: **Advances in insect control and resistance management**. HOROWITZ, A.R. & ISHAAYA, I. (Ed). Springer International Publishing, Cham, Switzerland. p. 263-286.
- CARVALHO, S.P.L. (2008) **Toxicidade de inseticidas neonicotinóides sobre o psílideo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) e o parasitóide *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera:**

- Eulophidae**). Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 59 pp.
- CERÓN, J., COVARRUBIAS, L., QUINTERO, R., ORTIZ, A., ORTIZ, M., ARANDA, E., LINA, L., BRAVO, A. (1994) PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 353–356.
- CERÓN, J., ORTÍZ, A., QUINTERO, R., GÜERECA, L., BRAVO, A. (1995) Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 11, p. 3826–3831.
- CHEN, Y., YAN, F., CHAI, Y., LIU, H., KOLTER, R., LOSICK, R., GUO, J.H. (2013) Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. **Environmental Microbiology**, v.15, n.3, p.848–864.
- CHOUGULE, N.P. & BONNING, B.C. (2012) Toxins for transgenic resistance to hemipteran pests. **Toxins (Basel)**, v. 4, n. 6, p. 405-29.
- CHOUGULE, N.P., LIA, H., LIUA, S., LINZA, L.B., NARVAB, K.E., MEADEB, T., BONNINGA, B.C. (2013) Retargeting of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cyt2Aa against hemipteran insect pests. **PNAS**, v. 110 n. 21, p. 8465-8470.
- CIFUENTES-ARENAS, J.C., DE GOES A., DE MIRANDA, M.P., BEATTIE, G.A.C., LOPES, S.A. (2018) Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. **Plos One**, v. 13, n. 1, e0190563.
- COLETTA-FILHO, H.D., TARGON, M.L.P.N., TAKITA, M.A., DE NEGRI, J.D., POMPEU JR, J., MACHADO, M.A., DO AMARAL, A.M., MULLER, G.W. (2004) First report of the causal agent of huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, p.1382.
- COSTA, F.S.S. (2014) *Bacillus thuringiensis* como endofíticos em algodão: avaliação na promoção de crescimento e controle de *Spodoptera frugiperda*. Dissertação (Mestrado), Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, DF, 99 pp.
- COSTA, J. R., ROSSI, J. R., MARUCCI, S. C., ALVES, E. C. D. C., VOLPE, H. X., FERRAUDO, A. S., LEMOS, M.V.F., DESIDÉRIO, J. A. (2010) Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 5, p. 757-766.
- COSTA, L. E. O., QUEIROZ, M. V., BORGES, A. C., MORAES, C. A., ARAÚJO, E. F. (2012) Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1562-1575.
- CPL BUSINESS CONSULTANTS (2010) The 2010 worldwide biopesticides market summary. Walingford: **CAB International Centre**, v. 1, p. 1-39.
- CRICKMORE, N., BAUM, J., BRAVO, A., LERECLUS, D., NARVA, K., SAMPSON, K., SCHNEPF, E., SUN, M. ZEIGLER, D.R. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: <<http://www.btnomenclature.info/>>. Acesso em 10 de dezembro de 2016.
- CRICKMORE, N., ZEIGLER, D.R., SCHNEPF, E., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., BRAVO, A., DEAN, D.H. (2015) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html> Acesso em 10 de junho de 2015.

- CRISTOFOLETTI, P.T., RIBEIRO, A.F., DERAISON, C., RAHBE, Y., TERRA, W.R. (2003) Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, p. 11–24.
- CROXTON, S. D., & STANSLY, P. A. (2014) Metalized polyethylene mulch to repel Asian citrus psyllid, slow spread of Huanglongbing and improve growth of new citrus plantings. **Pest Management Science**, v.70, n. 2, p. 318-323.
- CUNHA, T. DORTA, S.O., MONNERAT, R., MIRANDA, M.P., MACHADO, M.A., FREITAS-ASTÚA, J. (2017) *Bacillus thuringiensis* translocation inside citrus plants and insecticidal activity against *Diaphorina citri*, vector of HLB causal agents. In: 3rd Hemipteran-plant Interactions Symposium – S7 Pest-Disease and Management, Madrid-Spain, Anais online, p. 191. Disponível em: <http://www.hpis2017.csic.es/wp-content/uploads/2015/12/Book_of_Abstracts_Hpis_2017_L.pdf> Acesso em novembro de 2017.
- DA GRAÇA, J. V. (1991) Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p.109- 36.
- DAS, A. C., CHAKRAVARTY, A., SUKUL, P., MUKHERJEE, D. (2003) Influence and persistence of phorate and carbofuran insecticides on microorganisms in rice field. **Chemosphere**, v. 53, n. 8, p. 1033-1037.
- DE MAAGD, R.A., BRAVO, A., CRICKMORE, N. (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 4, p. 193-199.
- DEL GUERCIO (1918) Il cecídio delle foglie del limone ed il suo cecidozoa in Eretrea. **Agric. Clon.**, v. 12, p. 167-169.
- DJENANE, Z., NATECHE, F., AMZIANE, M., GOMIS-CEBOLLA, J., EL-AICHAR, F., KHORF, H., FERRÉ, J. (2017) Assessment of the antimicrobial activity and the entomocidal potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from Algeria. **Toxins**, v. 9, n. 4, p. 139.
- DÖBEREINER, J., REIS, V. M., PAULA, M. A., OLIVARES, F. (1993) Endophytic diazotrophic in sugar cane, cereal and tuber plants. In: PALACIOS, R., MORA, J., NEWTON, W.F. (Ed) **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 671-676.
- DORTA, S. O. (2014) **Caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* patogênicos à *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 75 pp.
- DOUD, M., ZHANG, M.Q., POWELL, C.A., DUAN, Y.P. (2013) **Thermotherapy and chemotherapy to control citrus HLB in the field**. 3rd International Research Conference of Huanglongbing. (Abstract). Florida. USA. 4-7 February.
- DUCHET, C., TETREAU, G., MARIE, A., REY, D., BESNARD, G., PERRIN, Y., PARIS, M., DAVID, J.P., LAGNEAU, C., DESPRÉS, L. (2014) Persistence and recycling of bioinsecticidal *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* spores in contrasting environments: evidence from field monitoring and laboratory experiments. **Microbial Ecology**, v. 67, p. 576.
- EL-SHESHENY, I., EL-HAWARY, I., MESBAH, I., KILLINY, N. (2016) Comparative proteomic analysis between fifth-instar nymphs and adults of Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*. **Physiological Entomology**, v. 41, n. 2, p. 162-184.
- EL-SHESHENY, I., HAJERI, S., EL-HAWARY, I., GOWDA, S., KILLINY, N. (2013) Silencing abnormal wing disc gene of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* disrupts adult wing development and increases nymph mortality. **Plos One**, v. 8, n. 5, p. 65392.

- ESTADOS UNIDOS. DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (2015) **Citrus: word markets and trade**. Washington. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>> Acesso em 30 de julho de 2015.
- ESTRUCH, J. J., WARREN, G. W., MULLINS, M. A., NYE, G. J., CRAIG, J. A., KOZIEL, M. G. (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 5389-5394.
- ÉTIENNE, J., QUILICI, S., MARIVAL, D., FRANCK, A. (2001) Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). **Fruits**, v. 56, p. 307-315.
- FAN, G., LIU, B., LIE, X., CAI, Z., HU, H., WANG, X., RUAN, C., LU, L., SEQUEIRA, R., XIA, Y. (2014) Study of thermotherapy against citrus huanglongbing in Fujian province, China. **Journal of Citrus Pathology**, v.1 n.1., p.216.
- FAN, G.C., XIA, Y.L., LIN, X.J., HU, H.-Q., WANG, X.D., RUAN, C.Q., LIU, L.M., LIU, B. (2016) Evaluation of thermotherapy against Huanglongbing (citrus greening) in the greenhouse. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, p. 111–119.
- FERNÁNDEZ, L.E., GÓMEZ, I. PACHECO, S., ARENAS, I., GRILL, S.S., BRAVO, A., SOBERÓN, M. (2008) Employing phage display to study the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. **Peptides**, v. 29, p. 324-329.
- FERREIRA, C., OKUMA, D.M., LOPES, J.R.S., (2013) **Stylet penetration activities of *Diaphorina citri* associated with transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus***. In: 3rd International Research Conference on Huanglongbing – IRCHLBIII. Orlando, EUA. p. 68.
- FINNEY, D. 1971. **Probit analysis**. Cambrige University Press, Cambridge, p. 50-80.
- FIÚZA, L.M. & BERLITZ, D.L. (2009) Produtos de *Bacillus thuringiensis*: Registro e Comercialização. **Biотecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 38, p.58060.
- FOLIMONOVA, S. Y., ROBERTSON, C. J., GARNSEY, S. M., GOWDA, S., DAWSON, W. O. (2009) Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. **Phytopathology**, v. 99, p.1346-1354.
- FUNDECITRUS – Fundo de Defesa da Citricultura (2017b) **Inventário de árvores do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro: retrato dos pomares em março de 2017**. Araraquara, SP: Fundecitrus, 95 pp.
- FUNDECITRUS – Fundo de Defesa da Citricultura. (2017a) Estimativa da safra de laranja 2017/18 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro: cenário em maio/2017. In: **Reestimativa da safra de laranja 2017/18 do cinturão citrícola de São Paulo e triângulo/sudoeste Mineiro – cenário em dezembro/2017**. Araraquara, SP: Fundecitrus, 26 pp.
- GALDEANO, D. M., BRETON, M. C., LOPES, J. R. S., FALK, B. W., MACHADO, M. A. (2017) Oral delivery of double-stranded RNAs induces mortality in nymphs and adults of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Plos One**, v. 12, n. 3, p. e0171847.
- GARCÍA-SUÁREZ, R., VERDUZCO-ROSAS, L.A., DEL RINCÓN-CASTRO, M.C., DÉLANO-FRIER, J.P., IBARRA, J.E. (2017) Translocation of *Bacillus thuringiensis* in *Phaseolus vulgaris* tissues and vertical transmission in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 1092-1100.

- GARZO, E., BONANI, J.P., LOPES, J.R., FERERES, A. (2012) Morphological description of the mouthparts of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). **Arthropod Structure & Development**, v. 41, n. 1, p. 79-86.
- GERMAINE, K., KEOGH, E., GARCIA-CABELLOS, G., BORREMANS, B., VAN DER LELIE, D., BARAC, T., OEYEN, L., VANGRONSVELD, J., MOORE, F.P., MOORE, E.R.B., CAMPBELL, C.D., RYAN, D., DOWLING, D.N. (2004) Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes, **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, n. 1, p. 109–118.
- GLARE, T. R. & O'CALLAGHAN, M. (2000) *Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety*. Chichester: JOHN WILEY & SONS, 350 pp.
- GÓMEZ, I., SÁNCHEZ, J., MUÑOZ-GARAY, C., MATUS, V., GILL S. S., SOBERÓN, M., BRAVO, A. (2014) *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins are versatile proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. **Biochemical Journal**, v. 459, n. 2. p. 383-396.
- GOND, S. K., BERGEN, M. S., TORRES, M. S., WHITE JR, J. F. (2015) Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. **Microbiological Research**, v. 172, p. 79-87.
- GONZÁLEZ, J. M. J., BROWN, B. J., CARLTON, B. C. (1982) Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, p. 6951-6955.
- GOTTWALD, T.R. (2010) Current epidemiological understanding of citrus *Huanglongbing*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 119–139.
- HABIB, M.E.M. & ANDRADE, C.F.S. (1998) Bactérias Entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. FEALQ Piracicaba, Cap.9, p. 383-446.
- HAJERI, S., KILLINY, N., EL-MOHTAR, C., DAWSON, W.O., GOWDA, S., (2014) Citrus tristeza virus-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing). **Journal of Biotechnology**, v. 176, p. 42-49.
- HALL, D. G., SHATTERS, R. G., CARPENTER, J. E., SHAPIRO, J. P (2010) Research toward an artificial diet for adult Asian citrus psyllid. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 103, n. 4, p. 611–617.
- HALL, D.G., RICHARDSON, M.L., AMMAR, E., HALBER, S.E. (2012) Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.146, p. 207–223.
- HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W.F., KLOEPPER, J.W. (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914.
- HAWKINGS, C., MORGAN, K., SHAFFER, L., POWELL, C., BOROVSKY, D., CAVE, R., DAWSON, B., GOWDA, S., SHATTERS, R.G., JR. (2014) RNAi-Based strategy for Asian Citrus Psyllid (*Diaphorina citri*) control: A method to reduce the spread of citrus greening disease. 3rd International Research Conference on Huanglongbing - IRCHLB III. **Journal of Citrus Pathology**, v. 1, p. 160.
- HILF, M.E., SIMS, K.R., FOLIMONOVA, S.Y., ACHOR, D.S. (2013) Visualization of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ cells in the vascular bundle of citrus seed coats with fluorescence in situ hybridization and transmission electron microscopy. **Phytopathology**, v. 103, p. 545-554.
- HINDE, J. & DEMÉTRIO, C.G.B. (1998) Overdispersion: models and estimation. **Computation Statistics & Data Analysis**, v. 27, p. 151-170.

- HOFMANN, C., LÜTHY, P., HUTTER, R., PLISKA, V. (1988) Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). **The FEBS Journal**, v. 173, n. 1, p. 85-91.
- HONG, C. E., & PARK, J. M. (2016) Endophytic bacteria as biocontrol agents against plant pathogens: current state-of-the-art. **Plant Biotechnology Reports**, v. 10, n. 6, p. 353–357.
- HYNES, R. K., & BOYETCHKO, S. M. (2006) Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. **Soil Biology Biochemistry**, v. 38, p. 845-849.
- IBARRA, J.E., DEL RINCÓN, M.C., ORDÚZ, S., NORIEGA, D., BENINTENDE, G., MONNERAT, R., REGIS, L., DE OLIVEIRA, C.M. F., LANZ, H., RODRIGUEZ, M.H., SÁNCHEZ, J., PEÑA, G., BRAVO, A. (2003) Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5269–5274.
- JAMES, C. (2014) **Global status of commercialized biotech/GM Crops: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications – ISAAA**, Brief, n. 44 (ISAAA, Ithaca, NY).
- JEONG, H., JO, S.H., HONG, C.E., PARK, J.M. (2016) Genome sequence of the endophytic bacterium *Bacillus thuringiensis* strain KB1, a potential biocontrol agent against phytopathogens. **Genome Announcements**, v. 4, n.2, p. 00279–16
- JISHA, V.N., SMITH, R.B., SAILAS, B. (2013) An overview on the crystal toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Advances in Microbiology**, v.3, p. 462-472.
- JOHNSON, E.G., WU, J., BRIGHT, D.B., GRAHAN, J.H. (2014) Association of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. **Plant Pathology**, v.63, n.2, p. 290-298.
- JONES, K. A. & BURGESS, H. D. (1998) Technology of formulation and application. In: BURGESS, H. D. (Ed.). **Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments**, Dordrecht: Kluwer Academic, p. 7-30.
- JOUNG, K.B. & CÔTÉ, J.C. (2000) A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Hort Res Dev Centre Tech Bull**, v. 29, p. 1-16.
- JOUZANI, G. S., VALIJANIAN, E., SHARAFI, R. (2017) *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 7, p. 2691-2711.
- JURAT-FUENTES, J.L. & CRICKMORE, N. (2016) Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: insights from their mode of action. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 142, p. 5-10.
- JURAT-FUENTES, J.L. & JACKSON, T.A. (2013) Chapter 8 - Bacterial entomopathogens. In: VEGA, F.E. & KAYA, H.K. **Bacterial Entomopathogens, In Insect Pathology** (2^a Ed.), Academic Press, San Diego, p. 265-349.
- KILLINY, N., HAJERI, S., TIWARI, S., GOWDA, S., STELINSKI, L.L. (2014) Double-Stranded RNA uptake through topical application, mediates silencing of five *CYP4* genes and suppresses insecticide resistance in *Diaphorina citri*. **Plos One**, v. 9, n. 10, p.110536.
- KIM, J. S., SAGARAM, U. S., BURNS, J. K., LI, J. L., WANG, N (2009) Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” infection: microscopy and microarray analyses. **Phytopathology**, v. 99, n. 1, p. 50-7.

- KOH, E. J., ZHOU, L., WILLIAMS, D. S., PARK, J., DING, N., DUAN, Y. P., KANG, B. H. (2012). Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. **Protoplasma**, v. 249, n. 3, p. 687–697.
- KONECKA, E., BARANEK, J., HRYCAK, A., KAZNOWSKI, A. (2012) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from soil and water. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-5.
- KRIEG, A. (1971) Is the potential pathogenicity of bacilli for insects related to production of alpha exotoxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 18, p. 425-426.
- KRYWUNCZYK, J & FAST, P.G. (1980) Sorological relationships of the crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 36, p. 139-140.
- KUCHMENT, A. (2013) The end of orange juice. **Scientific American**, v. 308, n. 3, p. 44-51.
- LACAVA, P. T., & AZEVEDO, J. L. (2014) Biological control of insect-pest and diseases by endophytes. In: **Advances in Endophytic Research**, Springer India, p. 231-256.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature**, v. 227, p. 680.
- LEZAMA-GUTIÉRREZ, R., MOLINA-OCCHOA, J., CHÁVEZ-FLORES, O., ÁNGEL-SAHAGÚN, C.A., SKODA, S.R., REYES-MARTÍNEZ, G. BARBA-REYNOSO, M., REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ, O., RUÍZ-AGUILAR, G.M.L., FOSTER, J.E. (2012) Use of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana* and *Isaria fumosorosea* to control *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Persian lime under field conditions. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 32, n. 1, p. 39–44.
- LI, H., CHOUGULE, N.P., BONNING, B.C. (2011) Interaction of the *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins Cry1Ac and Cry3Aa with the gut of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, n. 1, p. 69-78.
- LI, J.D., CARROLL, J., ELLAR, D.J., (1991) Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, v. 353, p. 815–821.
- LIRA, A. C. S., ZANARDI, O. Z., BELOTI, V. H., BORDINI, G. P., YAMAMOTO, P. T., PARRA, J. R. P., CARVALHO, G. A. (2015) Lethal and sublethal impacts of acaricides on *Tamarixia radiata* (Hemiptera: Eulophidae), an important ectoparasitoid of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Journal of Economic Entomologic**, v. 108, n. 5, p. 2278-2288.
- LIU, B., LIN, X., CAI, Z., HU, H., WANG, X., RUAN, C., LU, L., SEQUEIRA, R., XIA, Y. (2014) Study of thermotherapy against citrus huanglongbing in Fujian Province, China. 3rd International Research Conference on Huanglongbing - IRCHLB III. **Journal of Citrus Pathology**, v. 1, p. 216.
- LIU, D., CAI, J., XIE, C.C., LIU, C., CHEN, Y.H. (2010) Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its biocontrol potential. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 46, p. 252–256.
- LIU, Y., WANG, Y., SHU, C., LIN, K., SONG, F., BRAVO, A., SOBERÓN, M., ZHANG, J. (2017) Cry64Ba and Cry64Ca, two ETX/MTX2 *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins against hemipteran pests. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 3, p. e01996-17.
- LOPES, S.A., MARTINS, E.C., FRARE, G.F. (2005) Detecção de *Candidatus Liberibacter americanus* em *Murraya paniculata*. **Summa Phytopathology**, v. 31, p. 48–49.

- MADUELL, P., ARMENGOL, G., LLAGOSTERA, M., LINDOW, S., ORDUZ, S. (2007) Immigration of *Bacillus thuringiensis* to bean leaves from soil inoculum or distal plant parts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2593–2600.
- MADUELL, P., ARMENGOL, G., LLAGOSTERA, M., ORDUZ, S., LINDOW, S. (2008) *B. thuringiensis* is a poor colonist of leaf surfaces. **Microbial Ecology**, v. 55, p. 212–219.
- MAFRA, V., MARTINS, P.K., FRANCISCO, C.S., RIBEIRO-ALVES, M., FREITAS-ASTÚA, J., MACHADO, M.A. (2013) *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. **BMC Genomics**, v. 14, p. 247.
- MANN, R.S., PELZ-STELINSKI, K., HERMANN, S.L., TIWARI, S., STELINSKI, L.L. (2011) Sexual Transmission of a Plant Pathogenic Bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, between Conspecific Insect Vectors during Mating. **Plos One**, v. 6, n. 12, p.29197.
- MASCARIN, G.M., JACKSON, M.A., KOBORI, N.N., BEHLE, R.W., DELALIBERA-JÚNIOR, I. (2015) Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 127, p. 11–20.
- MCCULLY, E.M. (2001) Niches for bacterial endophytes in crop plants: A plant biologist's view. **Functional Plant Biology**, v. 28, p. 983–990.
- MELATTI, V.M., PRAÇA, L.B., MARTINS, E.S., SUJII, E., BERRY, C., MONNERAT, R.G. (2010) Selection of *Bacillus thuringiensis* strains toxic against cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). **BioAssay**, v. 5, p. 1–4.
- MELO, A. L. D. A., SOCCOL, V. T., SOCCOL, C. R. (2016). *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 317–326.
- MELO, A.L.A., SOCCOL, V.T., SOCCOL, C.R. (2014) *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, p. 317–326.
- MENDOZA, G.; PORTILLO, A.; ARIAS, E.; RIBAS, R.M.; OLMOS, J. (2012) New combinations of *cry* genes from *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Northwestern Mexico. **International Microbiology**, v. 15, p. 209–216.
- MEYER, J.M., HOY, M.A., BOUCIAS, D.G. (2008) Isolation and characterization of an *Isaria fumosorosea* isolate infecting the Asian citrus psyllid in Florida. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 99, p. 96–102.
- MICHAUD, J.P. (2004) Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. **Biological Control**, v. 29, p. 417–431.
- MIGUEL, P.S.B., DELVAUX, J.C., DE OLIVEIRA, M.N.V., MONTEIRO, L.C.P., FREITAS, F. DE S., COSTA, M.D., TÓTOLA, M.R., MORAES, C.A. DE, BORGES, A.C. (2013) Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffea canephora*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n.7, p. 586–594.
- MIRANDA, M. P., DOS SANTOS, F. L., BASSANEZI, R. B., MONTESINO, L. H., BARBOSA, J. C., SÉTAMOU, M. (2017). Monitoring methods for *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) on citrus groves with different insecticide application programmes. **Journal of Applied Entomology**, v. 142, p. 89–96.
- MIRANDA, M. P., DOS SANTOS, F. L., FELIPPE, M. R., MORENO, A., FERERES, A. (2015) Effect of UV-blocking plastic films on take-off and host plant finding ability of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n.1, p. 245–251.

- MIRANDA, M.P., NORONHA JR, N.C., MARQUES, R.N. (2011) Alternativas para o manejo do vetor do greening no Brasil. *In: Avanços em Fitossanidade*, Botucatu: UNESP/FEPAF, p. 143-163.
- MIRANDA, M.P., TOMASETO, A.F., ZANARDI, O.Z., VOLPE, H.X.L., VIZONI, M.C., LOPES, J.P. MARTINI, F.M. (2017) **Kaolin affecting the host plant finding ability of *Diaphorina citri* in field conditions**. *In: 3rd Hemipteran-plant Interactions Symposium – S7 Pest-Disease and Management*, Madrid-Spain, Anais online p.177. Disponível em <http://www.hpis2017.csic.es/wp-content/uploads/2015/12/Book_of_Abstacts_Hpis_2017_L.pdf> Acesso em janeiro de 2018.
- MONNERAT, R. G., BATISTA, A. C., DE MEDEIROS, P. T., MARTINS, E. S., MELATTI, V. M., PRAÇA, L. B., DUMAS, V.F., MORINAGA, C., DEMO, C., GOMES, A.C.M., FALCÃO, R., SIQUEIRA, C.B., SILVA-WERNECK, J.O., BERRY, C. (2007) Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, v. 41, n.3, p. 291-295.
- MONNERAT, R., DOS SANTOS, R. C., BARROS, P. C., BATISTA, A. C., BERRY, C. (2003) **Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), p. 1-4.
- MONNERAT, R., PEREIRA, E., TELES, B., MARTINS, E., PRAÇA, L., QUEIROZ, P., SOBERON, M., BRAVO, A., RAMOS, F., SOARES, C. M. (2014) Synergistic activity of *Bacillus thuringiensis* toxins against *Simulium* spp. larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 121, p. 70-73.
- MONNERAT, R.G. & BRAVO, A. (2000) Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. *In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (Ed.). Controle biológico*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 3, p. 163-200.
- MONNERAT, R.G., SILVA, S.F., SILVA-WERNECK, J.O. (2001) **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 65 pp.
- MONNERAT, R.G., SOARES, C.M.S., GOMES, A.C.M., JONES, G., MARTINS, E., PRAÇA, L., BERRY, C. (2009) Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* bacteria living inside of plants. **Microbial Biotechnology**, v. 2, p. 1560-1562.
- MORETINI, A. & MELO, I.S. (2007) Formulação do fungo *Coniothyrium minitans* para controle do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p. 155-161.
- MORRIS, O. N. (1975) Effect of some chemical insecticides on the germination and replication of commercial *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 26, n. 2, p. 199-204.
- NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S, CARVALHO, R.P.L, BATISTA, G.C, BERTI FILHO, E., PARRA, J.R.P., ZUCCHI, R.A., ALVES, S.B., VENDRAMIN, J.D., MARCHINI, L.C., LOPES, J.R.S., OMOTO, C. (2002) **Entomologia Agrícola**. FEALQ Piracicaba, 920 pp.
- NARKHEDE, C. P., KOLI, S. H., SURYAWANSHI, R. K., PATIL, C. D., BORASE, H. P., PATIL, S. V. (2016) Potentiation of *Bacillus thuringiensis* by using some natural products: Novel preparations against dengue vector *Aedes aegypti* larvae. *Indian Journal of Natural Products and Resources (IJNPR) Formerly Natural Product Radiance*, v. 7, n.3, p. 229-233.
- NAVA, D.E., TORRES, M.L.G., RODRIGUES, M.D.L., BENTO, J.M.S., PARRA, J.R.P. (2007) Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**, v. 131, p. 709-715.

- NELDER, J.A. & WEDDERBURN, R.W.M. (1972) Generalized linear models. **Journal of the Royal of Statistical Society**, v. 135, p. 370-384.
- NEVES, M.F., TROMBIN, V.G., MILAN, P., LOPES, F.F., CRESSONI, F., KALAKI, R. (2010) O retrato da citricultura brasileira, São Paulo: **CitrusBR**, 138 pp.
- ORDUÑO-CRUZ, N., GUZMÁN-FRANCO, A.W., RODRÍGUEZ-LEYVA, E., ALATORRE-ROSAS, R., GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, H., MORA-AGUILERA, G. (2015) *In vivo* selection of entomopathogenic fungal isolates for control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), **Biological Control**, v. 90, p. 1-5.
- OYEDIRAN, I. O., MATTHEWS, P., PALEKAR, N., FRENCH, W., CONVILLE, J., BURD, T. (2016) Susceptibility of northern corn rootworm *Diabrotica barberi* (Coleoptera: Chrysomelidae) to mCry3A and eCry3. 1Ab *Bacillus thuringiensis* proteins. **Insect Science**, v. 23, n. 6, p. 913-917.
- ÖZAKTAN, H. & BORA, T. (2004) Biological control of fire blight in pear orchards with a formulation of *Pantoea agglomerans* strain Eh 25. **Brazilian Journal Microbiology**, v.35, p. 224-229.
- PALMA, L., MUÑOZ, D., BERRY, C., MURILLO, J., CABALLERO, P. (2014a) Review: *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, p. 3296-3325.
- PALMA, L., MUÑOZ, D., BERRY, C., MURILLO, J., ESCUDERO, I.R.D., CABALLERO, P. (2014b) Molecular and insecticidal characterization of a novel Cry-related protein from *Bacillus thuringiensis* toxic against *Myzus persicae*. **Toxins**, v. 6, n. 11, p. 3144-3156.
- PARDO, S., MARTÍNEZ, A. M., FIGUEROA, J. I., CHAVARRIETA, J. M., VIÑUELA, E., REBOLLAR-ALVITER, Á., MIRANDA, M.A., VALLE, J., PINEDA, S. (2017) Insecticide resistance of adults and nymphs of Asian citrus psyllid populations from Apatzingán Valley, Mexico. **Pest Management Science**, v. 74, n.1, p. 135-140.
- PARDO-LOPEZ, L., SOBERON, M., BRAVO, A., (2012) *Bacillus thuringiensis* insecticidal 3-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 1, p. 3-22.
- PARRA, J. R. P., ALVES, G. R., DINIZ, A. J. F., & VIEIRA, J. M. (2016) *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) × *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae): mass rearing and potential use of the parasitoid in Brazil. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 7, n. 1, p. 1-11.
- PARRA, J.R.P., DINIZ, A.J.F., VIEIRA, J.M., ALVES, G.R. (2017) **Utilização do parasitoide *Tamarixia radiata* como componente do manejo integrado do *huanglongbing***, Araraquara, SP: Fundecitrus, 38 pp.
- PARRA, J.R.P., LOPES, J.R.S., TORRES, M.L.G., NAVA, D.E., PAIVA, P.E.B. (2010) Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao *Huanglongbing*. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 1, p. 37-51.
- PELZ-STELINSKI, K.S., BRLANSKY, R.H., EBERT, T.A., ROGERS, M.E. (2010) Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian citrus psyllid Hemiptera: Psyllidae. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, p. 1531-1541
- PINTO, L. M. N., DÖRR, N. C., RIBEIRO, A. P. A., SALLES, S. M., OLIVEIRA, J. V. DE, MENEZES, V. G., FIUZA, L. M. (2012) *Bacillus thuringiensis* monogenic strains: Screening and interactions with insecticides used against rice pests. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 618-626.

- PINTO, L.M.N. & FIUZA, L.M. (2008) Genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* aplicados na engenharia genética de plantas, conferindo resistência a insetos-praga. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 3, n. 3, p. 159-168.
- POCAR, M., GRENIER, A.M., FEDERICI, B., RAHBE, Y. (2009) Effects of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins on the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 4897-4900.
- POLANCZYK, R. & ALVES, S. (2003) *Bacillus thuringiensis*: Uma Breve Revisão. **Agrociência**, v. 7, n. 2, p. 1-10.
- POLANCZYK, R.A. (2004) **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 144 pp.
- POLLI, A., DAS NEVES, A.F., GALO, F.R., GAZARINI, J., RHODEN, S.A., PAMPHILE, J.A. (2012) Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 2, p. 82-89.
- PRAÇA, L.B., GOMES, A.C.M.M., CABRAL, G., MARTINS, E.S., SUJII, E.R., MONNERAT, R.G. (2012) Endophytic colonization by brazilian strains of *Bacillus thuringiensis* on cabbage seedlings grown *in vitro*. **Bt Research**, v.3, n. 3, p. 11-19.
- PRAÇA, L.B., SOARES, C.M., MELATTI, V.M., MONNERAT, R.G. (2007) ***Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae): aspectos gerais, modo de ação e utilização**, Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 40 pp. (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 0102 - 0110, 239).
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2016) **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna: Austria.
- RAMADUGU, C., KEREMANE, M. L., HALBERT, S. E., DUAN, Y. P., ROOSE, M. L., STOVER, E., & LEE, R. F. (2016) Long-term field evaluation reveals Huanglongbing resistance in citrus relatives. **Plant Disease**, v. 100, n. 9, p. 1858-1869.
- RAMOS, J.E., SHATTERS, R.G., POWELL, C.A., BOROVSKY, D., JAIN, R., SHAFFER, L., BEN-MAHMOUD, S.K. (2014) RNA interference screening reveals redox processes to be most responsive to Low dsRNA doses in Asian Citrus Psyllid. 3rd International Research Conference on Huanglongbing - IRCHLB III. **Journal of Citrus Pathology**, v. 1, n. 1, p. 516.
- RAUSCH, M.A., CHOUGULE, N.P., DEIST, B.R., BONNING, B.C. (2016) Modification of Cry4Aa toward improved toxin processing in the gut of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. **Plos One**, v. 11, n. 5, e0155466.
- RAYMOND, B., JOHNSTON, P.R., NIELSEN-LEROUX, C., LERECLUS, D., CRICKMORE, N. (2010) *Bacillus thuringiensis*: an impotente pathogen? **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 189-194.
- RIVERO-ARAGON, A., AND H. GRILLO-RAVELO. (2000) Natural enemies of *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) in the central region of Cuba. **Centro Agricola**, v. 27, n. 3 p. 87-88.
- RODRIGO-SIMÓN, A., CACCIA, S., FERRÉ, J. (2008) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin-binding and pore-forming activity in brush border membrane vesicles prepared from anterior and posterior midgut of lepidopteran larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 6, p. 1710-1716.
- ROSSI-ZALAF, L. S., ALVES, S. B., LOPES, R. B., SILVEIRA NETO, S., TANZINI, M. R. (2008) Interação de micro-organismos com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: ALVES, S. B. & LOPES, R. B.

- (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. FEALQ Piracicaba, p. 279–302.
- RUSSELL, C. W. & PELZ-STELINSKI, K. S. (2015) Development of an artificial diet and feeding system for juvenile stages of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 154, n. 2, p. 171–176.
- SALES, T.M. (2015) **Dinâmica populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) em pomares cítricos do Estado de São Paulo**. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 142 pp.
- SAMSON, R.A. (1974) *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. **Studies in Mycology**, v. 6, p. 1–119.
- SANAHUJA, G., BANAKAR, R., TWYMAN, R.M., CAPELL, T., CHRISTOU, P. (2011) *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, p. 283–300.
- SANTOS, K. B., NEVES, P., MENEGUIM, A. M., DOS SANTOS, R. B., DOS SANTOS, W. J., BOAS, G. V., DUMAS, V., MARTINS, E., PRAÇA, L. B., QUEIROZ, P., BERRY, C., MONNERAT, R. (2009) Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v. 50, n. 2, p. 157–163.
- SANTOS, M.S., ZANARDI, O.Z., PAULI, K.S., FORIM, M.R., YAMAMOTO, P.T., VENDRAMIM, J.D. (2015) Toxicity of an azadirachtin-based biopesticide on *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) and its ectoparasitoid *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae). **Crop Protection**, v. 74, p. 116–123.
- SAS INSTITUTE (2011) **Statistical analysis system: getting started with the SAS learning**. Version 9.2. Cary, NC: SAS Institute.
- SATTAR, S. & MAITI, M.K. (2011) Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 937–946.
- SCHISLER, D.A., SLININGER, P.J., BEHLE, R.W., JACKSON, M.A. (2004) Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. **Phytopathology**, v. 94, p. 1267–1271.
- SCHNEPF, E. CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D., DEAN, D. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 775–806.
- SELLAMI, S., CHERIF, M., ABDELKEFI-MESRATI, L., TOUNSI, S., & JAMOUCSI, K. (2015) Toxicity, activation process, and histopathological effect of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa16 on *Tuta absoluta*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 4, p. 1992–1999.
- SILVA, E.R.L., ALVES, L.F.A., MARTINELO, L., FROMENTINI, M.A., MARCHESE, L.P.C., PINTO, F.G.S., POTRICH, M., NEVES, P.M.O.J. (2012) Natural phytosanitary products effects on *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Berliner). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n.1, p. 2891–2904.
- SILVA, E.R.L., ALVES, L.F.A., SENE, L., SANTOS, J., BONINI, A.K., POTRICH, M., NEVES, P.M.O.J. (2006) **Técnicas para avaliação do efeito “in vitro” de fungicidas sobre *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*arq**. Instituto Biológico de São Paulo, v.73, n. 4, p.429–437.

- SOBERÓN, M. & BRAVO, A. (2007) Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *In: LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Una ventana al quehacer científico*. Instituto de Biotecnología, UNAM, v. 25, p. 303-313.
- SOBERÓN, M., PARDO-LÓPEZ, L., MUNOZ-GARAY, C., SANCHEZ, J., GOMEZ, I., PORTA, H., BRAVO, A. (2010) Pore formation by cry toxins. *In: Proteins: Membrane binding and pore formation*, Springer New York, v. 677, p. 127-142.
- SOSA-GOMES, D.R. & MOSCARDI, F. (2003) **Importância das interações entre agroquímicos e entomopatógenos em programas de MIP**. *In: Simpósio de controle biológico, São Pedro, SP. Resumos*. p.59
- SUBANDIYAH, S., NIKOH, N., SATO, H., WAGIMAN, F., TSUYUMU, S., FUKATSU, T. (2000) Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera, Psylloidea) in Indonesia. **Mycoscience**, v. 41, p. 509-513.
- TABASHNIK, B.E., BRÉVAULT, T., CARRIÈRE, Y. (2013) Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, v. 31, p. 510–521.
- TANUJA, S.C.B. & PANKAJ, K.M. (2013) Ascending migration of endophytic *Bacillus thuringiensis* and assessment of benefits to different legumes of N.W. Himalayas. **European Journal of Soil Biology**, v. 56, p. 56-64.
- TAO, A., PANG, F., HUANG, S., YU, G., LI, B., WANG, T. (2014) Characterisation of endophytic *Bacillus thuringiensis* strains isolated from wheat plants as biocontrol agents against wheat flag smut. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 8, p. 901-924.
- TEIXEIRA, D.C., AYRES, A.J., KITAJIMA, E.W., TANAKA, F.A.O., DANET, J.L., JAGOUEIX-EVEILLARD, S., SAILLARD, C., BOVÉ, J. (2005) First report of a Huanglongbing-like disease of citrus in São Paulo State, Brazil, and association of a new *Liberibacter* species, ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’, with the disease. **Plant Disease**, v. 89, p.107.
- TEIXEIRA, D.C., WULFF, N.A., MARTINS, E.C., KITAJIMA, E.W., BASSANEZI, R., AYRES, A.J., EVEILLARD, S., SAILLARD, C., BOVÉ, J.M. (2008) A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches“-broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of Sao Paulo, BR. **Phytopathology**, v. 98, p. 977-984.
- THOMAS, W.E. & ELLAR, D.J. (1983) *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Cell Science**, v. 60, n. 1, p. 181-197, 1983.
- TIWARI, S., CLAYSON, P.J., KUHN, E.H., STELINSKI, L.L. (2012) Effects of buprofezin and diflubenzuron on various developmental stages of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Pest Management Science**, v. 68, n. 10, p. 1405-1412.
- TSAI, J.H. & LIU, Y.H. (2000) Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology**, v.93, n.6, p. 1721-1725.
- USDA ERS (2015) **Adoption of genetically engineered crops in the U.S.** Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/data-products/adoption-of-genetically-engineered-crops-in-the-us/recent-trends-in-geadoption.aspx>> Acesso em dezembro de 2015.
- VALADARES-INGLIS, M.C.C., SHILER, W., DE-SOUZA, M.T. (1998) Engenharia Genética de microrganismos agentes de controle biológico. *In: MELO, I.S & AZEVEDO, J.L. (Ed) Controle Biológico*. Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, v. 1, p. 201-230.

- VAN CUYK, S., DESHPANDE, A., HOLLANDER, A., DUVAL, N., TICKNOR, L., LAYSHOCK, J., GALLEGOS-GRAVES, L.V., OMBERG, K.M. (2011) Persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in urban environments following Spraying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 22, p. 7954-7961.
- VAN RIE, J., JANSSENS, S., HÖFTE, H., DEGHEELE, D., VAN MALLAERT, H. (1989) Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. **European Journal of Biochemistry**, v. 186, p. 239-247.
- VAZ, L. A. (2014) **Estirpes de *Bacillus thuringiensis* como promotoras de crescimento vegetal e no controle de pragas em diferentes culturas**. Brasília: Dissertação de (Mestrado) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 93 pp.
- VEIGA, A. C. P. (2014) **Compatibilidade entre produtos químicos e biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner no controle de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)**. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal. 76 pp.
- VETTORI, C.D., PAFFETTI, D., SAXENA, G., STOTZKY, R.G. (2003) Persistence of toxins and cells of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* introduced in sprays to Sardinia soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 35, p. 1635–1642.
- VIDAL-QUIST, J.C., ROGERS, H.J., MAHENTHIRALINGAM, E., BERRY, C. (2013) *Bacillus thuringiensis* colonises plant roots in a phylogeny-dependent manner. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 86, n.3, p. 474-489.
- VILAS-BÔAS, G.T., ALVAREZ, R.C., SANTOS, C.A., VILAS-BOAS, L.A. (2012). Fatores de Virulência de *Bacillus thuringiensis* Berliner: O Que Existe Além das Proteínas Cry? **EntomoBrasilis**, v. 5, n.1, p. 1-10.
- WALTERS, F.S. & ENGLISH, L.H. (1995) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins toward the potato aphid in an artificial diet bioassay. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 77, p. 211–216
- WANG, N. & TRIVEDI, P. (2013) Citrus huanglongbing: A newly relevant disease presents unprecedented challenges. **Phytopathology**, v. 103, p. 652-665.
- XIE, P. H., SU, C., LIN, Z.G. (1988) A preliminary study on an entomogenous fungus (*Verticillium lecanii*) of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hom.: Psyllidae). **Chinese Journal of Biological Control**, v.4, n.2, p. 92.
- YAMAMOTO, P.T., FELIPPE, M.R., GARBIM, L.F., COELHO, J.H.C., XIMENES, N.L., et al. (2006). *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. In: Proc. of the Huanglongbing-Greening Intl. Workshop, Ribeirão Preto, Brazil, p. 96.
- YAMAMOTO, P.T., FELIPPE, M.R., SANCHES, A.L., COELHO, J.H.C., GARBIM, L.F., XIMENES, N.L. (2009) Eficácia de inseticidas para o manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em citros. **BioAssay**, v.4, p. 1-9.
- YANG, Y., HUANG, M., ANDREW, G., BEATTIE, C., XIA, Y., OUYANG, G., XIONG, J. (2006) Distribution, biology, ecology and control of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, a major pest of citrus: A status report for China. **International Journal of Pest Management**. v.52, n. 4, p. 343-352.
- YOUSTEN, A. A. (1984) *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, v. 3, p. 315-343.

- ZHANG, M., GUO, Y., POWELL, C. A., DOUD, M. S., YANG, C., DUAN, Y. (2014) Effective antibiotics against 'Candidatus Liberibacter asiaticus' In: HLB-affected citrus plants identified via the graft-based evaluation. **Plos One**, v. 9, n.11, e111032.
- ZHOU, Y., CHOI, Y. L., SUN, M., YU, Z. (2008) Novel roles of *Bacillus thuringiensis* to control plant diseases. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 80, n.4, p. 563-572.
- ZHOU, Z., WANG, Z., LIU, Y., LIANG, G., SHU, C., SONG, F., ZHOU, X., BRAVO, A., SOBERÓN, M., ZHANG, J. (2016) Identification of ABCC2 as a binding protein of Cry1Ac on brush border membrane vesicles from *Helicoverpa armigera* by an improved pull-down assay, **Microbiology Open**, v. 5, p. 659-669.