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

**Caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* patogênicos à
Diaphorina citri Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)**

Silvia de Oliveira Dorta

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2014**

Silvia de Oliveira Dorta
Bacharel em Ciências Biológicas e Licenciada em Ciências Biológicas

**Caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* patogênicos à *Diaphorina citri*
Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **JULIANA DE FREITAS-ASTÚA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Dorta, Silvia de Oliveira

Caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* patogênicos à *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) / Silvia de Oliveira Dorta. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.
75 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. Entomopatogênica 2. *Huanglongbing* 3. Insetos sugadores 4. Citros 5. Bt
6. Endofítico 7. Toxinas 8. Ninfas 9. Psílideo dos citros I. Título

CDD 632.75
D719c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Ofereço a Deus pelo dom da vida, dedico aos meus pais pelo incentivo e educação, aos meus irmãos José Leandro, Fernando e em especial a Silmara por toda a ajuda e ao Robson pelo carinho, compreensão e por estar ao meu lado todo o tempo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Juliana de Freitas-Astúa pelo carinho, apoio, companheirismo, orientação e por ter confiado a mim este trabalho,

Agradeço aos professores desta Universidade por terem enriquecido o meu conhecimento,

Agradeço à Dra. Rose Monnerat por ter cedido gentilmente os isolados e pela colaboração,

Agradeço ao Dr. João R. S. Lopes pela intensa colaboração e por ter cedido gentilmente seu laboratório para os treinamentos e a todos do Laboratório de Insetos Vetores do Depto. de

Entomologia da USP/ESALQ, principalmente à Juliana Balbinotte, pela paciência, carinho e constante dedicação, e à Maria Cristina Canale Rapussi pela grande amizade e

companheirismo, principalmente nos momentos difíceis,

Agradeço ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira-IAC em Cordeirópolis e ao diretor Dr.

Marcos Antonio Machado por toda a infraestrutura e o apoio cedidos durante o desenvolvimento desta pesquisa, e principalmente ao pessoal do Laboratório de Acarologia,

Dra. Valdenice M. Novelli e Dra. Maria Andréia Nunes, por todo o apoio durante os experimentos,

Dra. Valéria Mafra pelo auxílio na discussão e avaliação dos resultados,

Agradeço ao Dr. Evandro Henrique Schinor e à Dra. Marinéia de Lara Haddad pelo auxílio nas análises estatísticas,

Agradeço à Fabiana e Márcia, minhas grandes amigas, pela força e carinho em todos os momentos,

Agradeço aos meus caros colegas e companheiros de sala Cíntia, Diogo, Laís, Tiago, Inaiara e

Laura pelos momentos de descontração, troca de informação, amizade e principalmente à

Luciane por toda a força durante essa caminhada,

Agradeço ao meu querido Robson, por todo apoio, carinho, compreensão, por ter sido o meu porto seguro, o meu guia nesta caminhada; sem você eu não teria chegado até aqui. Obrigada

por estar ao meu lado todo o tempo,

Enfim agradeço a todos aqueles que de qualquer forma contribuíram para a execução deste

trabalho

Muitíssimo obrigada!

*“Tudo posso naquele que me fortalece”.
Filipenses 4,13*

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 A citricultura brasileira e o <i>Huanglongbing</i> (HLB).....	23
2.2 Medidas de controle do HLB.....	25
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt).....	26
2.3.1 Toxinas produzidas por Bt.....	27
2.3.2 Modo de Ação.....	29
2.3.3 Estrutura das proteínas Cry.....	29
2.3.4 Bt e suas aplicações.....	30
2.3.5 Bt endofítico	32
2.4 Caracterização dos isolados de Bt.....	32
2.5 Bt para o controle de <i>Diaphorina citri</i> em citros.....	33
2.6 Objetivo geral	34
2.6.1 Objetivos específicos.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Obtenção de ninfas de <i>Diaphorina citri</i>	35
3.2 Obtenção e manutenção de plantas	36
3.3 Obtenção e critério de seleção dos isolados de Bt	36
3.4 Manutenção/conservação dos isolados de Bt	36
3.4.1 Preparo do inóculo de Bt	37
3.5 Inoculação de Bt via sistema radicular.....	38
3.6 Bioensaios de Mortalidade	39

3.7 Análise e interpretação dos resultados dos bioensaios de mortalidade	41
3.8 Isolamento de Bt a partir de folhas de citros e ninfas de psilídeos	42
3.9 Síntese e validação dos oligonucleotídeos	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 Preparo do inóculo de Bt.....	45
4.2 Confirmação da capacidade endofítica de Bt em citros e aquisição pelas ninfas.....	48
4.3 Bioensaios de mortalidade.....	52
5 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS	63

RESUMO

Caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* patogênicos à *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria entomopatogênica encontrada em várias partes do mundo e tem a capacidade de produzir cristais durante a fase estacionária do crescimento. Esses cristais são toxinas compostas por proteínas ativas contra uma ampla variedade de fases imaturas de insetos. As toxinas do Bt têm sido usadas como bioinseticidas por décadas no controle de insetos das ordens Coleoptera, Lepidoptera e Diptera, e algumas toxinas já foram selecionadas como efetivas contra ácaros, nematoides e insetos sugadores de floema da ordem Hemiptera, como os afídeos. Recentemente, foi comprovada a patogenicidade de três isolados de Bt a outro inseto dessa ordem, o psílídeo *Diaphorina citri*. Esse psílídeo é vetor das bactérias *Candidatus Liberibacter* spp., agentes causais da principal doença dos citros: o *Huanglongbing* ou HLB. A descoberta da capacidade endofítica de Bt em plantas de diferentes espécies vegetais abriu perspectivas para novos estudos usando o Bt para controle de insetos sugadores, como a *D. citri*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito patogênico de cada toxina Cry ou Cyt presente nestes três isolados através de isolados de Bt recombinantes expressando as toxinas individualmente. Foram montados bioensaios para confirmar a taxa de mortalidade causada por isolados de Bt contra ninfas de *D. citri*. Os bioensaios foram feitos usando cinco plantas de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e dez ninfas de 3º ínstar de *D. citri* por planta, além dos controles (sem Bt). A mortalidade das ninfas foi avaliada diariamente durante cinco dias. Durante a avaliação, as ninfas mortas foram coletadas para o isolamento do Bt além da detecção do gene da toxina por PCR. No final do experimento, as folhas jovens onde as ninfas se alimentavam também foram avaliadas quanto à presença do Bt. Nossos resultados confirmaram que os isolados de Bt previamente identificados como patogênicos a *D. citri* causaram elevada mortalidade (em média 68-93%) em ninfas de 3º ínstar. Dentre os isolados recombinantes testados, um deles apresentou grande destaque, causando a mortalidade de 68-81% das ninfas em 48 horas e 83-93% em 120 horas. Esse isolado possui grande potencial de uso no controle biológico de *D. citri* através da produção de um bioinseticida ou produção de plantas de citros transgênicas.

Palavras-chave: Entomopatogênica; *Huanglongbing*; Insetos sugadores; Citros; Bt; Endofítico; Toxinas; Ninfas; Psílídeo dos citros

ABSTRACT

Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates pathogenic to *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)

Bacillus thuringiensis (Bt) is an entomopathogenic bacterium found in several locations around the world and has the ability to produce crystals during the stationary phase of growth. These crystals are composed of protein toxins that are active against a wide variety of insect larvae. The Bt toxins have been used for decades as biopesticides to control insects of the orders Coleoptera, Lepidoptera, and Diptera. Some toxins have been selected as effective for mites, nematodes and phloem-sucking insects of the order Hemiptera, such as aphids. The pathogenicity of strains of Bt to *Diaphorina citri*, an hemipteran known as Asian citrus psyllid, has been recently demonstrated. This psyllid is the vector of the bacteria *Candidatus Liberibacter* spp., the causal agents of the main disease of citrus: *Huanglongbing* or HLB. The discovery of the ability of Bt strains to endophytically colonize plants of different species has opened new perspectives for studies. The aim of this work was to evaluate the pathogenic effect of each Cry or Cyt toxin present in these three isolates through the use of recombinant Bt isolates expressing each toxin individually. A series of bioassays were done in order to confirm the mortality caused by Bt strains against nymphs of *D. citri*. Bioassays were performed in five seedlings of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (five replicates/bioassay) and using ten *D. citri* 3rd instar nymphs to each assay plant. A suspension containing Bt spores was inoculated via drench in each seedling, and five seedlings were maintained as negative control (without Bt). Mortality was assessed daily for five days. During the bioassays, dead nymphs were collected for further Bt isolation and detection by PCR. At the end of the experiment, young leaves where nymphs feed were also collected to Bt isolation and detection. Our results confirmed that the previously identified Bt isolates pathogenic to *D. citri* cause high mortality to 3rd instar nymphs. Among the ten recombinant isolates tested, one of them stood out, causing 68-81 % and 83-93% mortality after 48 and 120 hours of inoculation, respectively. The isolation of Bt from dead nymphs and young leaves, and PCR performed with specific primers confirmed the presence of the Bt isolates in psyllids and plants, and their involvement in psyllid mortality. This recombinant Bt with the higher mortality rate found in our results has the potential to be used as a bioinsecticide to control *D. citri* and the toxin gene can be used to genetic engineering of citrus.

Keywords: Entomopathogenic; *Huanglongbing*; Sucking insects; Citrus; Bt; Endophytic; Toxins; Nymphs; Asian citrus psyllid

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sintomas de HLB em folhas e frutos. A) Planta infectada com HLB. B) Frutos com columela deformada e albedo espesso.....25
- Figura 2 - Manutenção e conservação dos isolados de *Bacillus thuringiensis*. A) Tiras de papel-filtro embebidas em suspensão de esporos e cristais de Bt secando em fluxo laminar B) Conservação das tiras de papel-filtro com esporos e cristais de Bt em tubos criogênicos.....37
- Figura 3 - Inoculação de Bt em *seedlings* de laranja doce var. Pera.....39
- Figura 4 - A) Criação de *D. citri* em planta murta, B) Ramo de murta cortado utilizado para a transferência das ninfas, C) *Seedlings* de laranja doce var. Pera citros para onde as ninfas de terceiro ínstar de *D. citri* eram transferidas, D) Detalhe das ninfas nas brotações novas de citros.....40
- Figura 5 - Desenho experimental para os bioensaios de mortalidade de *D. citri* com isolados de Bt.....41
- Figura 6 - Microscopia de contraste de fase de *Bacillus thuringiensis* com aumento de 1000 vezes evidenciando as estruturas encontradas; A) Isolado recombinante Cry1Ab, Cr: cristal, B) Isolado recombinante Cry11, Cr: Cristal e E: esporo e C) Isolado S1302, Cv: célula vegetativa.....45
- Figura 7 - Valores de leituras de OD600 cultivado em meio NYSM ao longo do tempo em isolado recombinante de Bt contendo o gene *cry11*.....46
- Figura 8 - Valores de leituras de OD600 em isolados recombinantes de Bt contendo os genes *cry4B*, *cry10*, *cry11* e *cyt1A* às 72 horas de cultivo em meio NYSM.....47
- Figura 9 - Resultado da diluição serial da bactéria que contem o gene *cry11* nas diluições 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} após 76 h de cultivo em meio NYSM.....47
- Figura 10 - Isolamento de Bt a partir de folhas novas de citros e ninfas mortas. A) colônias de Bt isoladas de ninfas mortas que se alimentaram das plantas inoculadas com isolado S1989, Cry1Aa, Cry11, colônias de Bt isoladas de folha (Cry1Aa, Cry2Aa e Cry11), B) colônias de Bt isoladas de ninfas mortas que se alimentaram das plantas inoculadas com Cyt1A, Cry4B, colônias de Bt isoladas de folhas (Cyt1A, Cry4B, Cry10 e # N folha, colônia não correspondente á de Bt isolada de folhas do controle negativo (sem Bt)), C) controle negativo (N folha), colônias de Bt isoladas de folhas (S1450), colônias de Bt características, colônias de Bt isoladas

de ninfas que se alimentaram das plantas inoculadas com isolado S1450.....48

Figura 11- Gel de agarose 1% evidenciando a validação dos oligonucleotídeos que amplificam os genes que codificam as proteínas presentes nos isolados S1302, S1450 e S1989. L: Ladder 100 pb Invitrogen, H₂O: água, C: controle negativo (sem Bt).....50

Figura 12 - Gel de agarose 1% evidenciando a amplificação dos fragmentos correspondentes aos genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cry2Aa*, *cryIB*, *cry4A*, *cry4B* e *cry10* de Bt e confirmando o isolamento da bactéria de folhas e ninfas. L100: Ladder de 100 pb, H₂O: água, C, CN e CP: controle negativo (sem Bt), +N: controle positivo coletado a partir de colônias isoladas de ninfas, +P: controle positivo a partir de colônias isoladas de plantas.....51

Figura 13 - Gel de agarose 1% evidenciando a amplificação dos fragmentos correspondentes aos genes *cryII* e *cytIA* de Bt e confirmando o isolamento da bactéria de folhas e ninfas. L100: Ladder de 100 pb, H₂O: água, C: controle negativo (sem Bt), +N: controle positivo coletado a partir de colônias isoladas de ninfas, +P: controle positivo a partir de colônias isoladas de plantas.....51

Figura 14 - Avaliação da sobrevivência de ninfas de *Diaphorina citri* após inoculação com isolados de Bt. A) Ninfa morta, B) Ninfa viva e morta, C) Ninfa viva.....53

Figura 15 - Ninfas de *Diaphorina citri* se alimentando em diferentes locais em plantas de citros inoculadas com Bt. A) ninfa se alimentando na parte posterior da folha, B) ninfa se alimentando dentro de uma brotação nova, C) ninfas de 4º ínstar se alimentando na haste da planta.....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Divisão dos isolados utilizados em cada bioensaio de translocação de Bt e mortalidade de <i>D. citri</i>	40
Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na validação e caracterização molecular dos isolados de Bt estudados.....	43
Tabela 3 - Número de colônias provenientes do isolamento de Bt a partir de folhas e ninfas.....	49
Tabela 4 - Resultado da análise estatística da avaliação da mortalidade de ninfas de <i>D. citri</i> a Bt por bioensaio durante 120 horas calculadas através da fórmula de Abbott (1925).....	55
Tabela 5 - Resultado da avaliação da mortalidade de ninfas de <i>D. citri</i> a Bt durante 120 horas calculadas através da fórmula de Abbott (1925).....	57

1 INTRODUÇÃO

Huanglongbing (HLB) é uma das mais antigas doenças de citros, sendo conhecida há mais de um século na Ásia e há várias décadas na África (WANG, TRIVEDI 2013). É uma doença devastadora, que ataca todas as variedades comerciais de citros no mundo e se espalha rapidamente. A doença foi relatada no continente Americano pela primeira vez em São Paulo, Brasil, em 2004, e no sul da Flórida em 2005 (GOTTWALD 2010). Desde então, tem se disseminado para novas áreas do continente, com relatos em Louisiana (2008), Carolina do Sul (2009), Georgia (2009), Cuba, Belize, Jamaica, México e outros países da América Central e do Caribe. No ano passado, o HLB foi relatado também no Texas e uma planta infectada foi encontrada na Califórnia (WANG, TRIVEDI 2013). No Brasil, a doença já foi relatada, além de SP, na região do Triângulo mineiro e no Paraná (TEIXEIRA et al., 2010). As perdas ocasionadas pelo HLB têm sido tantas que de acordo com a Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA), somente entre 2011 e 2012, mais de 2.225 propriedades deixaram de plantar citros no Estado de São Paulo (SIRVARIG, 2013). Dados recentes do Fundo de Defesa da Agricultura (FUNDECITRUS) mostraram que de 2004 a 2012, a disseminação da doença aumentou de 3,4% para 64,1% dos talhões de laranjeiras contaminados, enquanto que a incidência de plantas com sintomas saltou de 0,58%, em 2008, para 6,91%, em 2012 (FUNDECITRUS, 2013). Devido a grandes perdas econômicas resultantes desta doença, ela é atualmente considerada uma das mais importantes na citricultura mundial.

O HLB está associado a três espécies de bactérias não cultiváveis que habitam o floema de citros, denominadas *Candidatus Liberibacter*, seguido pela região onde foram inicialmente identificadas: *Candidatus* (Ca) *Liberibacter* (L.) *asiaticus* (CaLas), *Ca. L. americanus* (CaLam) e *Ca. L. africanus* (CaLaf). CaLas é o patógeno predominante, sendo encontrado em todos os continentes, exceto na África (BOVÉ, 2006). CaLaf é restrito ao continente Africano, e CaLam, que foi inicialmente detectada apenas no Brasil (BOVÉ, 2006), foi também relatada uma única vez na China (Lou et al., 2008), embora os dados não tenham sido confirmados. Recentemente, em Abril de 2013 no Texas foi detectada por qPCR uma amostra de um psilídeo positiva para CaLam, confirmada pelo USDA, com 98% de homologia com o CaLam do Brasil (DA GRAÇA, 2013). Os vetores dessas bactérias são os psilídeos *Trioza erytreae*, que transmite CaLaf e CaLas (Del Guercio) (Hemiptera: Triozidae) e *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), transmissor de CaLas e CaLam (TEIXEIRA et al., 2005, BOVÉ, 2006). *D. citri* está presente no Brasil há mais de 60 anos

(HALBERT et al., 2004, GOTTWALD 2010) e é o principal responsável pela transmissão de CaLas e CaLam. Este inseto adquire a bactéria ao se alimentar da seiva de plantas contaminadas, e uma vez adquirida, a bactéria se multiplica no vetor (INOUE et al., 2009) e é transmitida de maneira propagativa para novas plantas (GRAFTON-CARDWELL et al., 2013). Há também transmissão vertical (para a progênie) (PELZ-STELINSKI et al., 2010) e horizontal (de macho para fêmea) de CaLas (MANN et al., 2011). Além da transmissão pelo psílídeo vetor, o agente causal do HLB pode ser transmitido através de borbulhas contaminadas para plantas sadias (LOPES et al., 2009) e, experimentalmente, por *Cuscuta* sp. (HARTUNG et al., 2010).

Atualmente, o HLB não tem cura; portanto, o único meio de controle do avanço da doença inclui uma série de medidas preventivas, que são a erradicação de plantas doentes, eliminando-se assim a fonte de inóculo (medida mandatária estipulada pela Instrução Normativa IN 53), o plantio de mudas sadias (certificadas) produzidas em telados, e o manejo, amplamente apoiado no controle químico, do vetor. O sucesso no controle da doença depende da adoção conjunta de todas essas medidas mencionadas e isto tem acarretado em um custo elevado de produção, principalmente para os pequenos produtores. Parte do custo elevado se deve ao grande número de aplicações de inseticidas, as quais têm sérias implicações para o meio ambiente, podendo atingir organismos não alvo como os inimigos naturais e até levar à seleção de populações de psílídeos resistentes a estes pesticidas, como relatado recentemente na Flórida (TIWARI et al., 2012). Em função disso, vários grupos têm buscado medidas alternativas para o manejo do vetor, como o uso de ferramentas moleculares visando ao silenciamento de genes do inseto através do RNA de interferência (RNAi) (EL-SHESHENY et al., 2013), o uso de inimigos naturais, com destaque para o parasitoide *Tamarixia radiata* (PARRA et al., 2010), ou ainda de entomopatógenos, como fungos (PADULLA, ALVES, 2009, CHOW et al., 2013) ou bactérias (BALBINOTTE, 2011).

Dentre a classe das bactérias entomopatogênicas, se destaca o *Bacillus thuringiensis* (Bt), que durante a fase de esporulação, produz inclusões proteicas cristalinas, denominadas δ -endotoxinas ou cristais parasporais (ARONSON, 1986), que causam toxicidade aos insetos. Por essa razão, o Bt tem grande importância no controle biológico de pragas, tanto como biopesticida quanto na produção de plantas transgênicas. Como bioinseticida, o uso do Bt no controle biológico tem grandes vantagens em relação ao controle químico, uma vez que eles não poluem o ambiente, são de fácil manipulação, inócuas ao homem e aos animais domésticos. No entanto, o maior avanço no uso do Bt na agricultura sem dúvida alguma foi o desenvolvimento de plantas transgênicas expressando toxinas Cry. De acordo com os dados

da ISAAA (2013), os principais países plantadores de transgênicos expressando proteínas Bt no ano de 2012 foram: EUA com 69,5 milhões de hectares, Brasil com 36,6 milhões de hectares, Argentina com 23,9 milhões de hectares, Canadá com 11,8 milhões de hectares e Índia com 10,8 milhões de hectares.

Bactérias Bt possuem ampla distribuição geográfica, podendo ser encontradas em diversos lugares como solo, filoplano, água, insetos mortos, grãos armazenados, rizosfera etc (MULETA et al., 2009). Recentemente, foram encontrados isolados de Bt na forma endofítica em plântulas de algodão e couve (MONNERAT et al., 2003, 2009), em pomares de citros (VIDAL-QUIST et al., 2009) e em frutos de café (MIGUEL et al., 2013). Em estudos de colonização e translocação, a bactéria já foi inoculada em culturas de feijão (MANDUELL et al., 2007), repolho (PRAÇA et al., 2012), legumes (TANUJA et al., 2013) sendo posteriormente recuperada através de isolamentos. Em citros, Balbinotte (2011) inoculou um isolado de Bt marcado com *gfp* e confirmou a capacidade da bactéria colonizar essa espécie vegetal endofiticamente. Em função dessa observação, foram montados uma série de bioensaios usando isolados de Bt para avaliar a mortalidade de ninfas de *D. citri*, sendo que neste estudo, Balbinotte identificou três isolados que apresentaram como promissores para o controle desse inseto sugador.

A partir dos resultados obtidos por Balbinotte (2011), o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito patogênico de cada toxina Cry ou Cyt presente nesses isolados originais usando isolados de Bt recombinantes expressando as toxinas individualmente para confirmar a mortalidade destas toxinas contra as ninfas de *D. citri*

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

O Brasil é o segundo maior produtor de frutas cítricas e o maior produtor de laranja do mundo (FAO, 2013). O país detém 50% da produção mundial de suco de laranja, exporta 98% do que produz e consegue incríveis 85% de participação no mercado mundial. O suco de laranja é a bebida à base de frutas mais tomada no mundo, com 35% de participação entre os sucos (NEVES et al., 2010). São Paulo, Triângulo Mineiro, e o noroeste do Paraná enviam praticamente 80% das suas colheitas para a indústria de suco de laranja. De uma safra de 350 milhões de caixas, de 60 a 80 milhões são vendidas no mercado de fruta *in natura* e 250 a 270 milhões de caixas são processadas pela indústria. Esse volume de laranjas se transforma na indústria em aproximadamente um milhão de toneladas de suco (equivalente 66 graus Brix), o que corresponde à exportação anual do País (INFORMA ECONOMICS-FNP 2013). No entanto, pragas e doenças são responsáveis pela queda ou perda da produção e comercialização de frutos de laranja. Uma das preocupações mais sérias do setor é o *huanglongbing* - HLB (ex-greening), considerada uma das mais severas doenças dos citros, que ocorre na África, Ásia e América, com efeitos prejudiciais ao desenvolvimento da planta e que avança com extrema rapidez (NEVES et al., 2010), afetando economicamente a produção mundial de citros.

Os primeiros relatos sobre o HLB datam de 1919, na China, mas os sintomas já eram conhecidos desde o final do século XIX. Desde aquela época, a enfermidade era conhecida como a doença do ramo amarelo (*huanglongbing*, em chinês) dos citros (BOVÉ, 2006). Nas Américas, os primeiros relatos da doença foram no estado de São Paulo, Brasil, em 2004 (COLETTA FILHO et al., 2004, TEIXEIRA et al., 2005) e nos EUA, na Flórida (SUTTON et al., 2005). O HLB vem se disseminando rapidamente pelo continente Americano, tendo alcançado diversos estados nos Estados Unidos (Louisiana, Carolina do Sul, Geórgia e Texas, além de uma única planta positiva, porém eliminada, na Califórnia), México (Yucatán, Quintana Roo, Nayarit, Jalisco, Campeche e Colima), além de outros países da América do Sul, Central e do Caribe (Cuba, República Dominicana, Belize, Nicarágua, Guatemala, Honduras, Costa Rica, Jamaica, Martinica, Guadalupe (MICHEL DOLLET, CIRAD-Montpellier, comunicação pessoal), Argentina (OUTI et al., 2013) e Paraguai.

A doença é causada por três espécies de bactérias não cultivadas limitadas ao floema, pertencentes ao grupo das α -Proteobactérias (Gram-negativas) denominadas *Candidatus*

Liberibacter africanus (CaLaf), *Ca. L. asiaticus* (CaLas) e *Ca. L. americanus* (CaLam). Esta doença pode ser transmitida através de enxertia de borbolhas infectadas ou experimentalmente por *Cuscuta* sp., que tem sido utilizada com sucesso pra transferir *Ca. Liberibacter* spp. a tomate (*Solanum lycopersicum*), *Catharanthus roseus* e fumo (*Nicotiana tabacum*) (HILF et al., 2013). No entanto, na natureza a transmissão se dá principalmente através dos insetos vetores *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Hemiptera: Triozidae), encontrado no continente Africano, e *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), encontrado na Ásia e nas Américas. Esses psíldeos, ao se alimentarem de plantas contaminadas, adquirem a bactéria, que passa por um período de latência, se multiplica no vetor (INOUE et al., 2009) e é inoculada durante a alimentação em nova planta (GRAFTON-CARDWELL et al., 2013). A maior parte dos estudos sobre a interação patógeno-vetor foi realizada com *D. citri* e CaLas. Sabe-se, atualmente, que o psíldeo transmite a bactéria de maneira propagativa, podendo ocorrer a transmissão vertical para a progênie (PELZ-STELINSKI et al., 2010) e horizontal do macho para a fêmea (MANN et al., 2011). As fêmeas de *D. citri* podem colocar de 500-800 ovos se os brotos estiverem presentes, e a temperatura e umidade influenciam na oviposição e desenvolvimento deste inseto. As ninfas do psíldeo possuem cinco ínstares, sendo que nos primeiros estágios apresentam pouca mobilidade e só se movimentam se perturbadas ou quando há superlotação nos brotos ou ramos nos quais estão se alimentando; ninfas em estágios mais avançados e adultos possuem maior agilidade e movimentação (HALL et al., 2012).

Todas as variedades comerciais de citros são suscetíveis ao HLB; no entanto, há diferenças entre as respostas de diferentes genótipos, sendo alguns claramente mais tolerantes e/ou resistentes à doença (WANG, TRIVEDI 2013, BOSCARIOL-CAMARGO et al., 2010). Os sintomas principais da doença são: mosqueamento de folhas, amarelecimento de ramos, perda da produtividade e depauperação geral das plantas. Os frutos apresentam sintomas bastante característicos, com deformação, columela torta, espessamento do albedo, nervura amarelada e sementes abortadas e outros não característicos da doença, mas decorrentes da mesma como a deficiência nutricional (HALBERT et al., 2004, BOVE, 2006, LOPES et al., 2008). Alguns dos sintomas descritos podem ser visualizados na Figura 1.

Figura 1 – Sintomas de HLB em folhas e frutos. A) Planta infectada com HLB. B) Frutos com columela deformada e albedo espesso. Fotos: Juliana de Freitas-Astúa

2.2 Medidas de controle do HLB

Não há variedade comercial de citros resistente ao HLB e tampouco há ferramentas disponíveis para o controle curativo da doença. Portanto devem-se tomar todas as ações preventivas de controle, que vão desde o plantio de mudas sadias, eliminação de fonte de inóculo do campo e ao manejo regional do vetor, pois este é capaz de migrar para outras áreas e assim aumentar novos focos da doença. De acordo com Yamamoto et al. (2009) os citricultores tem à disposição um grande número de inseticidas de diferentes modo de ação, tanto de contato quanto sistêmicos, que devem ser utilizados para a redução da população de *D. citri*. É evidente, porém, que o uso indiscriminado e contínuo dos mesmos pode levar a efeitos colaterais, como desequilíbrio ecológico, poluição do meio ambiente, surtos de pragas secundárias e seleção de pragas resistentes a eles.

Na tentativa de promover o manejo integrado de pragas e reduzir o uso indiscriminado de inseticidas (que, na citricultura paulista, pode chegar a aplicações semanais para o controle de *D. citri*), vários grupos têm buscado alternativas no controle biológico do vetor com inimigos naturais e fungos. Assim, já é clássico o controle do psíldeo dos citros com o parasitoide *Tamarixia radiata* (PARRA et al., 2010). Aubert et al. (1996) relatam o sucesso do uso desse parasitoide em conjunto com mudas sadias que, nas Ilhas Reunião, reduziram a incidência de HLB de níveis elevadíssimos para menos de 0,5%.

Alguns predadores também são considerados importantes agentes de controle de *D. citri*, como as joaninhas *Harmonia axyridis* (Pallas), *Olla v-nigrum* (Mulsant), *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus) e *Exochomus cildreni* Mulsant (MICHAUD, 2004). 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.

Dentre os fungos entomopatogênicos, destaque pode ser dado a *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Hirsutella thompsonii*, *Lecanicillium muscarum* e *Paecilomyces fumosoroseus*, os quais se mostraram patogênicos a ninfas do psilídeo, com indução de até 80% de mortalidade nos insetos (PADULLA, ALVES, 2009, CHOW et al., 2013). Na Flórida, Hall et al. (2012) relataram que *Hirsutella citriformis* matou a maioria dos adultos de *D. citri* durante os meses do outono e inverno. Outra alternativa de controle do vetor é o silenciamento de genes através do RNAi. El-Shesheny et al. (2013) conseguiram silenciar um gene responsável pela formação de asas em ninfas de 5º ínstar de *D. citri* e pesquisas em andamento sugerem elevada eficiência no controle do inseto utilizando-se essa ferramenta (Fernando Cònsoli, ESALQ/ USP, comunicação pessoal). Por outro lado, pouco tem sido feito na busca de bactérias entomopatogênicas ao psilídeo, enquanto para outras culturas agrícolas o *Bacillus thuringiensis* é amplamente utilizado para essa finalidade.

2.3 *Bacillus thuringiensis* (Bt)

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram positiva, com forma de bastonete, aeróbia podendo crescer facultativamente em anaerobiose dentro da faixa 10 a 40° C (MONNERAT, BRAVO, 2000). Foi descrita pela primeira vez em 1901 no Japão pelo bacteriologista Ishiwata em larvas do bicho-da-seda *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), mas apenas em 1911, na Alemanha, o pesquisador Berliner conseguiu isolar e caracterizar essa bactéria (WHITELEY, SCHNEPF, 1986, DIAS, 1992, MONNERAT, 2003).

Esta espécie se distingue de outras espécies de *Bacillus* através da síntese de inclusões cristalinas que contêm tipicamente proteínas inseticidas conhecidas como δ -endotoxinas ou protoxinas Cry (cristal) e protoxinas Cyt (citolítica), produzidas durante a fase de esporulação (BIDESHI et al., 2013). No intestino de fases imaturas de insetos, essas protoxinas, sob a ação do pH alcalino e de proteases, são ativadas e causam a lise das células epiteliais e consequente morte das larvas ou ninfas. Essas proteínas tem ação tóxica específica a diversas ordens de insetos principalmente a Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (WEISER, 1986, EDWARDS et al., 1988), foi relatada a toxicidade para Hemiptera (FEILTEISON, 1994), e a algumas espécies de protozoários, ácaros e nematoides (EDWARDS et al., 1988, FEILTEISON, 1994).

Um isolado de Bt pode produzir mais de um tipo de cristal, que pode apresentar as formas bipiramidal, cuboide ou chata, e pode ser formado por uma ou mais proteínas Cry. Uma espécie de inseto pode ser afetada por mais de um isolado da bactéria, pois estes frequentemente produzem diferentes proteínas inseticidas (FIÚZA, BERLITZ, 2009). As

proteínas Cry são codificadas por genes *cry* que podem estar localizados no cromossomo, em grandes plasmídeos (40-200 MDa), ou em ambos (GONZÁLES et al., 1982, POLANCZYK; ALVES, 2003).

Por outro lado, existe a possibilidade de manipular geneticamente *B. thuringiensis* para que produzam uma única toxina. Corrêa et al. (2012) obtiveram isolados recombinantes de Bt que não produziam cristais, e os transformaram com plasmídeos contendo individualmente os genes codificadores de *cry4Aa*, *cry11A* e *cyt2Aa*. Desta forma foi possível avaliar a patogenicidade dessas toxinas individualmente transformadas a insetos através dos bioensaios.

2.3.1 Toxinas produzidas por Bt

Diferentes isolados de Bt produzem diferentes proteínas com ação tóxica específica a diversas ordens de insetos, e há relatos do efeito patogênico em mais de 150 espécies de insetos (JISHA et al., 2013). Segundo Hansen e Salameitou (2000), além da produção das proteínas Cry, as mais comuns, o Bt pode produzir outras proteínas com atividade inseticida, descritas a seguir.

α -exotoxina → esta toxina é encontrada no sobrenadante de algumas culturas, durante a fase logarítmica de crescimento de certos isolados de Bt. Atua causando degeneração e lise de hemócitos (KRIEG, 1971, HABIB, ANDRADE, 1998, HANSEN, SALAMITOU, 2000). Considerada uma toxina termolábil, é solúvel em água, altamente tóxica a alguns insetos, mas também tóxica a ratos e outros vertebrados. Também é conhecida como enzima fosfolipase C, lecitinase C ou fosfatidilcolina fosfolipase (FAUST, BULLA JR., 1982).

β -exotoxina ou thuringiensina → é uma toxina termoestável em água, não proteica, altamente tóxica para muitos insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Isoptera e Ortoptera e até para certos vertebrados (HABIB, ANDRADE, 1998). Possui ação mutagênica em sistemas fisiológicos de mamíferos. A β -exotoxina é produzida durante a fase vegetativa de crescimento por algumas subespécies de Bt (PRAÇA et al., 2007) e, devido à sua toxicidade até para humanos, sua presença é proibida em produtos à base de Bt (JISHA et al., 2013).

Vip 3A (*vegetative insecticidal proteins*) → descritas por Estruch et al. (1996), são proteínas produzidas e secretadas por alguns isolados de Bt durante sua fase vegetativa e de esporulação. Além de serem solúveis, não formam cristais e possuem toxicidade de mesma magnitude que as proteínas Cry (VILAS-BÔAS et al., 2012). Essas proteínas são produzidas

em etapas iniciais do processo de crescimento das bactérias em cultura, antecipando, assim, sua obtenção. Essa foi uma descoberta importante, pois, atualmente, não só se aproveita a mistura de esporos e cristais obtidos após o cultivo de Bt, como também é possível utilizar o seu sobrenadante (MONNERAT, BRAVO, 2000).

δ -endotoxinas → também denominadas proteínas Cry e Cyt, apresentam ação extremamente tóxica a insetos (VALADARES-INGLIS et al., 1998). Essas proteínas apresentam individualmente um espectro de ação, normalmente, restrito a uma ordem de inseto em particular (DE MAAGD et al., 2001). O peso molecular das δ -endotoxinas pode variar entre 13,6 e 142 kDa. Produzem cristais que podem ser bipiramidais, cuboides, romboides, ovoides, esféricos ou, ainda, sem forma definida (HABIB, ANDRADE, 1998), formados por uma ou mais toxinas.

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 sequências similares a uma proteína Cyt conhecida (JISHA et al., 2013). 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).

Existem mais de 700 diferentes sequências de genes *cry* descritas em 72 grupos organizados em diferentes subgrupos e as toxinas Cry são classificadas pela sequência primária de aminoácidos (Cry1 a Cry72) (CRICKMORE et al., 2013). Segundo Galvão et al. (2009) essa diversidade e complexidade de toxinas de Bt se devem à transferência gênica dos plasmídeos, que ocorre em alta frequência na natureza e por conjugação em laboratórios, resultando em novas subespécies com diferentes conteúdos plasmidiais.

Informações sobre as sequências dos genes *cry* estão disponíveis no site http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, sendo elas constantemente atualizadas.

Isolados de Bt podem produzir ainda outros tipos de proteínas, como uma nova classe de citotoxinas não hemolíticas, denominadas parasporinas. Curiosamente estas possuem preferência contra células cancerosas, sendo possíveis candidatas ao uso médico como agentes anticancerígenos (MIZUKI et al., 2000, OHBA et al., 2009, VILA-BÔAS et al., 2012, ARGÔLO-FILHO, LOGUERCIO, 2013). Estas parecem manter o padrão similar às proteínas Cry de apresentar um modo de ação espécie-específico (VILA-BÔAS et al., 2012).

2.3.2 Modo de Ação

Existem diferentes modos de ação das toxinas Cry em diferentes ordens de insetos. O modo de ação de δ -endotoxina envolve vários eventos que devem ser concluídos várias horas após a ingestão, a fim de levar à morte do inseto (JISHA et al., 2013). Após a ingestão, os cristais são solubilizados sob a ação do pH alcalino para lepidópteros e dípteros e ácidos para coleópteros (BRAVO et al., 2012), e ativados por proteases intestinais digestivas, tais como as serina-proteases para lepidópteros e dípteros e as proteases aspárticas e cisteína para coleópteros (DE MAAGD et al., 2001). Após a ativação da toxina, ela se liga a receptores específicos do epitélio intestinal, interferindo no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana apical, formando poros e, como consequência, causando o aumento da permeabilidade da membrana e da absorção da água, levando à lise celular e à morte das larvas (POLANCZYK, ALVES 2003)

Em lepidópteros, de acordo com Jisha et al. (2013) e Pardo-López et al. (2012), a ligação da toxina Cry1A ocorre em diferentes locais de ligação, que podem ser em uma proteína semelhante à caderina (CADR), um glicosilfosfatidilinositol (GPI) ancoradas a aminopeptidase-N (APN), uma fosfatase alcalina ancorada a GPI (ALP) ou uma glicoconjugada de 270 kDa.

Já as toxinas Cyt, produzidas por algumas estirpes de Bt, são normalmente efetivas contra dípteros e evidências recentes sugerem que essas proteínas interagem diretamente com a membrana de lipídeos no intestino médio larval e atuam como receptores para as toxinas Cry, de modo que as duas agem em sinergia (SANAHUJA et al., 2011, PARDO-LÓPEZ et al., 2012, PARK et al., 2013, JISHA et al., 2013). Exemplo recente foi publicado por Bideshi et al. (2013) ao demonstrar que Cyt1Aa facilita a ligação de Cry2Aa em todo o intestino das larvas de *Culex quinquefasciatus*.

2.3.3 Estrutura das proteínas Cry

As diferentes sequências de genes produtores de toxinas em Bt foram divididas em pelo menos quatro famílias de proteínas filogeneticamente não relacionadas que podem ter diferentes modos de ação: a família das toxinas do domínio 3d-Cry representa o maior grupo, com mais de 53 diferentes subgrupos de toxinas Cry, a família de toxinas Cry mosquitocida (MTX), a família do tipo binário (BIN) e a família de toxinas Cyt (BRAVO et al., 2011).

Algumas proteínas 3d-Cry foram cristalizadas e suas estruturas tridimensionais foram resolvidas como as: Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa, Cry4Ba e Cry8Ea (BRAVO et al., 2011). Todas as estruturas resolvidas apresentam uma dobra semelhante, composta por três domínios, apesar de algumas destas proteínas partilharem pouca identidade de sequência de aminoácidos (menos do que 20%) (BRAVO et al., 2012). No entanto cinco blocos de sequências conservadas são comuns à maioria das proteínas Cry (FIÚZA, BERLITZ, 2009). O domínio I, N-terminal, consiste em sete α -hélices e está envolvido na inserção da membrana intestinal e na formação do poro. Já o domínio II ou β -prisma, apresenta três folhas dobradas simétricas, formando as folhas-betas, e o domínio III C-terminal consiste em duas folhas- β antiparalelas (DE MAAGD et al., 2001). Estes dois domínios estão envolvidos no reconhecimento dos receptores e ligação, além do domínio III também ter sido associado à formação de poros (DE MAAGD et al., 2001, FIÚZA, BERLITZ, 2009, BRAVO et al, 2011). De fato, os domínios II e III são os domínios determinantes da especificidade de toxinas Cry (BRAVO et al, 2011, BRAVO et al., 2012). “Deste modo a análise filogenética das toxinas Cry mostra que a grande variabilidade na atividade biocida do grupo 3d-Cry resultou da evolução independente dos três domínios estruturais e da troca do domínio III entre diferentes toxinas. Estes dois processos têm gerado proteínas com modos de ação semelhantes, mas com diferentes especificidades (DE MAAGD et al., 2001 citado por PARDO-LÓPEZ et al., 2012)”.

2.3.4 Bt e suas aplicações

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 através de biopesticidas ou da produção de plantas transgênicas.

Aproximadamente 98% dos biopesticidas utilizados na agricultura e na saúde no fim dos anos 1990 correspondiam às formulações de Bt (SCHNEPF et al., 1998). A maior parte dos bioinseticidas comercializados visa o controle de lagartas. Dos 23 produtos comerciais de Bt para controle de pragas agrícolas listados por Fiúza, Berlitz (2009), 17 são para Lepidoptera e apenas seis para Coleoptera. Na lista, não se encontram produtos registrados para outras ordens de insetos.

“A maioria dos biopesticidas baseia-se em preparações de esporos-cristais derivados de isolados do tipo selvagem, tais como *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) HD1, que expressam Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa ou HD73, que produz Cry1Ac; *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD137 que produz diferentes toxinas Cry, tais como Cry1Aa, Cry1B, um Cry1Ca e Cry1Da; *B. thuringiensis* var. *san diego* e *B. thuringiensis* var.

tenebrionis (Btt), que produzem a toxina Cry3Aa e *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) contendo genes que codificam as toxinas Cry4A, Cry4B, Cry11A e Cyt1Aa (BRAVO et al., 2011)”.

As formulações podem ser na forma sólida (em pó ou granulada) ou líquida, e grande parte desses produtos formulados são aplicados na forma de 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 anos a décadas (VAN CUYK et al., 2011).

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPA, 2013), existem diversas vantagens dos biopesticidas sobre os pesticidas convencionais: menor toxicidade, maior especificidade e menor poluição ambiental. No entanto, 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. De acordo com Tabashnik et al. (2013), em 2011 foram plantados 66 milhões de hectares com transgênicos Bt, chegando a 420 milhões de hectares acumulados desde 1996. Os autores comentam ainda que o cultivo de milho Bt representou 67% da área plantada nos EUA em 2012 e de algodão Bt correspondeu de 79 a 95% da área plantada na Austrália, China, Índia e EUA de 2010 a 2012. No entanto, apesar dos benefícios do uso desta prática, um dos problemas é a ocorrência da evolução da resistência. Desta forma, a estratégia de manejo tem sido feita, através da rotação de culturas e a expressão de mais de uma toxina com diferentes mecanismos de ação na mesma planta (BRAVO et al., 2011, PARDO-LÓPEZ et al., 2012, JISHA et al., 2013).

Dois são os motivos principais para o pouco uso de Bt como bioinseticida: o primeiro é a difícil fixação das proteínas nas folhas. Uma vez que Bt é normalmente usado para o controle de larvas de lepidópteros e coleópteros, ele precisa ser ingerido para atuar como inseticida, e a lavagem pela chuva ou irrigação reduz a eficiência. O segundo motivo é devido à sua sensibilidade à luz ultravioleta (UV), podendo causar a sua degradação (SANAHUJA et al., 2011). Já em plantas transgênicas, a grande vantagem é que a proteína Cry é produzida continuamente e permite a proteção contra a radiação solar.

No entanto, com a recém-identificada característica de isolados de Bt colonizarem plantas endofiticamente (MONNERAT et al., 2003), talvez seja possível preparar formulações que possam minimizar os problemas supracitados relacionados aos biopesticidas.

2.3.5 Bt endofítico

Micro-organismos endofíticos são aqueles que vivem no interior das plantas, em harmonia com o hospedeiro. Estes não causam danos à planta, mas contribuem na defesa contra fitopatógenos, produção de metabólitos secundários e podem promover o desenvolvimento vegetal por meio da produção ou indução da síntese de substâncias reguladoras do crescimento (POLLI et al., 2012).

Bt é uma bactéria de ocorrência ubíqua (KRYWUNCZYK, FAST, 1980), sendo encontrada em todas as partes do mundo, seus esporos podem ser isolados de diversos ambientes como o solo, rizosfera, filoplano, água fresca, grãos, insetos e crustáceos, anelídeos e mamíferos insetívoros (RAYMOND et al., 2010). Embora muito se saiba sobre a patologia de Bt contra invertebrados, a compreensão atual de sua ecologia 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. Em 2008, Suzuki et al. (2008) isolaram a bactéria endofiticamente da cana de açúcar, no ano seguinte, Vidal-Quist et al. (2009) isolaram Bt do solo, fitoplano e artrópodes em três pomares espanhóis de citros e, recentemente, Miguel et al. (2013) isolaram a bactéria de frutos de cafeeiro. 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. Monnerat et al. (2009) inocularam um isolado de Bt marcada com o gene *gfp* e comprovaram que plantas de algodão são capazes de absorver a bactéria aplicada no solo, protegendo-as contra insetos que se alimentam do floema por várias semanas. Melatti et al. (2010) descobriram que alguns isolados de Bt causam mortalidade no pulgão do algodoeiro *Aphis gossypii* Glover quando inoculadas em folhas cortadas de algodoeiro. Relatos similares de Bt endofítico foram feitos para plantas de feijão (MANDUELL et al., 2007), repolho (PRAÇA et al., 2012), leguminosas (TANUJA et al., 2013). De acordo com Jurat-Fuentes, Jacksony (2013), em revisão sobre o assunto, estes resultados abrem novos caminhos para o controle microbiano enfocando insetos sugadores.

2.4 Caracterização dos isolados de Bt

Bt é uma bactéria encontrada em diversos lugares do mundo e desperta grande interesse devido à sua ação patogênica a diversas ordens de insetos. Em virtude disto, buscas

por novas toxinas são constantes, visando a aumentar o espectro de ação a outras pragas agrícolas.

De acordo com Sosa-Gómez et al. (1998) a identificação e classificação de isolados geralmente seguem a seguinte cronologia: 1) isolamento a partir do habitat em meio de cultura, 2) observação morfológica da colônia, 3) observação da esporulação e formação de esporos e cristais através da microscopia de contraste de fase, 4) gel de acrilamida –SDS, e 5) bioensaios, sendo eles divididos em duas partes: bioensaio seletivo, onde todos os isolados que causaram a mortalidade acima de 50% são selecionados, e bioensaio de dose CL₅₀, 6) PCR e 7) sequenciamento do DNA no caso de novos genes *cry*.

A técnica da PCR tem sido muito utilizada para a caracterização dos genes em isolados de Bt em coleções, pois é rápida e precisa (PRAÇA et al 2011). Através de iniciadores específicos ou universais como os descritos por Cerón et al. (1994,1995), Bravo et al. (1998) e Ibarra et al. (2003), é possível fazer a identificação desses novos genes.

2.5 Bt para o controle de *Diaphorina citri* em citros

Em extensiva busca pela literatura, não encontramos nenhum manuscrito disponível sobre o uso de Bt para o controle do psíldeo dos citros. Foram encontrados, no entanto, alguns trabalhos sobre o uso de Bt para o controle de praga da cultura, a maior parte deles sem resultados satisfatórios. Vidal-Quist et al. (2009) isolaram e usaram Bt na tentativa de controlar adultos de *Ceratitis capitata*, obtendo, no máximo, 30% de mortalidade. Zahn; Morse (2013) testaram, sem sucesso, Bt para o controle do trips dos citros *Scirtothrips citri*. O único estudo que apresentou resultados favoráveis ao uso do Bt na cultura não envolveu o controle de insetos, mas de um fungo, *Guignardia citricarpa*, causadora da mancha preta dos citros. Lucon et al. (2010) observaram redução drástica, de 85 a 96%, no número de picnídios e lesões em frutos de laranja Valência pulverizados com Bt.

Apesar destes relatos em citros, na verdade, o trabalho pioneiro visando ao manejo de *Diaphorina citri* foi realizado por Balbinotte (2011), que desenvolveu bioensaios com o citros e seu psíldeo, verificando que a bactéria recombinante Btk, marcada com *gfp*, foi capaz de movimentar-se pela planta e ser recuperada pelo reisolamento de folhas e insetos que se alimentavam delas. Após o screening com 21 isolados de Bt, todos provenientes do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa/CENARGEN, coordenado pela Dra. Rose Monnerat, três foram considerados promissores, pois causaram mortalidade de 50 a 75% das ninfas de 3º ínstar do psíldeo (BALBINOTTE, 2011). Todos os bioensaios foram

realizados em *seedlings* de *Citrus sinensis* var. Pera (laranja doce Pera), com cerca de 20 cm e cultivadas em tubetes. Diante desses resultados prévios obtidos pela autora, os seguintes objetivos foram propostos neste trabalho:

2.6 Objetivo geral

Caracterizar os isolados de Bt inicialmente identificados como patogênicos à *Diaphorina citri*, avaliando o efeito patogênico individual de cada toxina Cry ou Cyt presentes naqueles isolados.

2.6.1 Objetivos específicos

- a) Confirmar a característica endofítica de isolados de Bt em plântulas de citros e na ninfa;
- b) Confirmar a capacidade patogênica dos três isolados de Bt anteriormente selecionados como promissores para o controle de ninfas de *D. citri*;
- c) Avaliar o efeito de cada toxina presente nos três isolados, usando isolados de Bt recombinantes transformados com genes *cry* ou *cyt* únicos;
- d) Identificar, através desses bioensaios, quais são os isolados recombinantes e as toxinas mais promissoras para o controle biológico e uso na transgenia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Biotecnologia e Acarologia do Centro APTA Citros Sylvio Moreira, do Instituto Agronômico de Campinas, em Cordeirópolis/SP. O treinamento para o manuseio de *D. citri* e bioensaios envolvendo Bt foi realizado no Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos do Departamento de Entomologia e Acarologia (LEA) da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba/SP, sob a supervisão do Dr. João Roberto S. Lopes e da MS. Juliana Balbinotte. Todos os isolados de Bt, incluindo os isolados transformados com genes individuais de cada toxina testada, foram obtidos com a Dra. Rose Monnerat, do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa/CENARGEN.

3.1 Obtenção de ninfas de *Diaphorina citri*

As ninfas de terceiro ínstar de *D. citri* utilizadas nos experimentos foram obtidas a partir da criação do Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos do Departamento de Entomologia e Acarologia (LEA) da Escola Superior de Agricultura Luiz de (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba/SP. A metodologia foi a mesma descrita por Balbinotte (2011). A criação de *D. citri* foi feita em gaiolas com revestimento de tela antiafídica e porta de acrílico transparente (35 x 35 x 50 cm) (OLIVEIRA, LOPES 2004), contendo três mudas de murta [*Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae)] de 30 cm de altura com brotações novas, produzidas em sacos plásticos de 2,5 L em viveiros da região. Foi utilizada a murta por ser considerada a planta hospedeira mais adequada para a criação deste inseto (NAVA et al., 2007). As gaiolas foram mantidas em uma sala climatizada ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; $70 \pm 10\%$ de umidade relativa (UR)), sob estantes com lâmpadas fluorescentes (40 W por gaiola) e fotofase de 14 h. Foram usados 180 adultos por gaiola para a oviposição, considerando-se uma proporção de machos e fêmeas de 1:1 (NAVA et al., 2007), com idade de uma a três semanas após a emergência. Após um período de sete dias de oviposição, os adultos foram retirados e a eclosão e desenvolvimento das ninfas foram acompanhadas (primeiro ao quinto ínstar) até a emergência dos adultos. Em todos os experimentos montados foram utilizadas ninfas de 3º ínstar.

3.2 Obtenção e manutenção de plantas

Seedlings de laranja doce var. Pera [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] com idade de aproximadamente 6 a 8 meses e tamanho entre 10-20 centímetros, foram produzidas a partir de sementes em tubetes de 100 mL com o substrato fino Multiplant Citrus - Terra do Paraíso em sistema de viveiro protegido com tela antiafídica na estufa de Produção de Mudanças Porta-enxertos do Centro APTA Citros Sylvio Moreira (IAC) em Cordeirópolis/SP. Estas foram usadas em todos os bioensaios de mortalidade com adição do fertilizante osmocote para o favorecimento das brotações.

3.3 Obtenção e critério de seleção dos isolados de Bt

Os isolados de Bt utilizados neste trabalho foram selecionados a partir de ensaios prévios realizados por Balbinotte (2011). Tanto os isolados originais quanto os recombinantes, foram gentilmente cedida pela Dra. Rose Monnerat, do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa/CENARGEN, curadora de uma coleção de amostras de Bt isoladas de diversos habitats e regiões do Brasil de acordo com a metodologia descrita no Protocolo da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION), conforme descrito em MONNERAT et al. (2001).

Dos 21 isolados testados por Balbinotte (2011), três se destacaram e foram novamente avaliados neste trabalho. Esses três isolados, já caracterizados pelo grupo da Dra. Monnerat, produzem várias toxinas, sendo que o isolado S1302 produz as toxinas Cry1Ab e Cry3A, o isolado S1450 produz as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry2Aa e Cry2Ab e o isolado S1989, as toxinas Cry4A, Cry4B, Cry10, Cry11, Cyt1A e Cyt1B. Assim, foram obtidas com a Dra. Monnerat 10 isolados recombinantes cada qual transformado com um dos genes das toxinas descritos acima, exceto para as toxinas Cry1B, Cry2Ab e Cry3A.

3.4 Manutenção/conservação dos isolados de Bt

Cada isolado foi multiplicado de acordo com o protocolo de conservação de microrganismos estabelecido no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa/CENARGEN. Tiras de papel-filtro de 1,5 x 0,5 cm contendo esporos de Bt de cada

isolado testado foram colocados em frascos Erlenmeyer de vidro de 125 mL com 30 mL de meio de cultura seletivo NYSM (caldo nutriente, extrato de levedura e solução de sais minerais) (YOUSTEN, 1984). Para os isolados recombinantes transformados com as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry4A, Cry4B, Cry11 e Cyt1A o meio foi acrescido de 15 mg/mL de eritromicina, enquanto os isolados contendo as toxinas Cry1B e Cry10 o antibiótico adicionado ao meio foi cloranfenicol (15 mg/mL).

O meio de cultura NYSM com seus respectivos isolados transformados com as toxinas foram cultivados a 28°C em incubador rotativo a 200 rpm por 72 h (tempo necessário para esporulação máxima). O crescimento foi acompanhado em microscópio Leica DM750 P com câmera ICC50 que permite capturar e fotografar as imagens em contraste de fase em aumento de 1000 vezes. Após 72 h, foi tirada uma alíquota da cultura e verificada a presença de esporos e cristais. Após a confirmação das estruturas da bactéria por microscopia, aproximadamente 40 tiras de papel-filtro do mesmo tamanho e autoclavadas foram imersas nesta suspensão por 10 min. As tiras, embebidas na suspensão bacteriana, foram retiradas e secas em temperatura ambiente no interior da câmara de fluxo laminar por 3 a 5 horas. Em seguida, foram armazenadas em tubos criogênicos autoclavados e mantidos a temperatura ambiente até o momento dos ensaios (Figura 2). Este tipo de armazenamento apresenta, como vantagens, o fato de ser barato e prático além de poder ser mantido a temperatura ambiente por mais de 15 anos (PRAÇA et al., 2011).

Figura 2 – Manutenção e conservação dos isolados de *Bacillus thuringiensis*. A) Tiras de papel-filtro embebidas em suspensão de esporos e cristais de Bt secando em fluxo laminar B) Conservação das tiras de papel-filtro com esporos e cristais de Bt em tubos criogênicos

3.4.1 Preparo do inóculo de Bt

Antes da montagem dos bioensaios foi realizada a caracterização morfológica de cada isolado. Isto se deve à importância do acompanhamento das fases de desenvolvimento da bactéria e à confirmação de suas estruturas como esporos e cristais, fundamentais para a

patogenicidade aos insetos. Conforme a descrição do item 3.4, cada isolado foi multiplicado, sob temperatura e agitação já estabelecidas. Após as 72 horas de cultivo foi retirada uma alíquota da cultura e verificada a presença de esporos e cristais.

Monnerat et al. (2009), Melatti et al. (2010), Praça et al (2013), Pereira et al. (2013) e Balbinotte (2011) incubaram os isolados de Bt durante cerca de 72h, tempo a partir do qual é encontrado número suficiente de esporos e cristais para serem usados no bioensaio.

Para confirmar essa observação, foi utilizado o isolado de maior interesse deste trabalho, aquele contendo o gene *cry11*, o qual foi cultivado durante 76h. O cultivo foi acompanhado através da leitura da OD da bactéria em espectrofotômetro Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda Bio (aos 600nm de absorbância) nos tempos: 24, 48, 72, 76 horas. A presença de cristais/esporos pôde ser visualizada a partir de 72h de cultivo, porém fizemos a leitura da OD até 76h para verificar se a concentração bacteriana aumentaria após as 72 horas iniciais. Após 76 h de cultivo, foi feita a diluição seriada, tendo sido tomado 1 mL do inóculo e 9 mL de solução salina (0,85% NaCl). Deste modo, seis diluições sucessivas (10^{-1} a 10^{-6}) do isolado transformado com Cry11 foram realizadas, sempre trocando a ponteira da pipeta e agitando a suspensão em vórtex. Em seguida, 100 μ L de cada uma das diluições 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram plaqueadas em três placas de Petri contendo meio sólido NYSM por espalhamento e incubadas a 28°C por 16-24 horas. As unidades formadoras de colônias (UFC) observadas foram avaliadas e contadas e foi feita a média das três repetições para cada diluição.

3.5 Inoculação de Bt via sistema radicular

Os três isolados originais e os 10 isolados recombinantes (mencionadas no item 3.3) foram usados para os testes de translocação em plântulas de citros. Foram montados e avaliados o total de oito bioensaios, sendo que os isolados foram divididos em grupos de quatro a cinco por bioensaios independentes (Tabela 1).

O preparo da suspensão bacteriana foi conduzido conforme a descrição dos itens 3.4 e 3.4.1. Um dia antes da inoculação da suspensão bacteriana em plantas de citros, as mesmas foram regadas no início da manhã e não mais, até o momento da inoculação. Este procedimento foi feito para evitar o excesso do escoamento do inóculo bacteriano por ocasião da montagem do bioensaio. Em seguida, a cultura foi diluída em água mineral autoclavada (2,5:10 mL) e 0:10 mL (controle negativo sem Bt) e inoculada via sistema radicular com o auxílio de uma pipeta com ponteira (5 mL) próximo às hastes dos *seedlings* (tubetes) (Figura

3). As plantas foram mantidas em temperatura controlada (BOD) a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70\% \pm 10$ UR e fotofase de 14 h. A confirmação da translocação da bactéria foi comprovada no término do experimento de mortalidade das ninfas, através do isolamento de folhas jovens das plantas inoculadas com a bactéria e a PCR.

Figura 3 - Inoculação de Bt em *seedlings* de laranja doce var. Pera

3.6 Bioensaios de Mortalidade

Os ensaios de mortalidade foram montados com os três isolados de Bt patogênicos à *D. citri* selecionados por Balbinotte (2011) e os dez isolados recombinantes. Também foram montados oito bioensaios com os isolados de Bt conforme mencionado no bioensaio de translocação. Em cada um deles foram testados de quatro a cinco isolados de Bt mais o controle negativo (sem Bt), sendo que cada um dos isolados foi testado pelo menos duas vezes (Tabela 1).

Tabela 1 - Divisão dos isolados utilizados em cada bioensaio de translocação de Bt e mortalidade de *D. citri*

Bioensaios	Isolados originais e recombinantes com os genes <i>cry</i> e <i>cyt</i>
1	genes <i>cryIAa</i> , <i>cryIAb</i> , <i>cryIAc</i> , <i>cry2Aa</i> e controle negativo
2	genes <i>cryIB</i> , <i>cry4A</i> , <i>cry4B</i> , <i>cry10</i> e controle negativo
3	S1302, S1450, genes <i>cry11</i> , <i>cyt1A</i> e controle negativo
4	S1302, S1450, S1989, genes <i>cry10</i> , <i>cry11</i> e controle negativo
5	genes <i>cryIAa</i> , <i>cryIAc</i> , <i>cry2Aa</i> , <i>cry4B</i> e controle negativo
6	genes <i>cryIAa</i> , <i>cryIAb</i> , <i>cry2Aa</i> , <i>cry4A</i> e controle negativo
7	S1989, genes <i>cryIB</i> , <i>cry4B</i> , <i>cry10</i> , <i>cyt1A</i> e controle negativo
8	genes <i>cry4B</i> , <i>cry10</i> , <i>cry11</i> , <i>cyt1A</i> e controle negativo

1 a 8: número de bioensaios realizados para os isolados originais, transformados e controle negativo

Os testes de mortalidade foram feitos em cinco plantas de citros para as quais haviam sido transferidas dez ninfas de terceiro ínstar de *D. citri* por planta para as brotações novas (Figura 4 C). A transferência se deu a partir de ramos de murta, planta ornamental utilizada para a criação do psíldeo. Os ramos foram cortados com o auxílio de uma tesoura e colocados em uma placa de Petri para a visualização em microscópio estereoscópico. Em seguida, com o auxílio de um pincel bem fino, macio e molhado, extremo cuidado era tomado durante a transferência dessas ninfas para as brotações novas de citros, sempre tocando-as na parte posterior para não quebrar seu estilete. Em cada bioensaio, cinco plantas contendo as dez ninfas foram mantidas como controle negativo (sem a suspensão de Bt).

Figura 4 – A) Criação de *D. citri* em planta de murta, B) Ramo de murta cortado utilizado para a transferência das ninfas, C) *Seedlings* de laranja doce var. Pera para onde as ninfas de terceiro ínstar de *D. citri* eram transferidas, D) Detalhe das ninfas nas brotações novas de citros

Após a transferência das ninfas, a suspensão bacteriana foi inoculada nas hastes das plantas de acordo com o item 3.5 e figura 3. As plantas foram mantidas até o final do experimento em uma câmara (BOD) com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $70\% \pm 10$ UR e fotofase de 14 h. A mortalidade das ninfas foi avaliada diariamente, através da observação visual com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Tecnival), tanto nas plantas tratadas com Bt

quanto nas controle, durante os cinco dias do experimento. As ninfas mortas de todos os tratamentos foram retiradas e armazenadas em tubos (1,5 mL) em temperatura entre 4 a 10°C para posterior detecção da bactéria por isolamento/ plaqueamento e PCR, descritos nos itens 3.8 e 3.9, respectivamente. A figura 5 representa o esquema utilizado em todos os bioensaios de mortalidade.

Figura 5 – Desenho experimental para os bioensaios de mortalidade de *D. citri* com estirpes de Bt

3.7 Análise e interpretação dos resultados dos bioensaios de mortalidade

A correção da mortalidade observada em ninfas de *D. citri* por isolados originais e recombinantes de Bt foi realizada através da equação abaixo proposta por Abbott (1925):

$$EC \% = \frac{(1 - n \text{ em T após a aplicação})}{n \text{ em C após a aplicação}} \times 100$$

Onde EC= eficiência de controle; n = número de insetos vivos; C = controle e T = tratamento.

O delineando experimental foi inteiramente casualizado, com esquema fatorial no tempo. Os dados foram analisados através do programa SAS 9.3 e foram transformados através do ARC SEN ($\sqrt{\% \text{ mortalidade}/100}$). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey/Kramer. Não foi possível fazer a análise conjunta, pois a relação entre os quadrados médios dos resíduos ultrapassou o valor permitido de quatro, então foi feito a análise estatística por bioensaio.

3.8 Isolamento de Bt a partir de folhas de citros e ninfas de psilídeos

Para todas as plantas inoculadas com Bt mais o controle negativo (sem Bt) foi feito o isolamento primário a partir das folhas mais jovens para verificar a absorção e movimentação sistêmica da bactéria na planta. As coletas das folhas jovens de todas as plantas foram feitas sempre no último dia da avaliação (120 horas) de cada experimento. No entanto foram utilizadas cinco plantas/tratamento em todos os experimentos e destas foram utilizadas somente três repetições de cada tratamento no isolamento de folhas. A desinfestação superficial de cada folha foi realizada por banhos de dois minutos em soluções de hipoclorito de sódio 2,5%, etanol 70% e água Milli-Q (2x). Em seguida, as folhas foram maceradas em almofariz contendo 1 mL de solução salina (8,5 g/L NaCl). Também foi feito o isolamento da bactéria a partir de *pool* de ninfas encontradas mortas que se alimentaram das brotações das plantas inoculadas e não inoculadas com a bactéria. A coleta das ninfas mortas foi feita diariamente, durante as avaliações, com o auxílio de um pincel macio. As ninfas eram transferidas para tubos de polietileno de 1,5 mL contendo 200 µL de água Milli-Q autoclavada e maceradas com o auxílio de um pistilo de plástico. O número de ninfas variou entre duas a oito em cada tubo. As amostras maceradas foram incubadas por 12 min a 80°C em banho seco e cinco min em gelo. Este processo mata as células vegetativas de todas as bactérias, deixando vivos apenas os esporos (PRAÇA et al., 2011). Tanto os macerados de folhas quanto os de ninfas eram plaqueados em placas de Petri contendo 100 µL de meio NYSM + antibiótico (15mg/mL – eritromicina ou cloranfenicol, em função da estirpe transformada). As placas eram incubadas por 16 a 24 h a 28°C para crescimento das colônias. As UFC obtidas foram visualizadas no aparelho MVX10 ® Stereomicroscope (Olympus) e fotografadas. Alíquotas das colônias típicas eram tomadas, diluídas em água e usadas para a confirmação da identidade da bactéria por PCR.

O procedimento de isolamento de Bt a partir de folhas e ninfas mortas foi feito para todos os bioensaios montados. Todo o material utilizado nos bioensaios com Bt, inclusive as placas de Petri com meio de cultura, lâminas, lamínulas e plantas inoculadas, foram autoclavados antes de serem descartados. O meio de cultura contendo Bt era deixado pelo menos por 24h em uma solução de hipoclorito de sódio 5%, autoclavado e descartado. Toda a vidraria utilizada, após o tratamento acima descrito, era lavada com água, detergente neutro e água destilada para descontaminação. Antes e depois do uso da câmara de fluxo laminar na montagem dos bioensaios, a luz ultravioleta era ligada por 20-30 min para a limpeza superficial do material e equipamentos.

3.9 Síntese e validação dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos específicos utilizados neste trabalho para a confirmação da identidade da bactéria de cada isolado original e recombinante contendo os diversos genes *cry* e *cyt* foram desenhados a partir de Cerón et al. (1993 e 1995), Bravo et al. (1998), Ibarra et al. (2003) e Mendoza et al. (2012) (Tabela 2). Estes oligonucleotídeos foram utilizados em diversos trabalhos para a confirmação de Bt provenientes de isolamentos de vários habitats e hospedeiros.

Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na validação e caracterização molecular dos isolados de Bt estudados

Nome da Sequência	*Sequência 5' - 3'	Tamanho do fragmento esperado	Fonte
cry1 esp. (Cry1Aa)	TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA	246 pb	Cerón et al., 1993
cry1 esp.(Cry1Ab)	AACAACCTATCTGTTCTTGAC CTCTTATTATACTTACACTAC	216 pb	Cerón et al., 1993
cry1 esp. (Cry1Ac)	GTTAGATTAAATAGTAGTGG TGTAGGTGGTACTGTTATTG	180 pb	Cerón et al., 1993
spe-cry2Aa	CAAGCGAATATAAGGGAGT TAGCGCCAGAAGATACCA	470 pb	Mendoza et al., 2012
cry1 esp. (Cry1B)	CTTCATCACGATGGAGTAA CATAATTTGGTCGTTCTGTT	367/369 pb	Cerón et al., 1993
cry4Aspe	TCAAAGATCATTTCAAAATTACATG CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT	459 pb	Ibarra et al., 2003
cry4Bspe	CGTTTCAAGACCTAATAATATAATACC CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT	321 pb	Ibarra et al., 2003
cry10spe	TCAATGCTCCATCCAATG CTTGTATAGGCCTTCCTCCG	348 pb	Ibarra et al., 2003
gral-cry11	TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC CATTTGTACTTGAAGTTGTAATCCC	305 pb	Bravo et al., 1998
Gral-cyt	AACCCCTCAATCAACAGCAAGG GGTACACAATACATAACGCCACC	Cyt1Aa 522/Cyt1Ab 525pb	Bravo et al., 1998
CJIIIcte 22 (Cry3A)	CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC	285 pb	Cerón et al., 1995
CJIIIA23 (Cry3A)	CCCCGTCTAACTGAGTGT		
spe-cry2Ab	CACCTGGTGGAGCACGAG GTCTACGATGAATGTCCC	771 pb	Mendoza et al., 2012
cyt1gral (Cyt1B)	CCTCAATCAACAGCAAGGGTTATT TGCAAACAGGACATTGTATGTGTAATT	cyt1Aa 477/ cyt1Ab480/ cyt1Ba 477 pb	Ibarra et al., 2003

* 1ª linha de cada primer: iniciador direto ou *forward*; 2ª linha: iniciador reverso

Os oligonucleotídeos foram validados usando como molde DNA dos isolados originais, que continham todos os genes testados. Em seguida foi feita a caracterização

molecular de Bt a partir de colônias provenientes do isolamento da bactéria de folhas de citros e ninfas de psilídeos encontradas mortas. Com o auxílio de uma ponteira, uma camada da colônia foi raspada e diluída em 100 µL de água Milli-Q autoclavada. Em seguida, foi dado o choque térmico a 95 - 100° C durante cinco minutos e a suspensão bacteriana foi colocada em gelo. Uma alíquota de 3 µL foi usada como molde para a PCR. As amostras foram amplificadas em aparelho Veriti Cyclor ® 96-Well Thermal da Applied Biosystems® com 6,25 µL do Kit DreamTaq PCR Master Mix (2X) da Thermo Scientific e 0,3 µL de cada oligonucleotídeo (concentração de 0,2 µM) específico para cada gene testado e água para um volume final de 13,5 µL.

As condições da ciclagem para todos os isolados foram as mesmas descritas por Céron et al. (1995) e Bravo et al. (1998) (Tabela 2), porém com algumas modificações, descritas a seguir. Para a amplificação dos genes codificadores de todas as proteínas Cry e Cyt foi feita uma alteração na ciclagem, com a adição de um passo de desnaturação inicial por 3 min a 95°C, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento de 48°C para a proteína Cry1Aa e 51°C para todas as demais, por 40 s, e extensão a 72°C por 50 s. Uma extensão final de 5 min a 72°C foi adicionada. Os produtos de PCR amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídeo (0,5 ng/µL) e visualizados em luz ultravioleta em aparelho fotodocumentador ImageQuant 300 Imager da GE Healthcare.

A avaliação molecular dos isolados consistiu na visualização de presença ou ausência da banda com o tamanho esperado para cada combinação de oligonucleotídeo e cada gene amplificado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparo do inóculo de Bt

Através da microscopia de contraste de fase com aumento de 1000 vezes, foi possível a visualização de grande quantidade de esporos e cristais de Bt em todos os isolados testados 72 horas após o início do cultivo (Figura 6).

A presença destas estruturas é fundamental, pois são as responsáveis pelo efeito entomopatogênico da bactéria. Os cristais são essenciais para a ligação a receptores específicos na membrana do mesêntero do inseto e posterior formação de poros, lise e morte celular (MONNERAT, BRAVO, 2000). Por sua vez, os esporos também contribuem para a patogenicidade (JOHNSON et al., 1998, De MAAGD et al., 2001), pois frequentemente há sinergia entre os esporos e as proteínas formadoras de cristais (KING et al., 2012). Além disso, o esporo é uma estrutura de resistência que protege a bactéria contra os diversos fatores ambientais como a dessecação. No entanto, esporos e cristais são sensíveis à radiação UV (GRIEGO, SPENCE, 1978, RAYMOND et al., 2010, ARGÔLO-FILHO, LOGUERCIO, 2013); porém, quando inoculados via substrato/raiz em plantas, são protegidos contra estes fatores. Portanto, grandes quantidades de esporos e cristais com elevada atividade inseticida são necessários para as aplicações práticas (JISHA et al., 2013).

Figura 6 - Microscopia de contraste de fase de *Bacillus thuringiensis* com aumento de 1000 vezes evidenciando as estruturas encontradas; A) Isolado recombinante Cry1Ab, Cr: cristal, B) Isolado recombinante Cry1I, Cr: Cristal e E: esporo e C) Isolado S1302, Cv: célula vegetativa.

Os bioensaios foram montados sempre após a análise ao microscópio de contraste de fases e confirmação da presença de esporos e cristais. Ocasionalmente, eram observadas raras células vegetativas (Figura 6 C).

As leituras de densidade óptica dos isolados de Bt em absorvância de 600 nm (OD600) foram avaliadas visando à sua quantificação antes da inoculação nas plantas-teste. Para o

isolado transformado com o gene *cryII* foi feita a leitura a cada 24 horas até 72 horas de cultivo, com uma leitura adicional às 76 horas. Já em torno de 72 horas, conforme esperado, foi confirmado que a bactéria havia alcançado o platô, momento em que ocorre a produção dos cristais e esporos desejados (figura 7). O resultado de OD600nm foi de 1.67, 2.1, 2.61 e 2.52 em 24h, 48h, 72h e 76 horas de cultivo bacteriano, respectivamente, apresentando uma curva crescente (Figura 7). Já Poopathi et al. (2013), utilizando o isolado *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), que contém o gene *cryII* e outros, obtiveram OD600nm 0.70, 0.850 e 1.0 às 24h, 48h e 72 horas de cultivo em meio NYSM respectivamente, e valores de OD ainda mais elevados em meio de cultura alternativo, quando suplementado o bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 7 - Valores de leituras de OD600 cultivado em meio NYSM ao longo do tempo em isolado recombinante de Bt contendo o gene *cryII*

O isolado contendo *cryII*, assim como os demais testados nesse trabalho (contendo, individualmente, os genes *cr4B*, *cry10* e *cytIA*) apresentaram OD600nm às 72h de cultivo entre 1.181 e 1.271 (Figura 8). Embora tenha ocorrido uma variação no resultado da OD600 do isolado recombinante contendo *cryII* à 72 horas (figura 8) em relação ao da curva de crescimento (figura 7), resultados semelhantes foram obtidos por Rossi (2007), com cultivo bacteriano de 72h a leituras de OD600nm de 1.1266 para *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 e 1.2512 para *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1.

Figura 8 - Valores de leituras de OD600 em isolados recombinantes de Bt contendo os genes *cry4B*, *cry10*, *cry11* e *cyt1A* às 72 horas de cultivo em meio NYSM

Estes valores obtidos estão de acordo com outros trabalhos que utilizaram diferentes isolados de Bt; todos eles com valores de OD próximas (ou maiores) que 1,0 em 72 horas de cultivo, momento este em que o inóculo é composto principalmente por esporos e cristais.

O resultado obtido das UFC proveniente do plaqueamento das diluições 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} para o isolado de maior interesse deste trabalho, aquele contendo o gene *cry11*, mostraram que a concentração da bactéria variou de 1361 UFC, 433 UFC, 138 UFC e 12 UFC, respectivamente (Figura 9). Esses valores correspondem a valores entre 10^7 e 10^8 bactérias/mL no inóculo original. Apesar da variação de uma grandeza no cálculo da concentração bacteriana do inóculo, os valores calculados estão de acordo com os normalmente utilizados na literatura em ensaios com diferentes isolados de Bt e insetos-alvo (ROSSI, 2007, SILVA, 2008, TREMILIOSI et al., 2008 e MONNERAT et al., 2009).

Figura 9 - Resultado da diluição serial da bactéria que contém o gene *cry11* nas diluições 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} após 76 h de cultivo em meio NYSM

Este tipo de procedimento foi feito a fim de estimar o quanto de bactéria estava sendo inoculada em plantas de citros às 72 horas após o cultivo, momento em que as estruturas cristais e esporos estão presentes.

4.2 Confirmação da capacidade endofítica de Bt em citros e aquisição pelas ninfas

A inoculação de Bt via sistema radicular em *seedlings* de laranja permitiu a absorção e translocação da bactéria até a parte aérea, bem como a aquisição da mesma por ninfas de *D. citri* que se alimentavam destas plantas (Figura 10). A confirmação da capacidade endofítica de Bt foi feita através do isolamento e plaqueamento da bactéria a partir de folhas de citros e ninfas de *D. citri* mortas, seguido de PCR com oligonucleotídeos específicos para a amplificação de diferentes genes codificadores de toxinas. Os isolamentos foram feitos, para cada isolado original ou transformado, sempre com três repetições para as folhas e pelo menos uma para ninfas. A confirmação da identidade da bactéria por PCR foi realizada em pelo menos uma dessas repetições.

A morfologia das colônias provenientes do isolamento de Bt foi de bordas irregulares, esbranquiçadas e opacas (Figura 10), concordando com as descrições de Benintende et al. (2001), Vitelli-Flores et al. (2010) e Balbinotte (2011).

Figura 10 - Isolamento de Bt a partir de folhas novas de citros e ninfas mortas. A) colônias de Bt isoladas de ninfas mortas que se alimentaram das plantas inoculadas com isolado S1989, Cry1Aa, Cry11, colônias de Bt isoladas de folha (Cry1Aa, Cry2Aa e Cry11), B) colônias de Bt isoladas de ninfas mortas que se alimentaram das plantas inoculadas com Cyt1A, Cry4B, colônias de Bt isoladas de folhas (Cyt1A, Cry4B, Cry10 e # N folha, colônia não correspondente á de Bt isolada de folhas do controle negativo (sem Bt)), C) controle negativo (N folha), colônias de Bt isoladas de folhas (S1450), colônias de Bt características, colônias de Bt isoladas de ninfas que se alimentaram das plantas inoculadas com isolado S1450.

No geral, a maior parte dos isolamentos, tanto de ninfas quanto de folhas, resultou em menos que 20 UFC, outros apresentaram de 20-60 UFC, e poucos acima de 200 UFC (Tabela 3). Nos isolados originais, S1302, S1450 e S1989, o número de UFC encontradas foi menor

que 23. O isolamento e plaqueamento de isolados de Bt recombinantes com os genes individuais *cryIAa*, *cryIAb*, *cry2Aa* e *cryII* resultaram em número maior de colônias a partir de ninfas de *D. citri*, variando de 20 a 70 UFC. Porém, para os isolados transformados com os genes *cryIAc* e *cytIA* foram encontradas aproximadamente 200 a 300 UFC. Para os demais isolados transformados (*cryIB*, *cry4A*, *cry4B* e *cryI0*) foram recuperados baixo número de UFC, fato este também observado por Balbinotte (2011) nos isolamentos de Bt a partir de ninfas e folhas. O número de UFC foi variável tanto do isolamento de folhas quanto de ninfas. Esta diferença encontrada poderia ser explicada pela distribuição da bactéria em *seedlings* de citros ou pela quantidade de bactéria ingerida pelas ninfas ao se alimentarem destas plantas. No entanto, ressalta-se que a bactéria foi recuperada de todas as plantas e ninfas testadas.

Monnerat et al. (2009) também observaram baixo número de UFC ao isolarem Bt de algodoeiros de noventa dias de idade. Resultados semelhantes foram encontrados em Manduelli et al. (2007) ao recuperaram baixo número de células de Bt ($< 10 \text{ UFC cm}^{-2}$), a partir de folhas da parte superior em plantas de feijão quando inoculadas com diferentes isolados de Bt tanto no solo, quanto sobre as sementes ou ainda sobre a parte inferior das folhas. O número de células de Bt em ambiente natural varia de 10^2 a 10^4 UFC por grama de solo, enquanto em folhas, esse número varia de 0 a 100 UFC cm^{-2} (DAMGAARD, 2000).

Nos controles negativos (sem Bt) em *seedlings* de laranja e ninfas não foram visualizadas colônias típicas da bactéria; porém, em apenas dois casos foram encontradas colônias com morfologia distinta das de Bt em folhas de citros (Figura 10B # N folha). Estas foram negativas por PCR com os oligonucleotídeos específicos para os isolados de Bt testados e possivelmente correspondem a bactérias endofíticas de citros.

Tabela 3 - Número de colônias provenientes do isolamento de Bt a partir de folhas e ninfas

Isolamento de Bt a partir de folhas e ninfas mortas		
Isolados originais e isolados transformados com genes <i>cry</i> e <i>cyt</i>	Número total de colônias	
	Folhas	Ninfas
S1302	6	3
S1450	4	19
S1989	21	23
<i>cryIAa</i>	20-60	4
<i>cryIAb</i>	24	4
<i>cryIAc</i>	~200-300	~100
<i>cry2Aa</i>	24-40	5
<i>cryIB</i>	1	1
<i>cry4A</i>	5	1
<i>cry4B</i>	13	1
<i>cryI0</i>	15	3
<i>cryII</i>	68	60
<i>cytIA</i>	~200-300	~100

Os oligonucleotídeos específicos utilizados neste trabalho para a confirmação da identidade da bactéria de cada isolado original e recombinante contendo os diversos genes *cry* e *cyt* foram validados. Os fragmentos amplificados nos isolados originais foram de 180 a 522 pb, sendo os tamanhos exatos: *cryIAa*: 246pb, *cryIAb*: 216pb, *cryIAc*: 180pb, *cry2Aa*: 470 pb, *cry4A*: 459pb, *cry4B*: 321pb, *cry10*: 348pb, *cry11*: 305pb, *cytIA*: 522pb e *cytIB*: 477 pb (Figura 11).

Figura 11- Gel de agarose 1% evidenciando a validação dos oligonucleotídeos que amplificam os genes que codificam as proteínas presentes nos isolados S1302, S1450 e S1989. L: ladder 100 pb Invitrogen, H₂O: água, C: controle negativo (sem Bt)

Praticamente todos os oligonucleotídeos foram validados. Os resultados para os isolados transformados com os genes *cryIAb*, *cryIAc*, *cry2Aa*, *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11* e *cytIA* foram bastante satisfatórios, com a observação de banda única, geralmente forte, e do tamanho esperado nos géis para cada um dos genes amplificados (Figuras 12 e 13). A detecção do gene *cryIAa* foi consistente, porém a amplificação, ainda que do tamanho esperado, de 246pb, era normalmente muito fraca (Figura 12). Isso permaneceu mesmo após a tentativa de otimização da reação, alterando-se concentrações de oligonucleotídeos, DNA-alvo e reagentes. No entanto, como no bioensaio de mortalidade a toxina codificada por esse gene não causou uma alta mortalidade nas ninfas (item 4.3), não foram dispendidos maiores esforços para otimizar a sua detecção por PCR. O gene *cryIB* não foi detectado por PCR usando os oligonucleotídeos específicos para esse gene, mas assim como a toxina Cry1Aa, também não causou alta mortalidade nas ninfas nos bioensaios (item 4.3).

Figura 12 - Gel de agarose 1% evidenciando a amplificação dos fragmentos correspondentes aos genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa*, *cry1B*, *cry4A*, *cry4B* e *cry10* de Bt e confirmando o isolamento da bactéria de folhas e ninfas. L100: Ladder de 100 pb, H₂O: água, C, CN e CP: controle negativo (sem Bt), +N: controle positivo coletado a partir de colônias isoladas de ninfas, +P: controle positivo a partir de colônias isoladas de plantas

Figura 13 - Gel de agarose 1% evidenciando a amplificação dos fragmentos correspondentes aos genes *cry11* e *cyt1A* de Bt e confirmando o isolamento da bactéria de folhas e ninfas. L100: Ladder de 100 pb, H₂O: água, C: controle negativo (sem Bt), +N: controle positivo coletado a partir de colônias isoladas de ninfas, +P: controle positivo a partir de colônias isoladas de plantas

A PCR se mostrou extremamente útil para confirmar a presença de diferentes genes *cry* e *cyt* nos nossos isolados de Bt. Essa técnica tem sido usada com sucesso em diversas situações. Vidal-Quist et al. (2009), Guidi et al. (2010), Liang et al. (2011), Mendoza et al. (2012), entre outros, caracterizaram isolados de Bt com essa ferramenta de maneira rápida e eficiente e Monnerat et al. (2009) usaram os mesmos oligonucleotídeos deste trabalho para detectar os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry2Aa* em plantas e insetos. Assim, de maneira geral, pode-se concluir que os oligonucleotídeos foram validados e confirmaram a capacidade de isolados de Bt serem translocados em plantas de citros e adquiridos pelos psilídeos.

Com os resultados obtidos do isolamento e a confirmação por PCR, este é o primeiro relato inequívoco da detecção de Bt endofítico em planta de citros e ninfas que se alimentaram destas plantas. Estes resultados confirmam os de Balbinotte (2011) que inoculou plantas de citros com isolado de Bt marcada com *gfp* e conseguiu detectar a fluorescência em folhas jovens dessas plantas e ninfas mortas do psilídeo que se alimentaram dessas folhas. No entanto, a autora observou alguma reação inespecífica nos insetos que se alimentaram das

plantas controle (sem *Btk-gfp*), provavelmente em função de contaminação ou da autofluorescência natural de outras espécies de bactérias presentes nos insetos. Além disso, naquela ocasião não foi realizada PCR para a confirmação dos resultados.

De acordo com Praça et al. (2012), o mecanismo de penetração de Bt provavelmente ocorre através de aberturas e lesões nas raízes. Em seguida, a bactéria se move através do xilema até atingir as folhas. É certo que *D. citri* se alimenta preferencialmente em floema; no entanto, quando em longos períodos de jejum esses insetos também podem sugar a seiva dos vasos do xilema, possivelmente em busca de água (BONANI et al., 2010). É bastante provável que o contato entre o psíldeo e os cristais e esporos de Bt ocorra nessas ocasiões.

Mishra et al. (2009) demonstraram que Bt, ao ser inoculado na rizosfera de leguminosas, também coloniza seu interior e melhora a nodulação da raiz e o crescimento das plantas. Outras estirpes de Bt também foram capazes de colonizar raízes de *Arabidopsis thaliana in vitro* (VIDAL-QUIST et al., 2013). De acordo com Tanuja et al. (2013), o fato de Bt ser encontrado na forma endofítica e poder translocar na planta favorece seu uso no controle de pragas agrícolas que causam queda das folhas, assim como de insetos sugadores, insetos endófagos, pragas de solo e vetores de fitopatógenos.

Portanto, a confirmação da capacidade endofítica de Bt em citros possibilita seu potencial de uso como agente de controle biológico de *D. citri*, vetor responsável pela transmissão de *Ca. Liberibacter* spp., causadora do HLB dos citros.

4.3 Bioensaios de mortalidade

Balbinotte (2011) mostrou que três isolados de Bt foram promissores para o uso do controle do psíldeo do citros. No entanto, naquela oportunidade, apesar de haver uma clara associação entre inoculação de alguns isolados de Bt e mortalidade de ninfas de psíldeos, não foi possível fazer a confirmação inequívoca destes resultados. Desta forma, estes mesmos isolados originais foram utilizados em bioensaios independentes em nosso laboratório.

Os resultados de mortalidade de ninfas de 3º ínstar de *D. citri* por diferentes isolados de Bt foram corrigidos de acordo com a fórmula de Abbott (1925), amplamente utilizada em estudos dessa natureza, e podem ser observados nas Tabelas 4 e 5.

A mortalidade no controle negativo ficou na faixa do aceitável, menor que 20%. Balbinotte (2011) relatou até 30% de mortalidade no tratamento controle nas primeiras 48 horas após a inoculação. Esta mortalidade no controle provavelmente esteja relacionada à sensibilidade das ninfas à manipulação e nossos primeiros bioensaios também apresentaram

resultados semelhantes. No entanto, bioensaios posteriores apresentaram valores de mortalidade mais baixos no controle e foram utilizados nas análises. Já os bioensaios com mortalidades maiores que 20% no controle negativo foram desconsiderados.

Durante as avaliações foram encontradas ninfas mortas com o tegumento intacto e seco de acordo com a Figura 14 A e B.

Figura 14 - Avaliação da sobrevivência de ninfas de *Diaphorina citri* após inoculação com isolados de Bt. A) Ninfa morta, B) Ninfa viva e morta, C) Ninfa viva

Foi observada grande parte das ninfas se alimentando em folhas e brotações novas tanto na superfície, quanto na parte posterior, algumas vezes dentro das folhas jovens, outras na base do pecíolo da folha, mais abaixo no caule (Figura 15). A ninfa possui pouca mobilidade, porém à medida que muda de estágio se movimenta à procura de espaço e local para se alimentar. Alguns casos em que insetos estão infectados com microrganismos podem se isolar e mudar de comportamento ou parar de se alimentar.

Figura 15 - Ninfas de *Diaphorina citri* se alimentando em diferentes locais em plantas de citros inoculadas com Bt. A) Ninfa se alimentando na parte posterior da folha, B) Ninfa se alimentando dentro de uma brotação nova, C) Ninfas de 4º ínstar se alimentando na haste da planta

De acordo com Habib, Andrade (1998) a perda de apetite e o abandono do alimento são os primeiros sinais de bacteriose. Desta forma em alguns bioensaios foi observado que algumas ninfas sumiram 24 horas após a inoculação (h.a.i.) da planta com Bt. Este fato pode ser em função da alta sensibilidade de *D. citri* à bactéria, que pode ter parado de se alimentar

e caído no substrato, uma vez que este fenômeno não foi observado no controle negativo. Já em outros casos algumas ninfas desceram para a parte posterior das plantas como em caules ou próximo do pecíolo de folha. Balbinotte (2011) também observou este comportamento em ramos cortados de citros e murta.

Para todos os bioensaios, as folhas jovens das plantas-teste e as ninfas mortas foram coletadas e passaram pelo procedimento descrito anteriormente para o isolamento e plaqueamento de Bt. As colônias resultantes foram então confirmadas por PCR, conforme descrito no item 4.2.

O resultado da análise estatística foi feita por bioensaio e pode ser visualizada na tabela 4. A análise foi comparada entre os tratamentos, entre o tempo e a interação de ambos.

Desta forma, no bioensaio um, os tratamentos comparando-se os isolados transformados Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa e o controle negativo, não apresentaram diferença estatística ao longo do tempo, ou seja, não ocorreu a interação entre as toxinas e o tempo. No entanto, o isolado Cry2Aa ($P < 0.05$) difere dos demais em 120 h ($P < 0.05$), com 11% de mortalidade. Apesar da diferença estatística, não há relevância biológica, uma vez que um isolado que cause a morte de apenas 11% das ninfas cinco dias após a montagem do experimento não representa interesse algum para o manejo do psíldeo. Já no bioensaio dois isolados testados: Cry1B, Cry4A, Cry4B e Cry10, além do controle, houve interação significativa entre os isolados e entre os tempos; porém, tampouco os resultados apresentaram significado biológico que justificasse o uso de algum isolado no manejo de *D. citri* (Tabela 4). O mesmo aconteceu para os isolados testados no bioensaio seis (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry2Aa e Cry4A, além do controle).

No bioensaio cinco, a maior mortalidade de *D. citri* obtida foi ao redor de 57%, considerada limitada para um potencial uso como agente de controle biológico. Já nos demais bioensaios, três, quatro, sete e oito, foram observados ao menos um isolado capaz de causar mortalidade corrigida em torno de 80-90% das ninfas (Tabela 4), podendo ser considerados potencialmente interessantes.

Tabela 4 - Resultado da análise estatística da avaliação da mortalidade de ninfas de *D. citri* a Bt por bioensaio durante 120 horas calculada através da fórmula de Abbott (1925)

Avaliação da mortalidade de ninfas de <i>D. citri</i> causada por Bt							
Teste de Tukey para as médias da mortalidade corrigida (Abbott, 1925) no tempo em horas							
Bioensaios	Isolados testados (tratamentos)	0	24	48	72	96	120
1	Cry1Aa (I) a	0	9	15	20	17	12 A
	Cry1Ab (I) a	0	8	12	0	-11	-13 A
	Cry1Ac (I) a	0	16	24	15	10	7 A
	Cry2Aa (I) (P<0.05)	0	8	20	16	10	11 B
	N a	0	0	0	0	0	0 A
2	Cry1B (I) b (P<0.05)	0 A	6e	8	10	11	15
	Cry4A (I) c (P<.0001)	0 A	10	10	16	32 B	32 B
	Cry4B (I) c (P<.0001)	0 A	22	30 B	32 B	34 B	34 B
	Cry10 (I) c (P<.0001)	0 A	28 B	30 B	30 B	34 B	36 Bd
	N a	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
3	Cry11 (I) b (P<0.05)	0 A	46 B	68 B	80 Bbl	78 Bbl	80 Bbl
	Cyt1A (I) c	0 A	18 af	14 a	14 ac	19 j	19 jk
	S1302 (I) b (P<0.05)	0 A	52 B	71 B	79 Bbd	81 Bbi	85 Bbi
	S1450 (I) b (P<0.05)	0 A	26 ah	62 B	74 Be	80 Beg	80 Beg
	N a	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
4	Cry11 (II) b (P<.0001)	0 A	60 B	72 B	78 B	81 B	83 B
	S1302 (II) b (P<.0001)	0 A	60 B	80 B	88 Bd	92 Bdf	92 Bdf
	Cry10 (II) b (P<.0001)	0 A	68 B	84 B	90 Bd	92 Bd	91 Bd
	S1989 (I) b (P<.0001)	0 A	62 B	72 B	80 Bd	90 Bd	91 B
	S1450 (II) c (P<.0001)	0 Ac	32	44e	50	64 B	70 B
	N a	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
5	Cry1Aa (II) b (P<0.05)	0 A	53	60	52	50 B P<0.05	54
	Cry1Ac (II) b (P<0.05)	0 A	29	36	30	30	32
	Cry2Aa (II) b (P<0.05)	0 A	51	55 B	54 B	53 B	55 B
	Cry4B (II) b (P<0.05)	0 A	45	62	57	57 B	57 B
	N a	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
6	Cry1Aa (III) b (P<0.05)	0 A	8 A	23 B	24 B	28 B	21 B
	Cry1Ab (II) c	0 A	8 A	12 B	18 B	23 B	24 B
	Cry2Aa (III) b (P<0.05)	0 A	26 A	32 B	24 B	24 B	33 B
	Cry4A (II) b (P<0.05)	0 A	18 A	24 B	19 B	18 B	24 B
	N a	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
7	Cry10 (III) b (P<.0001)	0 A	46	64 B	79 B	70B	72 B
	S1989 (II) b (P<.0001)	0 A	52	66 B	68 B	68 B	68 B
	Cyt1A (II) b (P<.0001)	0 A	62 B	72 B	72 B	82 B	85 B
	Cry1B (II) c	0 A	22	22	18	14	21
	Cry4B (III) b (P<.0001)	0 A	52 B	76 B	79 B	80 B	83 B
	N a	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
8	Cry4B (IV) b (P<0.05)	0 A	31	37	36	42	50
	Cry10 (IV) b (P<0.05)	0 A	40	41	43	41	46
	Cry11 (III) c (P<.0001)	0 A	70 B	81 B	88 B	93 B	93 B
	Cyt1A (III) b (P<0.05)	0 A	50	56	56	59	65 B
	N a	0 A	0	0	0	0	0

* I a IV: número de vezes que um bioensaio foi montado, para cada um dos isolados originais e transformados. Letras maiúsculas e minúsculas representam os isolados que diferiram estatisticamente.

Os destaques para o bioensaio três foram os isolados originais S1302, S1450 e o isolado transformado com as toxinas Cry11, sendo que eles diferiram estatisticamente do controle negativo e do isolado Cyt1A. Nesse caso, houve interação significativa entre os isolados e tempo de observação na mortalidade ($P < .0001$), assim como houve a diferença entre tratamentos e entre os tempos (ambos $P < .0001$). Esses três isolados apresentaram mortalidade acima de 60% em 48 h após a inoculação, chegando por volta de 80% em 120 h.

O bioensaio quatro foi composto pelos três isolados originais (S1302, S1450 e S1989), além dos isolados transformados Cry10 e Cry11, e controle negativo. Neste bioensaio houve interação significativa entre os tratamentos (isolados) e tempo de observação na mortalidade ($P < 0.05$). Em relação aos isolados todos diferiram ($P < .0001$) do controle negativo, e todos os tempos ($P < .0001$) destes tratamentos (isolados) a partir de 24 h diferiram do tempo 0 h. Neste bioensaio, todos os isolados, com exceção do S1450, apresentaram elevada mortalidade (60-70%) já às 24 h após a inoculação, alcançando 83-92% em 120 h. Mesmo o isolado S1450, no entanto, causou 70% de mortalidade às 120 horas após a inoculação e não diferiu estatisticamente dos demais isolados testados. Dessa forma, todos os isolados mostraram potencial de uso no controle do psíldeo dos citros.

Apesar de os isolados testados no bioensaio cinco (Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa e Cry4B) terem diferido estatisticamente do controle negativo tanto em relação aos tratamentos quanto ao tempo (Tabela 4), as taxas de mortalidade de *D. citri* aos cinco dias após o início do experimento não passaram dos 57%, evidenciando um limitado potencial de uso para o controle do psíldeo.

Para o bioensaio sete foram testados o isolado original S1989 e os isolados transformados Cyt1A, Cry1B, Cry4B e Cry10, mais o controle negativo. Os mesmos não apresentaram interação ao longo do tempo, porém houve o efeito nos tratamentos. Com exceção do Cry1B, os demais apresentaram-se estatisticamente distintos do controle negativo, com níveis de mortalidade de *D. citri* entre 68-85% às 120 horas após a inoculação.

Finalmente, o bioensaio oito contou com os isolados transformados Cyt1A, Cry4B, Cry10 e Cry11, em adição ao controle negativo. Não houve efeito dos tratamentos ao longo do tempo, mas houve o efeito nos tratamentos, com destaque para o isolado Cry11, que causou a mortalidade de 70% das ninfas de psíldeo 24 h à inoculação, chegando a 93% em 120 h (Tabela 4).

Todos os bioensaios apresentaram diferença estatística significativa, seja ela entre os isolados e tempo, ou mesmo a interação de ambos, porém em alguns casos essa diferença não resultou em relevância biológica, com mortalidade de ninfas de *D. citri* muitas vezes inferior

a 50% em 120 h. No entanto, os resultados favoráveis para os isolados originais e a consistência da eficiência da toxina Cry11 em bioensaios independentes confirma o potencial de isolados de Bt para uso em controle biológico ou a transgenia visando ao manejo de *D. citri*. A tabela 5 sumariza os resultados de mortalidade obtidos por cada isolado de Bt, testado de duas a quatro vezes em bioensaios independentes.

Tabela 5 - Resultado da avaliação da mortalidade de ninfas de *D. citri* a Bt durante 120 horas calculada através da fórmula de Abbott (1925)

Avaliação da mortalidade de ninfas de <i>D. citri</i> a Bt						
média (%) da mortalidade corrigida no tempo em horas						
Isolados testados (tratamentos)	0	24	48	72	96	120
S1302 (I)	0	52	71	79	81	85
S1302 (II)	0	60	80	88	92	92
S1450 (I)	0	26	62	74	80	80
S1450 (II)	0	32	44	50	64	70
S1989 (I)	0	62	72	80	90	91
S1989 (II)	0	52	66	68	68	68
Cry1Aa (I)	0	9	15	20	17	12
Cry1Aa (II)	0	53	60	52	50	54
Cry1Aa (III)	0	8	23	24	28	21
Cry1Ab (I)	0	8	12	0	-11	-13
Cry1Ab (II)	0	8	12	18	23	24
Cry1Ac (I)	0	16	24	15	10	7
Cry1Ac (II)	0	29	36	30	30	32
Cry2Aa (I)	0	8	20	16	10	11
Cry2Aa (II)	0	51	55	54	53	55
Cry2Aa (III)	0	26	32	24	24	33
Cry1B (I)	0	6	8	10	11	15
Cry1B (II)	0	22	22	18	14	21
Cry4A (I)	0	10	10	16	32	32
Cry4A (II)	0	18	24	19	18	24
Cry4B (I)	0	22	30	32	34	34
Cry4B (II)	0	45	62	57	57	57
Cry4B (III)	0	52	76	79	80	83
Cry4B (IV)	0	31	37	36	42	50
Cry10 (I)	0	28	30	30	34	36
Cry10 (II)	0	68	84	90	92	91
Cry10 (III)	0	46	64	79	70	72
Cry10 (IV)	0	40	41	43	41	46
Cry11 (I)	0	46	68	80	78	80
Cry11 (II)	0	60	72	78	81	83
Cry11 (III)	0	70	81	88	93	93
Cyt1A (I)	0	18	14	14	19	19
Cyt1A (II)	0	62	72	72	82	85
Cyt1A (III)	0	50	56	56	59	65

I-IV: número de vezes que um experimento foi montado para cada uma das estirpes especificadas na coluna "Tratamentos".

Além dos isolados originais S1302 (que contém os genes *cryIAb* e *cry3A*), S1450 (que contém os genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB*, *cry2Aa* e *cry2Ab*) e S1989 (com os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11*, *cyt1A* e *cyt1B*), 10 dos 13 genes presentes nos isolados testados encontravam-se clonados em isolados recombinantes com genes únicos (*cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB*, *cry2Aa*, *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11* e *cyt1A*) e apenas três deles (*cry3A*, *cry2Ab* e *cyt1B*) não estavam disponíveis para uso neste trabalho. Futuramente estes três genes deverão ser clonados individualmente em isolado de Bt e testados, pois podem ser patogênicos a *D. citri*. O isolado S1302, por exemplo, causou mortalidade ao redor de 50% em 24 horas após a inoculação (h.a.i) nos bioensaio três ($P < 0.05$) e quatro ($P < .0001$), chegando a 70-80% em 48 h.a.i (Tabela 4), mas a toxina Cry1Ab, presente neste isolado, não foi efetiva no controle do psilídeo dos citros quando inoculada isoladamente em isolado recombinante (bioensaios 1 e 6, Tabela 4). Como S1302 contém apenas *cryIAb* e *cry3A* – este último não testado individualmente – é possível que o gene *cry3A* seja responsável por esta alta mortalidade observada em ninfas de *D. citri* ou que haja alguma ação sinérgica entre eles. O isolado S1450 apresentou a mortalidade acima de 60% em 48 h.a.i. no ensaio 3, chegando a 80% com 120 h.a.i. No geral, os genes presentes neste isolado (*cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB* e *cry2Aa*) causaram a mortalidade de 10-50% das ninfas de *D. citri*, com exceção de *cryIAa* e *cry2Aa*, que em um dos experimentos (bioensaio 5) causaram 50% de mortalidade em 24 h.a.i. e 55% em 120 h.a.i. O gene *cry2Ab*, presente neste isolado, não estava clonado em isolado recombinante e, portanto, o efeito individual desta toxina não pôde ser testado. Tampouco pode-se observar se houve algum efeito sinérgico entre as várias toxinas presentes neste isolado.

Dois bioensaios foram montados com o isolado S1989. O bioensaio 4 resultou em 62% de mortalidade de *D. citri* às 24 h.a.i. e 91% de mortalidade às 120 h.a.i. Porém, esse resultado não se manteve no bioensaio 7, sendo que a mortalidade final, às 120 h.a.i., foi de 68%. Em ambos os bioensaios ocorreu diferença ($P < .0001$) em relação aos demais isolados testados. Apesar da variação encontrada entre os experimentos, ainda sim este isolado foi mais eficiente a ninfas de *D. citri* do que a de outro hemíptero, o pulgão *Aphis gossypii* (Melatti, 2008). Ressalta-se que o isolado recombinante *cry11*, consistentemente identificado como o mais eficiente no controle de *D. citri*, ocorre no isolado original S1989, sendo possivelmente o responsável pela alta mortalidade de psilídeo observada no isolado original.

É amplamente conhecida a especificidade de toxinas Cry e Cyt a diferentes organismos. Balbinotte (2011) constatou a mortalidade de 75% de ninfas de *D. citri* em ramos de citros cortados causada pelos isolados S1302 e S1989, e 50% pelo isolado S1450. O

mesmo isolado S1450, no entanto, não foi tóxico a larvas de simulídeos (Ordem Diptera) (PEREIRA, 2011), mas outro isolado do serovar Bti contendo as mesmas toxinas da S1989 causou 100% de mortalidade (PEREIRA et al., 2013).

Com relação aos isolados transformados com os genes que codificam as toxinas individuais, um grupo obteve níveis de mortalidade abaixo de 40% às 120 h.a.i. Este incluiu os isolados contendo *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB* e *cry4A*, que podem ser considerados praticamente inócuos a *D. citri*. Os genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB* estão entre os principais usados na produção de milho e algodão Bt para o controle principalmente de lagartas porém não afetaram o inseto sugador. O isolado contendo *cytIA* causou a mortalidade de aproximadamente 65-85% das ninfas do psilídeo dos citros em dois bioensaios (7 e 8), enquanto aquelas com os genes *cry2Aa*, *cry4B* e *cry10* apresentaram elevada inconsistência nos resultados em bioensaios independentes. É possível que tenha ocorrido algum problema nestes ensaios, talvez relacionado com a padronização da quantidade de esporos e cristais do inóculo. Bactérias apresentam níveis de expressão gênica variáveis dependendo de condições ambientais nas fases de crescimento. Em particular o isolado Cry10 deverá ser novamente testado, pois em alguns bioensaios ele causou elevada mortalidade em ninfas de *D. citri*, chegando a 68% já em 24 h.a.i. e a 91% em 120 h.a.i. (bioensaio 4).

Embora tenha ocorrido inconsistência nestes resultados, o isolado recombinante com o gene codificador para *cry2Aa* apresentou a mortalidade de 55% no experimento 5. Novos ensaios com esse isolado devem ser realizados, pois de acordo com Konecka et al. (2012) foi relatado que o gene que codificam a proteína Cry2Aa é tóxico a Diptera e Hemiptera.

No entanto, o grande destaque dos bioensaios foi o isolado contendo o gene *cryII*. Nos três bioensaios realizados, esse isolado causou a mortalidade de 80% a 93% das ninfas de *D. citri* às 120 h.a.i. (Tabela 5). Há muito se conhece que genes *cryII* normalmente codificam proteínas de 67 a 94 KDa altamente patogênicas a larvas de dípteros, alguns deles vetores de doenças tropicais humanas, como a febre amarela, a malária e a dengue (DELÉCLUSE et al., 1995, DONOVAN et al., 1988, ORDUZ et al., 1998, IBARRA et al., 2003). Já para insetos da ordem Hemiptera, como *D. citri*, há poucos trabalhos sobre o efeito de Cry11. No entanto, Porcar et al. (2009) evidenciaram 100% de mortalidade no pulgão da ervilha (*Acyrtosiphon pisum*) após 3 a 6 dias de exposição a altas doses (500 µg/mL) de Cry11 solubilizada em dieta artificial. Os mesmos autores encontraram 25% de mortalidade no isolado com o gene codificador da proteína *cryIAb*, resultados próximo ao encontrado neste trabalho.

Em função da consistência dos resultados e da elevada mortalidade observada, a toxina Cry11 deve ser considerada excelente candidata para estudos futuros que poderão levar

ao manejo de *D. citri* e, conseqüentemente, do HLB dos citros, seja através da aplicação de estirpes como biopesticida ou através da utilização do gene *cryII* na transformação de citros.

5 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A inoculação de Bt via sistema radicular permitiu a translocação da bactéria endofiticamente até a parte superior de plantas de citros
- A confirmação desta capacidade endofítica de Bt se deu a partir de seu isolamento e plaqueamento de folhas e ninfas mortas, seguida de PCR com oligonucleotídeos específicos para cada isolado testado
- Apesar de apresentarem alguma variação, os bioensaios se mostraram eficientes na determinação de isolados de Bt patogênicos a *D. citri*
- Os três isolados originais de Bt apresentaram mortalidades em ninfas de *D. citri* variando entre 68 a 92%
- Um dos isolados recombinantes se destacou por induzir mortalidade em 68 a 81% das ninfas de *D. citri* 48 horas após a inoculação (h.a.i), atingindo 80 a 93% das ninfas 120 h.a.i.
- Esse isolado transformado possui grande potencial de uso no manejo de *D. citri* através da produção de um bioinseticida ou de plantas transgênicas expressando a toxina efetiva contra o psíldeo

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 18, p. 265-266, 1925. Disponível em <<http://www.ehabsoft.com/ldpline/onlinecontrol.htm>>. Acesso em: 04 out. 2013.
- ALVES, S.B.; LECUONA, R.E. Epizootiologia aplicada ao controle de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, cap. 5, p. 97-169.
- ALVES, S.B.; MORAES, S.B. Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, cap. 28, p.765-778.
- ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M., MOINO JR, A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, cap. 20, p. 637-711.
- ARGÔLO-FILHO, R.C.; LOGUERCIO, L.L. *Bacillus thuringiensis* Is an Environmental Pathogen and Host-Specificity Has Developed as an Adaptation to Human-Generated Ecological Niches. **Insects**, Ottawa, v. 5, n.1, p. 62-91, 2014.
- ARONSON, A.I.; BECKMAN, W.; Dunn, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiological Review**, Washington, v. 50, p. 1-24, 1986.
- AUBERT, B. *Trioza erythrae* (del Guercio) and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, Paris, v. 42, p. 149-162, 1987.
- AUBERT, B.; GRISONI, M.; VILLEMIN, M.; ROSSOLIN, G. A case study of Huanglongbing (greening) control in Réunion. In : DA GRAÇA, J.V.; MORENO, P.; YOKOMI, R.K.(Ed). CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS (IOC),13., 1996. Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California,1996. p. 276-278.
- BALBINOTTE, J. **Desenvolvimento de sistemas de aquisição de *Bacillus thuringiensis* por *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) para estudos de patogenicidade**. 2011. 93p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- BENINTENDE, G.; GLEN, A.; IBARRA, J.; BRAVO, A.; ESPINOSA, A. *Bacillus thuringiensis*: aislamiento, crecimiento y conservacion de estas bacterias. In: BRAVO, A.; ARRIETA, G.; BENINTENDE, G.; REAL, M.; ESPINOZA, A.M.; IBARRA, J.; MONNERAT, R.; ORDUZ, S.; SOBERÓN, M. **Metodologias utilizadas en investigación sobre bacterias entomopatógenas**. México: UNAM, 2001

BIDESHI, D.K.; WALDROP, G.; FERNANDEZ-LUNA, M.T.; DIAZ-MENDOZA, M.; WIRTH, M.C.; JOHNSON, J.J.; PARQUE, H.W.; FEDERICI, B.A. Intermolecular interaction between Cry2Aa and Cyt1Aa and its effect on larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 23, n. 8, p. 1107-15, 2013.

BONANI, J.P.; FERERES, A.; GARZO, E.; MIRANDA, M.P.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; LOPES, J.R.S. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Amsterdam, v. 134, p. 35-49, 2010.

BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; CRISTOFANI-YALY, M.; MALOSSO, A.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Avaliação de diferentes genótipos de citros à infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 85-90, 2010.

BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 88, p. 7-37, 2006.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; PORTA, H.; GARCÍA-GÓMEZ, B.I.; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; PARDO, L.; SOBERÓN, M. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial Biotechnology**, Bedford, v. 6, p. 17-26, 2012.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 41, p. 423-431, 2011.

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

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

CERÓN, J.; ORTÍZ, A.; QUINTERO, R.; GÜERECA, L.; AND BRAVO, A. 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, 1995.

CHOW, A.; DUNLAP, C.; FLORES, D.; JACKSON, M.; MEIKLE, W.; SÉTAMOU, M.; PATT, J.M. Development of a pathogen dispenser to control Asian citrus psyllid in residential and organic citrus. **CRB Funded Research Reports**, Califórnia, January/February, 2013. Disponível em: < http://swfrec.ifas.ufl.edu/hlb/database/pdf/21_Chow_13.pdf > Acesso em: 04 nov.2013.

CitrusBR. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/safra/press-release-estimativa-de-safra-2013-14-288665-1.asp>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU JÚNIOR, J.; CARVALHO, A.S.; MACHADO, M.A. First report of the causal agent of *Huanglongbing* (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 12, p. 1382, 2004.

CORRÊA, R.F.T.; ARDISSON-ARAÚJO, D.M.P.; MONNERAT, R.G.; RIBEIRO, .BM. Cytotoxicity Analysis of Three *Bacillus thuringiensis* Subsp. *israelensis* δ -Endotoxins towards Insect and Mammalian Cells. **PLoS ONE**, San Francisco v. 7, n.9p. e46121. doi:10.1371/journal.pone.0046121, 2012.

CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHNEPF, E.; SUN, M.; ZEIGLER, D.R. "*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature" 2013. Disponível em: <http://www.btnomenclature.info/> Acesso em: 26 jul. 2013

DA GRAÇA, J.V.; SÉTAMOU, M.; LI, W.; NAKHLE, M.; RASCOE, J.; KUNTA, M. Huanglongbing in Texas. In: CONFERENCE OF THE IOCV,9., 2013. Mpumalanga, South Africa. **Proceedings...** Mpumalanga, South Africa: Kruger National Park, 2013. p. 51

DAMGAARD, P.H. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 2000, Chapter 1.2, p. 23-49.

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

DELÉCLUSE, A.; ROSSO, M.; RAGNI, A. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* encoding a highly mosquitocidal protein. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v.61, p. 4230-4235, 1995.

DONOVAN, W.; DANKOCSIK, C.; GILBERT, M. Molecular characterization of a gene encoding a 72-kilodalton mosquito-toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 4732-4738, 1988;

DUAN, Y.P.; GOTTWALD, T.; ZHOU, L. J.; GABRIEL, D.W. First report of dodder transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ to tomato (*Lycopersicum esculentum*). **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, p.831, 2008.

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

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**, San Francisco v. 8, n. 5, p;e65392. doi:10.1371/journal.pone.0065392

EPA. United States Environmental Protection Agency. Disponível em: <<http://www.epa.gov/>>. Acesso em: 18 set. 2013.

ESTRUCH, J.J.; WARREN, G.W.; MULLINS, M.A.; NYE, G.J.; GRAIG, J.A.; KOZIEL, M.G. VIP3A, A novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, USA, v. 93, p. 5389-5394, 1996

FAO STATISTICAL YEARBOOK. World Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 289 p., 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/publications/en/>. Acesso em: 01 fev. 2014.

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

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

FIÚZA, L.M. ; BERLITZ, D.L. Produtos de *Bacillus thuringiensis*: Registro e Comercialização. **Biociência & Desenvolvimento**, Cascavél, n. 38, p. 58060, 2009.

FRANCISCHINI, F.J.B.; OLIVEIRA, K.D.S.; ASTÚA-MONGE, G.; NOVELLI, A.; LORENZINO, R.; MATIOLLI, C.; KEMPER, E.; DA SILVA, A.C.R. First report on the transmission of ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ from citrus to *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91,p.631, 2007.

FUNDECITRUS. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/10>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

GALVÃO, P.G.; MELO, L.H.V.de.; GITAHY, P. de M.; VIDAL, M.S.; ARAUJO, J.L.S.; BALDANI, J.I. **Plasmídios em *Bacillus thuringiensis*: tamanho, mecanismo de replicação e papel na atividade entomopatogênica**. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia,2009. 31p. 1517-8498; 262) 2009. –(Documentos/Embrapa Agrobiologia,

GOTTWALD, T.R. Current epidemiological understanding of *citrus Huanglongbing*. **Annual Review of Phytopathology**, Davis, v. 48, p. 119-139, 2010.

GRAFTON-CARDWELL, E.E.; STELINSKI, L.L.; STANSKY, P.A. Biology and Management of Asian Citrus Psyllid, Vector of the Huanglongbing Pathogens. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 58, p. 413-32, 2013.

GRIEGO, V.M.; SPENCE, K.D. Inactivation of *Bacillus thuringiensis* Spores by Ultraviolet and Visible Light. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 35, n. 5, p. 906-910, 1978,

GUIDI, V.; DE RESPINIS, S.; BENAGLI, C.; LÜTHY, P.; TONOLLA, M. A real-time PCR method to quantify spores carrying the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis cry4Aa* and *cry4Ba* genes in soil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 109, p. 1209-1217, 2010.

HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 12, p. 383-446.

HALBERT, S.E.; NUNEZ, C.A. Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Sternorrhyncha: Psyllidae) in the Caribbean basin. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, p. 401-402, 2004.

HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, n. 3, p. 330-352, 2004.

HALL, D.G.; HENTZ, M.G.; MEYER, J.M.; BOUCIAS, D.G. Observations on the entomopathogenic fungus *Hirsutella citriformis* attacking adult *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in a managed citrus grove. **BioControl**, Dordrecht v. 57, p. 663–675, 2012.

HALL, D.G.; RICHARDSON, M.L.; AMMAR, EL-DESOUKY.; HALBERT, S.E. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 146, p. 207–223, 2012.

HANSEN, B.M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 41-64.

HARTUNG, J.S.; PAUL, C.; ACHOR, D.; BRALANSKY, R.H. Colonization of dodder, *Cuscuta indecora*, by ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and ‘*Ca. Liberibacter americanus*’. **Phytopathology**, Ithaca, v. 100, p. 756- 762, 2010.

HILF, M.E.; SIMS, K.R.; FOLIMONOVA, S.Y.; ACHOR, D.S. Visualization of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ cells in the vascular bundle of citrus seed coats with fluorescence in situ hybridization and transmission electron microscopy. **Phytopathology**, Ithaca, v. 103, p. 545-554, 2013.

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. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains from Latin America with Insecticidal Activity against Different Mosquito Species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5269–5274, 2003.

IBRAHIM, M.A.; GRIKO, N.; JUNKER, M.; BULLA, L.A. *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. **Bioengineered Bugs**, Austin, v. 1, n. 1, p. 31-50, 2010.

INFORMA ECONOMICS - FNP.

Disponível em: <<http://www.informaecon-fnp.com/noticia/9328>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

INOUE, H.; OHNISHI, J.; ITO, T.; TOMIMURA, K.; MIYATA, S.; IWANAMI, T.; ASHIHARA, W. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 155, p. 29–36, 2009.

ISAAA. Disponível em

<<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/44/toptenfacts/default.asp>>. Acesso em: 19 jun. 2013.

JISHA, V.N.; SMITHA, R.B.; BENJAMIN, S. An Overview on the Crystal Toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Advances in Microbiology**, London, v. 3, p. 462-472, 2013. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2013.35062>

JOHNSON, D.E.; OPPERT, B.; MCGAUGHEY, W.H. Spore coat protein synergizes *Bacillus thuringiensis* crystal toxicity for the Indianmeal moth (*Plodia interpunctella*). **Current Microbiology**, New York, v. 36, p. 278-282, 1998.

JURAT-FUENTES, J.L.; JACKSONY, T.A. Bacterial entomopathogens. In: Insect Pathology, chap. 8, p. 266-349, 2013. DOI: 10.1016/B978-0-12-384984-7.00008-7

KANNAN, P.; XAVIER, R.; JOSEPHINE, R.; MARIMUTHU, K.; KATHIRESAN, S.; SREERAMANAN, S. The occurrence of *Bacillus thuringiensis* strains in chemical intensive Rice Growing Ecosystem, **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 6, n. 24, p. 5147-5152, 2012.

KING, P.J.H.; ONG, K.H.; SIPEN, P.; MAHADI, N.M. Toxicity of local Malaysian *Bacillus thuringiensis* subspecies *Kurstaki* against *Plutella xylostella*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, n. 56, p. 11925-11930, 2012.

KONECKA, E.; BARANEK, J.; HRYCAK, A.; KAZNOWSKI, A. Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from Soil and Water. **The Scientific World Journal**, 2012;2012:710501. doi: 10.1100/2012/710501. Epub 2012.

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

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

LIANG, H.; LIU, Y.; ZHU, J.; GUAN, P.; LI, S.; WANG, S.; ZHENG, A.; LIU, H.; LI, PING. Characterization of *CRY2*-TYPE genes of *Bacillus thuringiensis* STRAINS from soil isolated of Sichuan Basin, China. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, p.140-146, 2011.

LOPES, J.; SANTOS, F.P.; ZEQUI, J.A.C.; PETRONI, D. Eficiência e Persistência de Três Produtos Comerciais à Base de *Bacillus thuringiensis israelensis* e *Bacillus sphaericus* no Controle de Culicidae (Diptera) em Lagoas de Tratamento de Efluentes. **Entomo Brasilis**, Vassoura, v. 3, n. 3, p. 85-88, 2010.

LOPES, S.A.; BERTOLINI, E.; FRARE, G.F.; MARTINS, E.C.; WULFF, N.A.; TEIXEIRA, D.C.; FERNANDES, N.G.; CAMBRA, M. Graft transmission efficiencies and multiplication of "*Candidatus Liberibacter americanus*" and "*Ca. Liberibacter asiaticus*" in citrus plants. **Phytopathology**, Ithaca, v. 99, p. 301-306, 2009.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F. Graft Transmission and Cultivar Reaction of Citrus to 'Candidatus Liberibacter americanus'. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n.1, p. 21-24, 2008.

LOU, B.H.; ZHOU, C.Y. ZHAO, X.Y.; LI, Z.G.; XU, M.; LIU, J.X.; ZHOU, Y.; TANG, K.Z. Primary study on species and intraspecific differentiations of HLB pathogens in eight provinces of China. In, **Vol. P333 abstracts, Proceedings of the 11th International Citrus Congress – International Society of Citriculture**, Deng, X.; Xu, J.; Lin, S.; Guan, R. eds. China Agricultural Press, October 26–30 at Wuhan, China, Gainesville: University of Florida Press, p. 232, 2008.

LUCON, C.M.M.; GUZZO, S.D.; JESUS, C.O.de.; PASCHOLATI, S.F.; DE GOES, A. Postharvest harpin or *Bacillus thuringiensis* treatments suppress citrus black spot in 'Valencia' oranges. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, p.766-772, 2010.

MACEDO, C.L. DE.; MARTINS, E.S.; MACEDO, L.L.P. DE.; SANTOS, A.C.DOS.; PRAÇA, L.B.; DE GÓIS, L.A.B.; MONNERAT, R.G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficientes contra a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 12, p. 1759-1765, 2012.

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

MAFRA, V.; MARTINS, P.K.; FRANCISCO, C.S.; RIBEIRO-ALVES, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M.A. *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. **BMC Genomics**, London, v.14, p. 247, 2013.

MANN, R.S.; PELZ-STELINSKI, K.; HERMANN, S.L.; TIWARI, S.; STELINSKI, L.L. Sexual Transmission of a Plant Pathogenic Bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, between Conspecific Insect Vectors during Mating. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 12, p e29197. doi:10.1371/journal.pone.0029197, 2011.

MARTINS, E.S. **Estudo da atividade de proteínas Cry, derivadas de *Bacillus thuringiensis* ativas para insetos-praga do algodoeiro**. 2009. 158p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

MELATTI, V.M. **Seleção de Estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*)**. 2008. 120p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

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

MENDOZA, G.; PORTILLO, A.; ARIAS, E.; RIBAS, R.M.; OLMOS, J. New combinations of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains isolated from northwestern Mexico. **International Microbiology**, Barcelona, v. 15, p. 209-216, 2012.

MICHAUD, J.P. Natural mortality of Asin citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 417-431, 2004.

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. Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffea canephora*. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 7, n.7, p. 586-594, 2013.

MISHRA, P.K.; MISHRA, S.; SELVAKUMAR, G.; BISHT, J.K.; KUNDU, S.; GUPTA, H.S. Coinoculation of *Bacillus thuringiensis*-KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 25, p. 753-761, 2009.

MIZUKI, E.; PARK, Y.S.; SAITOH, H.; YAMASHITA, S.; AKAO, T.; HIGUCHI, K.; OHBA, M. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.7, p. 625-634, 2000.

MONNERAT, R.G. **Identificação, caracterização e disponibilização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficazes ao controle de lepidópteros desfoliadores da cultura do algodão**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, nov., 2003. 46.p (Relatório Final).

MONNERAT, R.G. **Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 5p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 10).

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. 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, 2000, v. 3, p. 163-200.

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

MONNERAT, R.G.; SOARES, C.M.; CAPDEVILLE, G.; JONES, G.; MARTINS, E.S.; PRAÇA, L.; CORDEIRO, B.A.; BRAZ, S.V.; DOS SANTOS R.C.; BERRY, C. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* bacteria living inside of plants. **Microbial Biotechnology**, Bedford, v. 2, n. 4, p.512-520, 2009.

MULETA, D.; ASSEFA, F.; HJORT, K.; ROOS, S.; GRANHALL, U. Characterization of Rhizobacteria isolated from Wild *Coffea arabica* L. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 9, n. 2, p. 100-108, 2009.

NAVA, D.E.; GÓMEZ TORRES, M.L.; RODRIGUES, M.D.L.; BENTO, J.M.S.; PARRA, J.R.P. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 131, n. 9/10, p. 709-715, 2007.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O Retrato da Citricultura Brasileira**, Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 137p.

OLIVEIRA, C.M.; LOPES, J.R.S. Técnicas para criação da cigarrinha-do-milho e inoculação de mollicutes e vírus em plantas. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M. de (Ed.). **Doenças em milho: mollicutes, vírus, vetores e mancha por Phaeosphaeria**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2004. p. 89-116.

OHBA, M.; MIZUKI, E.; UEMORI, A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. **Anticancer Research**, Athens, v. 29, p. 427–433, 2009.

OOTANI, M.A.; RAMOS, A.C.C.; AZEVEDO, E.B.DE; GARCIA, B.O.; SANTOS, S.F.; AGUIAR, R.W.S. Avaliação da toxicidade de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para *Aedes aegypti* Linneus, (Díptera: Culicidae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Toronto, v. 2, n. 2, p. 37-43, 2011.

ORDUZ S, REALPE M, ARANGO R, MURILLO L, DELÉCLUSE A. Sequence of the cry11Bb1 gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and toxicity analysis of its encoded protein. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1388, p. 267-272, 1998;

ORTIZ-HERNÁNDEZ, M.L.; SÁNCHEZ-SALINAS, E.; DANTÁN-GONZÁLEZ, E.; CASTREJÓN-GODÍNEZ, M. L. Pesticide Biodegradation: Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process. In: CHAMY, R. ; ROSENKRANZ, F. (Ed). **Biodegradation - Life of Science**, (Ed.). InTech, 2013, cap. 10, p. 251-287. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/biodegradation-life-of-science/pesticide-biodegradation-mechanisms-genetics-and-strategies-to-enhance-the-process>. Acesso em: 02 jul.2013.

OUTI, Y.; CORTESE, P.; SANTINONI, L.; PALMA, L.; AGOSTINI, J.; PREUSLER, C.; GASTAMINZA, G.; PEREZ, G.; DOMINGUEZ, E. HLB in Argentina: a New Disease Outbreak. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING (HLB) IRCHLB, 3., 2013. Orlando, Florida USA **Proceedings...**, Orlando, Florida, Feb. 4-8, 2013. p. 1 - 197

PADULLA, L.F.L.; ALVES, S.B. Suscetibilidade de ninfas de *Diaphorina citri* a fungos entomopatogênicos. Comunicação Científica. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 2, p. 297-302, 2009.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 37, p. 3-22, 2012.

PARK, H.W.; PINO, B.C.; KOZERVANICH-CHONG, S.; HAFKENSCHIED, E.A.; OLIVERIO, R.M.; FEDERICI, B.A.; BIDESHI, D.K. Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Enhances Mosquitocidal Activity of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 Against *Aedes aegypti* but not *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 23, n. 1, p. 88-91, 2013.

PARRA, J.R.P.; LOPES, J.R.S.; TORRES, M.L.G.; NAVA, D.E.; PAIVA, P.E.B. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao *Huanglongbing*. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 37-51, 2010.

PELZ-STELINSKI, K.S.; BRLANSKY, R.H.; EBERT, T.A.; ROGERS, M.E. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian citrus psyllid Hemiptera: Psyllidae. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 103, p. 1531–1541, 2010.

PEREIRA, E. da S. **Obtenção de novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* Berliner patogênicas a larvas de Simuliidae e caracterização molecular de populações de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar (Diptera: Simuliidae) no Brasil.** 2011. 175p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade de Brasília –UNB, Brasília, 2011.

PEREIRA, E.; TELES, B.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.; SANTOS, A.; RAMOS, F.; BERRY, C.; MONNERAT, R. Comparative Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner Strains to Larvae of Simuliidae (Insecta: Diptera). **Bt Research**, Columbia, v. 4, n. 2, p. 8-13, 2013.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma Breve Revisão. **Agrociência**, Pelotas, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2003.

PORCAR, M.; GRENIER, A.M.; FEDERICI, B.; RAHBÉ, Y. Effects of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxins on the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 4897-4900, 2009.

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

PRAÇA, L.B.; MARTINS, E.S.; SILVA, F.A. DA. **Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias de Invertebrados.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 22p. - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 102 - 110; 332).

PRAÇA, L.B.; SOARES, C.M.; MELATTI, V.M.; MONNERAT, R.G. ***Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae): aspectos gerais, modo de ação e utilização** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 40p. - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 102 - 110; 239).

POLLI, A.; DAS NEVES, A.F.; GALO, F.R.; GAZARINI, J.; RHODEN, S.A.; PAMPHILE, J.A. 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**, Campo Mourão, v. 7, n. 2, p. 82-89, 2012.

POOPATHI, S.; MANI, C.; RAJESWARI, G. Potential of sugarcane bagasse (agro-industrial waste) for the production of *Bacillus thuringiensis israelensis*. **Tropical Biomedicine**, Kuala Lumpur, v. 30, n. 3, p. 504-515, 2013.

RAYMOND, B.; ELLIOT, S.L.; ELLIS, R.J. Quantifying the reproduction of *Bacillus thuringiensis* HD1 in cadavers and live larvae of *Plutella xylostella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 98, p. 307–313, 2008.

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

ROSSI, J.R. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SPS1: **Caracterização da região promotora de genes *cry* e efeito em larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae).** 2007. 93p. Dissertação (Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) -

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2007.

SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R.M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 9, p. 283–300, 2011.

SANSINENEA, E.; ORTIZ, A. An Antibiotic from *Bacillus thuringiensis* against Gram-Negative Bacteria. **Biochemical Pharmacology**, Netherlands, v. 2, p.e142, 2013. doi:10.4172/2167-0501.1000e142

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and pesticidal crystals proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n3, p. 775-806, 1998.

SHAN, G.; EMBREY, S.K.; HERMAN, R.A.; MCCORMICK, R. Cry1F Protein Not Detected in Soil After Three Years of Transgenic *Bt* Corn (1507 Corn) use. **Environmental Entomology**, College Park, v. 37, n. 1, p. 255-262, 2008.

SILVA, NAJARA DA. **Caracterização e seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Sitophilus oryzae* L., 1763**. 2008. 40p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2008.

SIRVARIG. Disponível em:< <http://www.sirvarig.com.br/jornal/jornal-rural-edicao-23.pdf>>. Acesso em: 07 nov. 2013

SOSA-GÓMEZ, D.R.; TIGANO, M.S.; ARANTES, O.M.N. Caracterização de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 22, p. 731-758.

SUTTON, B.; DUAN, Y.; HALBERT, S.; SUN, X.; SCHUBERT, T.; DIXON, W. Detection and identification of citrus huanglongbing (greening) in Florida, USA. GOTTWALD T.R.(Ed.). In: INTERNATIONAL CITRUS CANCER AND HUANGLONGBING RESEARCH WORKSHOP, 2., 2005. Orlando. **Proceedings...**7-11 Nov. 2005; Dixon WN: Graham JH, Berger P. Florida: **Citrus Mutual**; 2005.

SUZUKI, M.T.; LERECLUS, D.; ARANTES, O.M.N. Fate of *Bacillus thuringiensis* strains in different insect larvae. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 50, p. 973–975, 2004.

SUZUKI, M.T.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.S.; ARAÚJO, W.L.; FERRÉ, J. Characterization of an endophytic *Bacillus thuringiensis* strain isolated from sugar cane. **In Proceedings of 41st Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and 9th International Conference on *Bacillus thuringiensis***, University of Warwick, Coventry, UK, 3-7 August 2008.

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

TABASHNIK, B.E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, p. 510–521, 2013.

TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.A.; LOPES, S.A.; YAMAMOTO, P.T.; MIRANDA, M.P.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JÚNIOR, J.; BASSANEZI, R.B. Caracterização e etiologia das bactérias associadas ao *Huanglongbing*. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 2, p.115-128, 2010.

TEIXEIRA, D.C.; AYRES, A.J.; KITAJIMA, E.W.; TANAKA, F.A.O.; DANET, J.L.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. 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**, Saint Paul v. 89, n.1, p. 107, 2005.

TIWARI, S.; CLAYSON, P.J.; KUHNS, E.H.; STELINSKI, L.L. Effects of buprofezin and diflubenzuron on various developmental stages of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 68, p. 1405-1412, 2012.

TREMILIOSI, L.M.M.; NEVES, M.DEC.; VIEIRA, V.C.; BERGAMASCO, V.B.; POLANCZYK, R.A.; LEMOS M.V.F. Caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* ativos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Científica**, Jaboticabal, v. 36, n. 2, p. 86-96, 2008.

VALADARES-INGLIS, M.C.C.; SHILER, W.; DE-SOUZA, M.T. Engenharia Genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 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. Persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in Urban Environments following Spraying. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 22, p. 7954-7961, 2011.

VITELLI-FLORES, J.; GAJARDO, R.; LAGE, L.; FAJARDO, Y.; DORTA, B.; VIDAL RODRÍGUEZ, L. Aislamiento y caracterización molecular, ribotipificación, de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas en suelos y larvas muertas de *Hylesia metabus* en la región nororiental de Venezuela. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, Caracas, v. 30, p. 90-96, 2010.

VIDAL-QUIST, J.C.; CASTAÑERA, P.; GONZÁLEZ-CABRERA, J. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from Citrus Orchards in Spain and Evaluation of Their Insecticidal Activity Against *Ceratitis capitata*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 19, n. 8, p. 749-759, 2009.

VIDAL-QUIST, J.C.; ROGERS, H.J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; BERRY, C. *Bacillus thuringiensis* colonises plant roots in a phylogeny-dependent manner. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, 2013, doi: 10.1111/1574-6941.12175.

VILAS-BÔAS, G.T.; ALVAREZ, R.C.; SANTOS, C.A. dos; VILAS-BOAS, L.A. Fatores de Virulência de *Bacillus thuringiensis* Berliner: O Que Existe Além das Proteínas Cry? **EntomoBrasilis**, Vassouras, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2012.

WANG, N.; TRIVEDI, P. Citrus huanglongbing: A newly relevant disease presents unprecedented challenges. **Phytopathology**, Ithaca, v. 103, p. 652-665, 2013.

WEISER, J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Ssoviet Union. In: Krieg, A. ; Huger, A. M. **Mitteilungen aus der Biologischen 46 Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem Heft**, 233, p. 37-50, Paul Parey, Berlim. 1986

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**, Cidade Universitária, São Paulo, v. 4, n. 4, p. 1-9, 2009.

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

ZAHN, D.K. e MORSE, J.G. Investigating Alternatives to Traditional Insecticides: Effectiveness of Entomopathogenic Fungi and *Bacillus thuringiensis* Against Citrus Thrips and Avocado Thrips (Thysanoptera: Thripidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 106, n. 1, p. 64-72, 2013.

ZEINAT, K.M.; MOHAMED, A.A.; NASHWA, A.F.; SHERIF, M.E. Isolation and molecular characterization of malathion degrading bacterial strains from waste water in Egypt. **Journal of Advanced Research**, Cairo, v. 1, p. 145-149, 2010.

ZHANG, W.; JIANG, F.; FENG OU, J. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, Wanchai, v. 1, n. 2, p. 125-144, 2011.

ZHOU, X.Y.; LIU, H.F.; LU, X.Z.; HAO, J.C.; SHI, L.L.; HU, Q. Effect of Zn on the adsorption and desorption of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* on clay minerals. **Clay Minerals**, London, v. 48, p. 605-612, 2013.

ZURBRÜGG, C.; HÖNEMANN, L.; MEISSLE, M.; ROMEIS, J.; NENTWIG, W. Decomposition dynamics and structural plant components of genetically modified Bt maize leaves do not differ from leaves of conventional hybrids. **Transgenic Research**, London, v. 19, p. 257-267, 2010.