



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

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* TÓXICAS AO PULGÃO DO ALGODOEIRO (*Aphis gossypii*)

Viviane Montagner Melatti

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/ 2008**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* TÓXICAS AO PULGÃO
DO ALGODOEIRO (*Aphis gossypii*)**

VIVIANE MONTAGNER MELATTI

ORIENTADORA: ROSE GOMES MONNERAT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PUBLICAÇÃO:

BRASÍLIA/ DF
FEVEREIRO/ 2008

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

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* TÓXICAS AO PULGÃO
DO ALGODOEIRO (*Aphis gossypii*)**

VIVIANE MONTAGNER MELATTI

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

APROVADA POR:

**Rose G. Monnerat, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Orientadora)**

CPF: 51280370106

E-mail: rose@cenargen.embrapa.br

**Jean Kleber A. Mattos, PhD, Universidade de Brasília- UnB
(Examinador interno)**

CPF: 002288181-06

E-mail: Kleber@unb.br

**Edison R. Sujii, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Examinador externo)**

CPF: 15359948191

E-mail: sujii@cenargen.embrapa.br

BRASÍLIA/DF, 28 de FEVEREIRO de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Melatti, Viviane Montagner

Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas Ao pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*). / Viviane Montagner Melatti; orientação de Rose G. Monnerat – Brasília, 2008.

101 p.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

1. *Bacillus thuringiensis*. 2. *Aphis gossypii*. 3. Cultura do algodão
I. Monnerat, R. G. II. PhD.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

MELATTI, V. M. **Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*)**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 105 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Viviane Montagner Melatti

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*).

GRAU: Mestre ANO: 2008

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

Viviane Montagner Melatti

CPF: 573599381-04

E-mail: vivimelatti@gmail.com

Aos meus Pais,

*Por estarem do meu lado quando eu achei
que dava conta sozinha...*

*Esse carinho me completa e me enche de
felicidade todos os dias.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por iluminar meus passos e sempre indicar o caminho certo a ser seguido;

À minha Orientadora, Dr^a **Rose Monnerat**, pela oportunidade, compreensão e orientação deste trabalho;

Ao Dr. **Edison Sujii** pelo auxílio durante o desenvolvimento de minha dissertação e a Dr^a **Joseilde**;

Aos meus pais, **Júlio e Delvair**, pelo amor, apoio e estímulo intelectual;

À minha irmã, **Lisiane**, pelo carinho, estando do meu lado quando precisei de seu apoio;

Ao meu **afilhado Rafael**, pelo seu amor puro que sua Dindaaá ama tanto e a minha **sobrinha Júlia**, pelo que a sua chegada representa para todos;

À **Tia Sonia** e **Tia Jussara**, que sem nenhum receio, acreditaram no meu sucesso, e de maneira muito especial, a toda minha família;

Ao **Thiago**, pelo seu amor e dedicação, e acima de tudo, por sua paciência durante estes dois anos de estudo;

Às minhas amigas, **Andréa, Gabriela, Leda, Aline, Tatiana, Danyelle, Camilla, Caroline Rayol, Roberta e Ludmilla** por essa amizade repleta de carinho, compaixão e muita alegria; e pela compreensão todas vocês nos momentos de ausência;

À todos do Laboratório de Bacteriologia e da Criação de insetos, **Felipe Wagner, Rafael, Paula, Dr. Paulo, Raiane, Guilherme, Raissa, Natália, Elias, Cláudia Brod, Elizangêla e Hélio**, todos vocês me ajudaram a concluir esta etapa de um modo muito especial;

De maneira especial a **Lílian, Érica, Vinícius, Carolina Ramiro e Felipe Ramos** pelo companheirismo e diversos ensinamentos compartilhados, e por serem acima de tudo, amigos tão maravilhosos;

A todos que torceram por mim e assim, me deram força para concluir mais uma etapa da minha vida.

Obrigada.

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| RESUMO | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 01 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 03 |
| 2.1. Cultura do Algodão (<i>Gossypium spp.</i>) | 03 |
| 2.1.1. Aspectos gerais | 03 |
| 2.1.2. Algodão transgênico | 06 |
| 2.1.3. Importância econômica do algodão | 09 |
| 2.1.4. Pragas da cultura do algodão | 12 |
| 2.2. <i>Aphis gossypii</i> Glover, 1877 | 14 |
| 2.2.1. Aspectos gerais | 14 |
| 2.2.2. Bioecologia de <i>A. gossypii</i> | 16 |
| 2.2.3. Danos | 18 |
| 2.2.4. Métodos de controle | 21 |
| 2.2.4.1. Controle cultural | 22 |
| 2.2.4.2. Controle físico | 24 |
| 2.2.4.3. Controle químico | 24 |
| 2.2.4.4. Controle biológico | 27 |
| 2.3. Bactérias Entomopatogênicas | 29 |
| 2.3.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> | 30 |
| 2.3.1.1 Aspectos gerais | 30 |
| 2.3.1.2. Toxinas produzidas pelo <i>B. thuringiensis</i> | 33 |
| 2.3.1.2.1. α -exotoxinas | 33 |
| 2.3.1.2.2. β -exotoxinas | 34 |
| 2.3.1.2.3. Vip 3A | 34 |
| 2.3.1.2.4. δ -endotoxinas | 35 |
| 2.3.1.3. Estrutura tridimensional das proteínas Cry | 37 |
| 2.3.1.4. Mecanismo de ação das proteínas Cry | 39 |
| 2.3.2. Bactérias Endofíticas | 43 |
| 3. OBJETIVOS | 46 |

CAPÍTULO ÚNICO

Metodologia de Bioensaio, Seleção e Caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Aphis gossypii*

| | |
|---|----|
| RESUMO | 58 |
| ABSTRACT | 59 |
| 1. INTRODUÇÃO | 60 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 62 |
| 2.1. Criação massal de <i>A. gossypii</i> | 62 |
| 2.1.1. Coleta e manutenção da colônia de <i>A. gossypii</i> | 62 |
| 2.2. Seleção das estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i> | 65 |
| 2.3. Caracterização morfológica | 65 |
| 2.4. Determinação da patogenicidade | 65 |
| 2.4.1. Bioensaios Seletivos | 66 |
| 2.4.1.1. Validação da metodologia proposta | 68 |
| 2.4.2. Bioensaios de Dose | 69 |
| 2.4.2.1. Purificação de proteína através de gradiente de sacarose | 70 |
| 2.4.2.2. Desenvolvimento do bioensaio de dose | 72 |
| 2.5. Caracterização bioquímica | 74 |
| 2.6. Caracterização molecular | 75 |
| 2.7. Caracterização ultra-estrutural | 78 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 80 |
| 3.1. Caracterização morfológica | 80 |
| 3.2. Determinação da toxicidade | 81 |
| 3.2.1 Validação da metodologia proposta | 81 |
| 3.2.2. Bioensaios Seletivos | 83 |
| 3.2.3. Bioensaios de Dose | 86 |
| 3.3. Caracterização bioquímica | 90 |
| 3.4. Caracterização molecular | 93 |
| 3.5. Caracterização ultra-estrutural | 96 |

| | |
|-------------------------------|-----|
| 4. CONCLUSÕES | 98 |
| 5. PERSPECTIVAS FUTURAS | 99 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 100 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Comparação das Safras de 2006 e 2007. | 10 |
| Tabela 2. Inseticidas recomendados para o controle de pulgões (Gallo <i>et al.</i> , 2002). | 26 |
| Tabela 3. Diluições utilizadas nos bioensaios de dose. | 72 |
| Tabela 4. Características dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR | 76 |
| Tabela 5. Resultados de mortalidade das estirpes que causaram mortalidade igual ou acima de 20%. | 85 |
| Tabela 6. Resultados dos bioensaios de dose, em duplicata, contra <i>Aphis gossypii</i> . Sendo n: número total de indivíduos testados e CL ₅₀ concentração letal para 50% da população. | 88 |
| Tabela 7. Perfil protéico das estirpes selecionadas nos bioensaios seletivos. | 91 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. A. Plantação de Algodão (<i>G. hirsutum</i>); B. Botão floral do algodão; C. Capulho do algodão. | 03 |
| Figura 2. Colônias de <i>A. gossypii</i> atacando uma folha de algodão | 13 |
| Figura 3. Adultos e ninfas de <i>A. gossypii</i> . | 15 |
| Figura 4. Forma alada do <i>A. gossypii</i> . Foto: P. M. Choate. | 17 |
| Figura 5. Danos causados pelo ataque do pulgão do algodoeiro. A. Dano direto: encarquilhamento dos brotos. B. Dano indireto: sintomas da virose mosaico das nervuras (Santos, 1999). | 19 |
| Figura 6. Estrutura das proteínas Cry. A. Demonstração do tamanho relativo de algumas protoxinas e dos seus cinco blocos conservados. B. Estrutura tridimensional dos domínios da toxina ativada Cry1Aa. Domínio I em azul, II em vermelho e III em verde (Maagd <i>et al.</i> , 2001). | 38 |
| Figura 7. Receptores moleculares da proteína Cry1A (Bravo <i>et al.</i> , 2006). | 41 |
| Figura 8. Modo de ação das toxinas de <i>B. thuringiensis</i> no intestino para <i>Aphis gossypii</i> (de Maagd <i>et al.</i> , 2001). | 42 |
| Figura 9. Acomodação dos potes com agar na colônia de pulgão. | 64 |
| Figura 10. Pote de vidro preparado com a solução de bactéria e a água, acomodado com a folha de algodão. | 67 |
| Figura 11. Acomodação do bioensaio para a colocação dos insetos e vedação com tampa de plástico. | 68 |
| Figura 12. Microscopia de contraste de fase da estirpe de <i>B. thuringiensis</i> S1576. Sendo ep: esporos. | 80 |
| Figura 13. Observação das células de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> com o gene <i>gfp</i> através de microscopia de fluorescência, em aumento de 12.000X. | |

- A.** Observação das células sem fluorescência; **B.** Observação das células com fluorescência. Foto: Felipe Ramos. 82
- Figura 14.** *A. gossypii* com infecção característica por *B. thuringiensis*, encontrado no bioensaio de dose com a estirpe S616. Foto: Felipe Ramos. 90
- Figura 15.** Análise das proteínas das estirpes que obtiveram mortalidade igual ou acima a 50%, em gel SDS-PAGE corado com Comassie Blue. Sendo M: marcador de peso molecular, 1: S29; 2: S1168; 3: S616; 4: S40; e 5: S1576. 92
- Figura 16.** Análise do gene *cry8* da estirpe S616, em gel de agarose 1,5%. Sendo M: Marcador; 1: controle negativo; e 2: S616. 94
- Figura 17.** Análise dos genes *cryIAa*, *cryID* e *cry2* da estirpe S1576, em gel de agarose 1,5%. Sendo M: Marcador; 1: controle negativo; 2: Controle positivo (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* - Btk); e 3: S1576. 95
- Figura 18.** Microscopia eletrônica de varredura das proteínas purificadas de *B. thuringiensis* S29 (A), S40 (B), S616 (C), S1168 (D) e S1576 (E). Sendo ce: cristal esférico, cb: cristal bipiramidal, ep: esporo. 97

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

| | |
|-------------------|---|
| °C | Graus celsius |
| BBMV _s | Proteínas da borda da membrana intestinal |
| CL ₅₀ | Concentração letal para matar 50% da população testada |
| kDa | Quilodaltons |
| M | Molar |
| mL | Mililitros |
| mM | Milimolar |
| nm | Nanômetros |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reação em cadeia polimerase |
| rpm | Rotações por minutos |
| SDS-PAGE | Eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida |
| UV | Raios ultravioletas |
| V | Volts |
| W | Watts |
| μL | Microlitros |

RESUMO GERAL

Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*)

O crescimento da produção de algodão expõe esta cultura ao ataque severo de diversas pragas, entre elas o pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*). Este inseto tem causado até 44% de perdas à cultura do algodão, atacando principalmente os estágios iniciais da cultura. Devido à sucção contínua da seiva ocorre a deformação dos brotos, prejuízo ao desenvolvimento da planta e ainda, excreção de uma secreção açucarada (“honeydew”) com associação simbiótica com formigas e favorece o surgimento da fumagina. O *A. gossypii* pode causar danos indiretos através da transmissão de doenças viróticas como o vermelhão e o mosaico das nervuras (“azulão”). O controle desta praga pelo uso intensivo de inseticidas químicos pode causar o desequilíbrio do meio ambiente, atuando sobre os inimigos naturais e selecionando populações resistentes. Com isso, o controle biológico surge como uma alternativa para o controle dessa praga. *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram positiva, que produz inclusões protéicas, conhecidas como δ -endotoxinas, que apresentam atividade tóxica a algumas ordens de insetos. Esta bactéria apresenta potencial para ser utilizada para o controle de insetos sugadores através da sua utilização sistêmica ou com o uso de plantas geneticamente modificadas com genes *cry* ativos ao inseto-alvo. Estirpes do Banco de Germoplasma de *Bacillus* sp. da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram testadas contra *A. gossypii* através de bioensaio seletivo, das quais foram selecionadas as estirpes S29, S40, S616, S1168 e S1576 que apresentaram mortalidade superior a 50%. As cinco estirpes selecionadas foram caracterizadas quanto ao perfil protéico, que variou de 50 a 130kDa, e ao perfil molecular, sendo algumas delas positivas para a presença dos genes *cryIAa*, *cryID*, *cry2* e *cry8*. Na caracterização através da microscopia eletrônica de varredura, cristais esféricos e bipiramidais foram observados em grande parte nas estirpes testadas.

Palavras chaves: Bactéria entomopatogênica, bioensaios, cotonicultura e controle biológico.

ABSTRACT

Screening of *Bacillus thuringiensis* strains toxic to the cotton aphid (*Aphis gossypii*)

The production of the cotton crop is growing and exposes this culture to severe attack of various pests, including the cotton aphid (*Aphis gossypii*). This insect has caused 44% loss to the culture of cotton, attacking the initial stages of the crop. The continuous sucking sap deforms the shoots, hampers the development of the plant and also expels a sugar secretion ("honeydew") that has symbiotic association with ants and favors the emergence of fumagina. *A. gossypii* can cause indirect damage through the transmission of virotic diseases such as "vermelhão" and mosaic of ribs ("azulão"). The control of this pest by the intensive use of chemical insecticides can cause the imbalance of the environment, acting on the natural enemies and selecting resistant populations. Thus, the biological control emerges as an alternative for the control of this pest. *Bacillus thuringiensis* is a Gram positive bacterium, which produces protein inclusions, known as δ -endotoxins, which have toxic activity to some orders of insects. This bacterium has the potential to be used for the control of sucker insects by the systemic use or using genetically modified plants with *cry* genes active to the target insect. Strains of the Bank of Germplasm of *Bacillus spp.* of Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia were tested against *A. gossypii* by selective bioassay which were selected the strains S29, S40, S616, S1168 and S1576 that showed more than 50% of mortality. The five selected strains were characterized by protein profile, which ranged from 50 to 130 kDa, and by molecular profile, where some of them were positive for the presence of genes *cry1Aa*, *cry1D*, *cry2* and *cry8*. The characterization by electronic microscopy round and bipiramidal crystals were seen in the most strains tested.

Key words: Entomopatogenic bacterium, bioassay, cotton crop and biological control.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A perda da produtividade agrícola devido ao ataque de insetos pode ser devastadora. Estima-se que, mundialmente, 15% das perdas de produção ocorrem devido a esses ataques (Braum *et al.*, 1991).

Com o aumento da população e das exportações brasileiras, a demanda de consumo de alguns produtos agrícolas, vem sofrendo um contínuo aumento, como é o caso do algodão no Brasil. Este deve dobrar seu volume de exportação de algodão, passando de 283,0 mil toneladas exportadas na safra 2006/07 para aproximadamente 586,0 mil toneladas em 2007/08. Deste modo, o país deverá ocupar a quarta posição em relação aos maiores países exportadores, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, Uzbequistão e Índia (Algodão Brasileiro, 2007).

O crescimento sustentável da produção de produtos agrícolas exigem alternativas menos agressivas para o controle de insetos-pragas, que estejam dentro de um programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP) reduzindo o efeito de inseticidas químicos no homem e no meio ambiente.

O pulgão, *Aphis gossypii*, é uma praga que ocorre nos primeiros estágios de desenvolvimento do algodão, logo após a germinação até a abertura dos capulhos de algodão, podendo reduzir em até 44% a produção. Esta praga causa deformação dos brotos, prejudicando seu desenvolvimento e apresenta simbiose com formigas que são atraídas por sua excreção açucarada, que em troca protege os pulgões de seus inimigos naturais. Favorecem, ainda, o desenvolvimento da fumagina e de duas viroses conhecidas como “vermelhão” e “azulão”, sendo esta mais severa (Gallo *et al.*, 2002).

O controle de *A. gossypii* através do uso intensivo de inseticidas químicos vem causando desequilíbrio do meio ambiente, atuando sobre os inimigos naturais e

selecionando populações resistentes. Neste contexto, o controle biológico surge como uma alternativa viável para o controle dessa praga.

Dentre os agentes de controle biológico, a espécie mais utilizada como princípio ativo de bioinseticidas é a bactéria *Bacillus thuringiensis*, por ser específica ao inseto-alvo e inócua ao homem e ao meio ambiente. Monnerat *et al.* (2003) demonstraram que esta bactéria é capaz de circular no interior de plantas de algodão e couve, podendo ser considerada uma ferramenta importante para o controle de insetos sugadores como o *A. gossypii*.

B. thuringiensis é uma bactéria caracterizada pela presença de cristais protéicos que são tóxicos para algumas espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera (de Maagd *et al.*, 2001) e certas espécies de nematóides (Griffitts & Aroian, 2005).

Milhares de estirpes *B. thuringiensis* estão armazenadas em coleções por todo o mundo. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, desde 1988, vêm armazenando estas estirpes para testes de caracterização e de patogenicidade contra diferentes insetos-pragas. Hoje, o banco de Germoplasma de *Bacillus* Entomopatogênicos da Embrapa possui aproximadamente 2.500 estirpes.

A seleção e caracterização de estirpes de *B. thuringiensis* que sejam ativas a pragas de ordens que ainda não são controlados por esta bactéria como, por exemplo, o pulgão do algodoeiro (Hemiptera: Aphididae), é importante para expandir a utilização desta bactéria na agricultura brasileira.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cultura do Algodão (*Gossypim spp.*)

2.1.1. Aspectos gerais

O algodão é uma planta da família das Malvaceae, pertencente ao gênero *Gossypium spp.* (Figura 1). Quando nativos da região, os arbustos do algodoeiro podem atingir até sete metros de altura. Suas folhas são grandes, com três, cinco ou até sete lobos. As sementes estão contidas em uma cápsula, envolvida por fibras (Diaz, 1993).



Figura 1. Algodão da espécie *Gossypium hirsutum*. **A.** Plantação de Algodão; **B.** Botão floral do algodão; **C.** Capulho do algodão.

A produção de algodão em nível econômico requer um período de cultivo de 180 a 200 dias, predominantemente ensolarado, com temperatura média acima de 20°C,

sendo sua temperatura ótima em torno de 25°C. O excesso de chuvas é um fator limitante para a produtividade do algodoeiro (Messias & Passos, 1977).

Atualmente são cultivados no mundo dois tipos diferentes de algodão: o arbóreo e o herbáceo. O algodão arbóreo (*G. hirsutum* L.r. *marie galante* Hutch) tem tamanho mediano e seu cultivo é permanente. Já a espécie herbácea (*G. hirsutum* L.r. *latifolium* Hutch) é um arbusto de cultivo anual. Existem aproximadamente 50 espécies descritas, do gênero *Gossypium*, nativas das regiões tropicais e subtropicais, onde 17 são endêmicas da Austrália, seis do Havaí e uma no nordeste brasileiro. Algumas espécies são conhecidas como “algodoeiras” e são utilizadas para a produção de fibras têxtil, sendo esta a fibra muito utilizada pelo homem. As espécies mais utilizadas são *Gossypium arboreum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium herbaceum* e *G. hirsutum*. No entanto, cerca de 90% das fibras de algodão comercializadas no mundo são provenientes da espécie *G. hirsutum* (Algodão Brasileiro, 2007). *G. hirsutum* possui maior adaptabilidade, alta produtividade e é predominante no mundo. Já *G. barbadense* é importante pela sua qualidade e comprimento da fibra e é usado na produção de tecidos finos.

Os algodoeiros podem ser agrupados em dois arquétipos, dispostos segundo a origem geográfica, o número de cromossomos e suas espécies. Os algodoeiros asiáticos, também conhecidos como “algodoeiros do velho mundo”, possuem 13 cromossomos na fase aplóide e suas espécies são o *G. arboreum* e *G. herbaceum*. Já os algodoeiros americanos, conhecidos como “algodoeiros do novo mundo”, possuem 26 cromossomos na fase aplóide e suas espécies são *G. hirsutum* e *G. barbadense* (Messias & Passos, 1977).

Dentre as variedades utilizadas no Brasil podemos citar a Delta Opal. Esta é caracterizada por ser herbácea, com ciclo tardio e folhas pequenas. Pode chegar a 179

em de altura e possuir um alto rendimento de fibras. È uma variedade altamente produtiva para as condições de cerrado, podendo alcançar uma produção de até 389@/ha (Embrapa Algodão, 2003).

O Brasil exerce um papel importante no cenário mundial como país produtor de artigos têxteis, posicionando-se em 6º lugar na produção de fios, filamentos e tecidos planos, em 2º lugar no que se refere aos tecidos de malha e em 5º, em confeccionados. Entretanto, em termos de comércio internacional, a presença do Brasil ainda é pequena, estando apenas entre os 35 maiores exportadores e 31 maiores importadores de têxteis do mundo, o que lhe confere um papel secundário no mercado (Algodão Brasileiro, 2007).

Uma parcela das sementes é selecionada para o plantio da safra seguinte, a outra parcela serve de matéria-prima para vários ramos industriais. A semente do algodão é composta por três partes, o línter, a casca e a amêndoa. O línter utiliza-se para a confecção de estofamentos, algodão absorvente (hidrófilo), fabricação de filtros, mechas para lâmpadas e velas, entre outras. A casca é aproveitada na elaboração de rações e adubos. Já da amêndoa utiliza-se o óleo (Messias & Passos, 1977). O algodão é praticamente todo aproveitado, pois a fibra é utilizada na produção de fibras têxteis, a semente como complemento de ração animal e o óleo extraído da semente para o consumo humano.

Em cada semente de algodão existem milhares de fibras, variando seu número de acordo com as espécies, onde as variedades americanas apresentam de 8.000 a 14.000 e as variedades indianas de 3.600 a 9.000 (Messias & Passos, 1977).

A fibra do algodão contém 94% de sua composição de celulose e 6% de cera, gomas, pectinas e óleos. A celulose é responsável pelas características das fibras e a

cera pelo controle de absorção de água pela fibra e age como lubrificante entre as fibras (Díaz, 1993).

2.1.2. Algodão transgênico

Uma planta geneticamente modificada ou transgênica caracteriza-se por conter um ou mais genes inseridos artificialmente por meio da tecnologia do DNA recombinante. O gene inserido, "transgene", pode ser de outra planta ou mesmo de outra espécie completamente diferente (Fernandes, 2006).

A primeira experiência em engenharia genética aconteceu em 1973 e somente cerca de 10 anos depois se obteve a primeira planta transgênica, o tabaco GM, em 1983. Entretanto, a primeira variedade liberada para comércio foi o tomate Flavr Savr, em 1994 nos Estados Unidos (Fernandes, 2006).

Através desta nova biotecnologia, métodos eficientes de controle de pragas foram obtidos, como as plantas resistentes a insetos-pragas, por exemplo, as plantas Bt. Genes de *Bacillus thuringiensis*, uma bactéria de solo, gram-positiva, capaz de formar cristais protéicos com ação tóxica a alguns insetos, foram introduzidos em plantas de milho e algodão conferindo resistência das plantas a algumas espécies de lepidópteros. Outras culturas já foram transformadas com genes desta bactéria como no arroz, batata, fumo e tomate (Gallo *et al.* 2002).

Esta tecnologia de algodão e milho transgênicos foi lançada comercialmente nos Estados Unidos em 1995 e 1996, respectivamente. O algodão resistente a insetos vem sendo utilizado na Argentina, México, China, África, Austrália, Índia, Filipinas e Europa. Na safra de 2005/2006, 21 países já utilizavam plantas geneticamente

modificadas, em uma área de 90 milhões de hectares (Sivasupramaniam *et al.*, 2007; James, 2005).

O desenvolvimento de plantas transgênicas que produzem proteínas Cry vem sendo utilizada extensivamente para a substituição de agrotóxicos. Nestas plantas, as proteínas Cry são produzidas continuamente, protegida da degradação e assim, mantendo-a ativa contra insetos alvos (Bravo *et al.*, 2006).

O algodão Bollgard® evento 531, também conhecido como Ingard®, produzido pela empresa Monsanto, resiste às principais pragas da Ordem Lepidoptera que afetam a cultura do algodão no Brasil, como o curuquerê-do-algodão (*Alabama argillacea*), a lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*) e a lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens*). O algodão Bollgard foi geneticamente modificado a partir da transformação da variedade comercial Coker 312, por meio do sistema mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. A transformação inseriu os genes *nptII*, *aad*, e o gene *cryIAc* que é proveniente de *B. thuringiensis*, no genoma dessa variedade de algodão (CTNBio, 2007).

O algodão Bollgard® foi substituído pelo Bollgard®II, que expressa os genes *cryIAc* e *cry2Ab* também de *B. thuringiensis*. Esta mudança foi realizada visando aumentar a eficiência da variedade, o número de espécies alvos (*Spodoptera exigua* e *S. frugiperda*) e evitar a possível resistência do inseto a um dos genes inseridos na variedade modificada do algodão (Downes, 2007; Sivasupramaniam *et al.*, 2007). Segundo Christou *et al.* (2006), modelos teóricos asseguram que plantas expressando dois tipos de toxinas são mais eficientes, existindo menor chance do inseto adquirir resistência às toxinas. Em um ensaio realizado com lagartas rosadas (*P. gossypiella*) resistentes a *cryIAc*, demonstrou-se que poucas lagartas sobreviveram em plantas expressando *cryIAc* e *cry2Ab* (Tabashnik *et al.*, 2002).

Novos avanços são esperados com os novos transgênicos, como o WideStrike® da Dow AgroSciences e o VipCot® da Syngenta, já sendo avaliados na Austrália (Algodão Brasileiro, 2007). O WideStrike® é resistente a lepidópteros, expressa as proteínas Cry1F e Cry1Ac do *B. thuringiensis* nas plantas de algodão. Já o algodão VipCot® possui as proteínas Vip3A e Cry1Ab, sendo este algodão também resistente a lepidópteros, principalmente as espécies *Helicoverpa zea* e *H. virescens*. Cientistas da Syngenta acreditam que a Vip3A é diferente estruturalmente de todas as proteínas Cry e, conseqüentemente, a resistência do inseto a ambos os genes seja improvável. Logo, se a resistência ocorrer a uma toxina, provavelmente não ocorrerá para a segunda. Por isso, os cientistas da Syngenta não utilizaram duas proteínas Cry na mesma variedade de algodão (Kurtz *et al.*, 2007).

Programas de monitoramento de resistência são implementados nos locais onde plantas Bt são comercializadas, usando abordagens e métodos que são padronizados em todo o mundo. Após quase 10 anos de uso do algodão transgênico em diversos países, até o momento, não há relatos do surgimento de resistência de pragas às toxinas de *B. thuringiensis* utilizadas nas plantas Bt, em nenhum dos programas de monitoramento (Sivasupramaniam *et al.*, 2007; CTNBio, 2007).

A redução do uso de inseticidas químicos promovida pelo uso de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos, trouxe enormes benefícios à indústria algodoeira. A redução do uso de inseticida na Índia foi de 70%, na Austrália de 85% e na China de 60 a 80%, ocorrendo uma redução de 78.000 toneladas neste último país. Além disso, foi demonstrado que esta redução provocou uma diminuição significativa no número de intoxicações de agricultores (Christou *et al.*, 2006; Fernandes, 2006; Downes *et al.*, 2007). Foi observada também a diminuição na taxa de exploração de matérias-primas utilizadas na fabricação de inseticidas, e por conseqüência, reduções

significativas na poluição provocada por rejeitos industriais. O algodão Bt se destaca ainda dos demais, ocupando 60% do algodão utilizado pela indústria têxtil na China (Chen *et al.* 2006).

Uma nova estratégia que vem otimizar a segurança das plantas transgênicas é o uso de promotores que induzam a expressão dos genes *cry* somente nas regiões da planta que são susceptíveis ao inseto alvo. Por exemplo, promotores específicos de floema para genes *cry* que codificam proteínas tóxicas a insetos sugadores de floema como o pulgão (Arantes *et al.*, 2002).

O mercado de transgênicos deverá crescer e novos estudos deverão enfatizar o controle de alguns insetos-praga que não são facilmente controlados através de inseticidas químicos ou que sejam resistentes a estes.

2.1.3. Importância econômica do algodão

Na década de 80, a produção de algodão no Brasil concentrava-se nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Neste período, a região Nordeste produzia sozinha uma parte significativa do algodão plantado no mundo, porém este quadro mudou com a introdução do bicudo do algodoeiro (*Antonomus grandis*) na região, que causou grandes perdas de produção (Fontes *et al.*, 2006).

A partir de 1997, a cultura do algodoeiro migrou das áreas tradicionalmente produtoras para o cerrado brasileiro, basicamente a região Centro-Oeste. Os produtores do Centro-Oeste viram no algodão uma grande oportunidade de negócios, bem como uma alternativa para rotação desta cultura com outras culturas economicamente importantes, como a soja. Hoje esta região responde por 84% da produção brasileira de algodão, sendo o estado de Mato Grosso o maior produtor brasileiro. Esta região, que

em 1990 cultivava 123.000 ha passou para 479.000 ha em 2002, correspondendo a 63% do total da área brasileira nesse ano (Embrapa Algodão, 2003; Pontes *et al.*, 2006).

O sucesso da cultura do algodoeiro no cerrado tem sido impulsionado pelas condições de clima favorável, terras planas, que permitem a mecanização da lavoura, pela existência de programas de incentivo à cultura implementada pelos estados da região centro-oeste e, sobretudo, pelo uso intensivo de tecnologias modernas.

As principais regiões produtoras de algodão do País atualmente são os Estados de Mato Grosso, Goiás, Bahia, Mato Grosso do Sul, Ceará, São Paulo, Minas Gerais e Paraná (CONAB, 2007).

O algodão é comercializado no Brasil de duas maneiras: em caroço e em pluma, quando a fibra é separada do caroço. A comercialização do algodão em caroço realiza-se em mercados primários e o algodão em pluma em mercados centrais. O mercado primário são as usinas e as cooperativas, já os centrais ficam nos grandes centros comerciais, onde se encontram os armazéns gerais, como em São Paulo (Messias & Passos, 1977).

Segundo o IBGE (2007), a safra de algodão herbáceo em caroço no Brasil em 2006 foi de 2.882.482 toneladas, sendo esperada uma safra de 3.760.379 t para o ano de 2007, provocando um aumento de 30,5% no rendimento médio da produção. No requisito área plantada e rendimento médio de produção, a safra de 2007 também apresentou um aumento significativo, de acordo com a tabela 1.

Tabela 1. Comparação das safras de 2006 e 2007.

| Algodão herbáceo | Safra 2006 | Safra 2007 | Variação (%) |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| Área (há) | 898.335 | 1.104.456 | 22,9 |
| Produção (t) | 2.882.482 | 3.760.379 | 30,5 |
| Rendimento Médio (kg/ha) | 3.209 | 3.405 | 6,1 |

FONTE: IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Setembro/2007.

O volume exportado de fibra de algodão entre o período de janeiro a agosto de 2007, foi de aproximadamente 140,4 mil toneladas, número superior verificado ao mesmo período do ano passado. As exportações para 2007/08 devem ser ainda maiores do que as verificadas nesta safra, aumentando cada vez mais a representatividade do Brasil nas exportações mundiais de fibra (Algodão Brasileiro, 2007).

Em nível mundial, a oferta de algodão em pluma alcançou 36,6 milhões de toneladas em 2005/06, com acréscimo de 2,5% em comparação com a safra anterior, sendo esta a maior quantidade das últimas safras. Apesar da intensificação do uso de algodão no mundo, a temporada de 2006 foi encerrada com uma queda de 3,4%, de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA (Barbosa, 2006).

A utilização de algodão na China cresceu nos últimos três anos alcançando 10,1 milhões de toneladas na safra de 2006, um acréscimo de 20,8% em comparação com a safra de 2005, caracterizando o país como o maior produtor e importador de algodão. Isto ocorre devido a insuficiência de sua produção frente a crescente demanda pela fibra. Barbosa (2006) destaca que no resto do mundo o consumo da fibra se mostra relativamente estável nos dois últimos anos. Demonstrando que o comportamento desse item no mundo deve-se, basicamente, à demanda chinesa.

O mercado chinês é o principal destino das exportações das fibras brasileiras, já que o total exportado para a China no ano de 2004 aumentou em 20% (CONAB, 2007). O consumo chinês em 2007/08 deverá atingir 11,6 milhões de toneladas, isto é, 41,9% de todo algodão utilizado no mundo (Algodão Brasileiro, 2007).

2.1.4. Pragas da cultura do algodão

Na cultura do algodoeiro existe um complexo de pragas que ocorrem sistematicamente, desde a emergência até a colheita, podendo reduzir a produção de algodão, caso não se tomem às medidas de controle necessárias a tempo. Sendo este, um grande desafio da agricultura sustentável.

A simples presença do inseto na cultura, não faz dele necessariamente uma praga. Este só deverá ser considerado praga, quando sua população atingir um nível populacional que cause prejuízo econômico. A presença de insetos em baixo nível favorece o crescimento populacional de inimigos naturais que atuam com eficiência sobre as pragas (Miranda, 2006).

Os danos causados por pragas é um dos principais fatores da baixa produtividade na cultura do algodão, onde pelo menos 30 espécies de insetos-pragas já foram identificados (Fontes *et al.*, 2006). São consideradas pragas iniciais da cultura o pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*) (Figura 2), os tripses (*Thrips tabaci* e *Frankliniella spp.*) e a mosca-branca (*Bemisia tabaci*). Estas pragas atacam a parte aérea do algodoeiro da emergência até próximo a emissão do primeiro botão floral. São insetos sugadores de seiva, transmissores de viroses que estão associados à presença da fumagina, que impedem a realização da fotossíntese. Verifica-se ainda a presença do percevejo-castanho (*Scaptocoris castanea*) no início do desenvolvimento do algodão associado às raízes da planta (Embrapa Algodão, 2007).



Figura 2. Colônias de *A. gossypii* atacando uma folha de algodão.

Geralmente, as lagartas dão início ao seu ataque, do meio para o final do desenvolvimento da cultura do algodão, porém podem ocorrer ataques a partir de 30 a 40 dias após a germinação. As espécies desfolhadoras mais comuns são o curuquerê do algodão (*Alabama argillace*), a lagarta militar (*Spodoptera frugiperda*) e a lagarta falsa-medideira (*Pseudoplusia includens*). Outras espécies de lagartas concentram seus ataques nos botões florais e nas maçãs das plantas, como a lagarta das maçãs (*Heliothis virescens*), a lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*) e a lagarta militar (*S. frugiperda*) (Fabretti & Costa, 1993; Embrapa Algodão, 2007).

Porém, a praga de maior importância econômica no Cerrado e em outras regiões é o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*). Seu ataque, no Cerrado, tem início na época de colheita do plantio regular (safra), no entanto, em outras áreas geralmente é encontrado na época da emissão dos primeiros botões florais. Outros insetos que tem sua ocorrência em locais e condições específicas são considerados pragas de menor importância econômica na cultura. Algumas delas são os ácaros branco (*Polyphagotarsonemus latus*) e rajado (*Tetranychus urticae*), os percevejos rajados (*Horcias nobliellus*) e manchador (*Dysdercus spp.*), e as brocas do algodoeiro

(*Eutinobothrus brasiliensis*) e do ponteiro (*Conotrachelus denieri*) (Miranda, 2006; Embrapa Algodão, 2007).

Doenças causadas por vírus, bactérias e fungos também tem um efeito significativo na perda da produtividade do algodão em algumas regiões do Brasil. Algumas destas doenças podem ser transmitidas pelas pragas acima citas, como o *Aphis gossypii*, que transmite a virose mosaico das nervuras para as plantas de algodão (Fontes *et al.*, 2006).

2.2. *Aphis gossypii* Glover, 1877

2.2.1. Aspectos gerais

O aumento da agricultura tem causado um certo desequilíbrio no meio ambiente, proporcionado alimento em abundância para os insetos, e com isso, tem favorecido um grande aumento de suas populações. No caso do algodoeiro, este aumento de pragas causa grandes perdas na produção de algodão, devido o rápido desenvolvimento de pragas, como o pulgão do algodoeiro.

Aphis gossypii (Figura 3), conhecido como pulgão do algodoeiro, é um inseto polífago, que ataca diversas culturas como cucurbitáceas (abóbora, melância, pepino), mamão, quiabo, berinjela, café, cacau, tomate, citrus, algumas plantas ornamentas (*Hibiscus ssp.*) e, principalmente, o algodão e o melão (Messias & Passos, 1977). Acredita-se que este inseto tenha aproximadamente 700 hospedeiros no mundo (Kessing & Mau, 1991).



Figura 3. Adultos e ninfas de *A. gossypii*.

Este inseto é cosmopolita, podendo ser encontrado na Austrália, Brasil, Havai, México, África do Sul, Índia, Europa e sul dos Estados Unidos. Sendo que na África é uma das maiores pragas que afeta a agricultura e na Europa, só sobrevive em casa de vegetação, devido à baixa temperatura (Kessing & Mau, 1991).

Os insetos se distribuem no algodoeiro de acordo com a disponibilidade de alimento. O pulgão é uma das primeiras pragas que ocorre no algodoeiro, podendo ser encontrado com maior frequência no algodão novo e em desenvolvimento. É um inseto sugador de seiva, que vive na parte abaxial das folhas e dos brotos novos das plantas.

O *A. gossypii* tem preferência por brotações apicais, onde existe maior concentração de nitrogênio assimilável no floema, fator importante para o desenvolvimento desta praga (Santos, 1999; Fabretti & Costa, 1993). Nevo & Coll (2001) demonstraram que os pulgões que se alimentam de plantas com fertilização nitrogenada são significativamente maiores e mais escuros. Além disso, que a qualidade nutricional do hospedeiro, onde a mãe se alimentou é tão importante para a ninfa quanto a sua própria planta hospedeira.

Segundo Soglia *et al.* (2003), a alta densidade de tricomas pode formar uma barreira mecânica, dificultando a alimentação e a locomoção dos pulgões, e com isso,

acarretando uma baixa sobrevivência das ninfas de 1º e 2º instar e a fecundidade dos adultos.

2.2.2. Bioecologia de *A. gossypii*

O *A. gossypii* é um inseto pertencente à Ordem Hemiptera (Linnaeus, 1758), que significa *hemi*=metade; *ptera*=asas. Esta ordem se divide em três subordens de importância agrícola: Sternorrhyncha, Auchenorrhyncha e Heteroptera. Os pulgões se encontram na subordem Sternorrhyncha, superfamília Aphidoidea, família Aphididae e tribo Aphidini (Messias & Passos, 1977).

Os pulgões ou afídeos são insetos pequenos e ovalados, medindo no máximo 2 mm de comprimento. Sua coloração é variável, passando de amarelo-claro até verde-escuro. Nas antenas apresentam cerdas sensoriais, chamadas de sensilos, de cor preta (Gallo *et al.*, 2002).

São insetos sugadores de seiva (succívoros) (Gallo *et al.*, 2002), que apresentam um aparelho bucal provido de um estilete (rostrum), utilizando-o para introduzir nas folhas ou no caule, até que a ponta do seu estilete perfure o tubo crivado. A pressão do tubo crivado força a seiva pelo trato digestivo do afídeo, saindo através de sua extremidade posterior como gotículas de uma solução açucarada, conhecida como “honeydew” (Messias & Passos, 1977; Raven *et al.*, 2001). A seiva do floema é composta por 90% de sacarose e 1% de aminoácidos e outras substâncias contendo nitrogênio (Raven *et al.*, 2001).

Os pulgões se reproduzem por viviparidade pseudoplascentária, onde o embrião se desenvolve em uma parte alongada a vagina, nutrido por estruturas semelhantes a placenta. As fêmeas colocam ninfas em vez de ovos. A reprodução destes afídeos está

relacionada com o clima, sendo dividida em dois tipos. Em clima quente, se reproduzem por partenogênese telítoca, isto é, sem a participação do macho e originando apenas fêmeas. Já em clima extremamente frio, estes realizam a reprodução sexuada, pois os machos aparecem apenas no inverno. No resto do ano, as espécies se reproduzem por partenogênese (Gallo *et al.*, 2002).

O ciclo de vida do pulgão dura em torno de 15 a 20 dias, durante este período, cada indivíduo tem o poder reprodutivo de 100 a 120 descendentes (Messias & Passos, 1977). Os pulgões são conhecidos como “estrategistas r”, isto é, são bem adaptados para explorar temporariamente um novo habitat, através de um rápido aumento da população. Na ausência de inimigos naturais são capazes de crescer exponencialmente, aumentando sua população em 33 vezes por semana (Soglia *et al.*, 2003).

As fêmeas podem ser ápteras, que dão continuidade à reprodução dentro da colônia e podem ser aladas (Figura 4), disseminando rapidamente a espécie para outros locais. As formas aladas ocorrem à medida que a população começa a crescer de maneira intensa, levando a falta de alimento. Com isso, as fêmeas voam para novas plantas para iniciarem novas colônias (Gallo *et al.*, 2002). A forma alada apresenta a cabeça e o tórax de coloração preta e o abdômen amarelo (Kessing & Mau, 1991).



Figura 4. Forma alada do *A. gossypii*. Foto: P. M. Choate

O período ninfal do *A. gossypii* possui quatro instares. Cada instar dura de um a três dias, totalizando de 4 a 12 dias o seu estágio de ninfa. As ninfas são semelhantes ao adulto, porém em menor tamanho e não possuem formas aladas. Uma fêmea coloca de 6 a 12 ninfas por dia, podendo originar até 100 ninfas em seu período de vida (Kessing & Mau, 1991; Papa, 2006). As ninfas desenvolvem para o estágio adulto mediante sucessivas ecdises (Messias & Passos, 1977).

O potencial de reprodução deste inseto pode ser afetado pela qualidade da planta hospedeira, pela ocorrência natural de resistência, pela temperatura e pelo mês do ano (Soglia *et al.*, 2003; Slosser *et al.*, 2004). Sua temperatura ótima para reprodução varia de 21 a 27°C (Kessing & Mau, 1991; Slosser *et al.*, 2004), decrescendo em temperaturas extremas, como 15 e 30°C (Soglia *et al.*, 2003). As chuvas reduzem seu nível populacional. Porém, as condições de tempo nublado e clima quente e úmido, favorecem as infestações do *A. gossypii* (Miranda, 2006). O tipo de irrigação utilizada pode afetar no potencial de sobrevivência do inseto (Soglia *et al.*, 2003).

A ocorrência de pulgões com coloração mais escura esta associada com o rápido crescimento do número de insetos, com o aumento do nível que nitrogênio pela folha (Nevo & Coll, 2001), pelo percentual de umidade da folha e pela concentração de açúcar (sacarose) apresentada pela folha (Slosser *et al.*, 2004).

2.2.3. Danos

Muitos países produtores de algodão têm sido prejudicados com os danos causados pelos pulgões. No Brasil, esta praga teve sua maior importância a partir da expansão de culturas para o cerrado e através da introdução de cultivares originários dos Estados Unidos e da Austrália.

A. gossypii, quando não controlado, pode reduzir a produção em até 44% (Messias & Passos, 1977; Gallo *et al.*, 2002). Sua grande importância econômica se dá pela sua rápida capacidade de proliferação, produzindo várias gerações com alta densidade populacional em todas as safras, causando vários danos diretos e indiretos.

A princípio, os pulgões dão preferência pelas folhas do ponteiro, transferindo-se para as demais folhas da planta. Em caso de grande infestação, uma única folha é capaz de abrigar mais de 1.000 pulgões (Messias & Passos, 1977).

Os pulgões ao sugarem o floema da planta (seiva), causam o encarquilhamento das folhas e a deformação dos brotos, prejudicando assim, o desenvolvimento da planta de algodão. Esta praga apresenta simbiose com formigas, que são atraídas pela sua excreção açucarada, “honeydew” ou mela. Em troca, as formigas protegem os pulgões de seus inimigos naturais (Gallo *et al.*, 2002; Miranda, 2006).

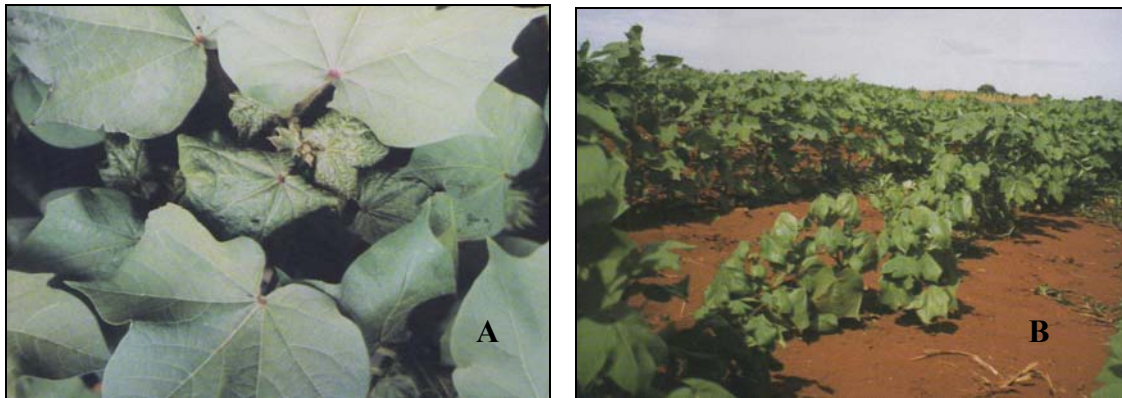


Figura 5. Danos causados pelo ataque do pulgão do algodoeiro. **A.** Dano direto: encarquilhamento dos brotos. **B.** Dano indireto: sintomas da virose mosaico das nervuras (Santos, 1999).

No final do ciclo do algodão, a excreção do “honeydew” sobre os capulhos abertos causa o “algodão doce” ou “algodão caramelizado”, a substância impregna e mancha a fibra, fazendo-a perder a qualidade como produto comercial para a usina de processamento e a indústria de fiação (Medeiros *et al.*, 2005; Miranda, 2006).

Os pulgões favorecem, ainda, o desenvolvimento da fumagina. Esta doença é causada por um fungo (*Capnodium spp.*) que se desenvolve a partir da excreção dos pulgões que cai sobre as folhas, dificultando a respiração e a fotossíntese da planta, por recobrir toda a superfície da folha (Miranda, 2006).

Os danos indiretos causados pelo pulgão do algodoeiro são a transmissão de viroses no algodão, conhecidas como o (“azulão”) e o “vermelhão”. O “azulão” é uma virose de grande importância econômica, que causa o amarelecimento ou “palidez” das nervuras das folhas, formando um mosaico. Além disso, as folhas apresentam os brotos encurvados, que secam, reduzindo drasticamente a produção do algodão. Em sua forma mais virulenta, conhecida como “mosaico das nervuras de Ribeirão Bonito”, causa paralisia do crescimento, com encurtamento dos entrenós, deixando a planta com o porte pequeno. Seu nível de controle é de 5 a 10% de dano econômico. Já a virose “vermelhão” é de ocorrência esporádica e causa pequenos prejuízos, sendo 70% o seu nível de controle. A planta apresenta folhas vermelhas entre nervuras (Santos, 1999; Gallo *et al.*, 2002).

Lavouras de algodão sob boas condições nutricionais têm maior capacidade de recuperação ao ataque desta praga, sendo que cultivares resistentes a virose podem suportar, sem prejuízos, a presença de 20 a 30 pulgões por folha (Papa, 2006).

A. gossypii, tanto a forma áptera como a alada é capaz de transmitir mais de 50 viroses em diversas plantas. A transmissão ocorre da seguinte forma: o pulgão se alimenta de uma planta contaminada e, em seguida, ao se alimentar de uma planta sadia transfere o vírus a mesma. Esta transmissão pode levar menos de um minuto. O inseto contaminado pelo vírus não é capaz de transmitir este vírus para a sua prole (Ilharco, 1992).

2.2.4. Métodos de controle

O objetivo dos métodos de controle não é o de eliminar as pragas, mas reduzir sua população de modo a permitir que seus inimigos naturais permaneçam na plantação agindo sobre suas presas favorecendo a volta do equilíbrio natural. Dessa forma, requer o entendimento do sistema da plantação como um todo e o conhecimento das interações ecológicas entre os insetos, seus inimigos naturais e o ambiente.

É fundamental o estabelecimento dos níveis de dano econômico, que requer o entendimento do nível de tolerância da plantação sem refletir em perda econômica substancial. O nível de dano econômico é registrado através de amostragens sistemáticas na cultura, podendo variar de acordo com as características da área, com o ano, com o custo do controle, com o preço do produto colhido e outros fatores (Fabretti & Costa, 1993).

O cotonicultor deve estar apto em reconhecer as pragas e seus inimigos naturais que possam ocorrer durante o ciclo da cultura, realizando amostragens periódicas para iniciar o controle no momento correto. Existe a necessidade da adoção de um conjunto de medidas que, combinadas resultem em um controle efetivo da praga.

Geralmente, as amostragens devem ser feitas com intervalos de cinco dias, tomando-se aleatoriamente 100 plantas em talhões com até 100 ha, área homogênea, através do caminhar em ziguezague, dentro da cultura, de maneira que se observem plantas que estejam bem distribuídas (Embrapa Algodão, 2003). A frequência da amostragem está de acordo com cada fase da cultura. Como o pulgão ataca no período da germinação ao florescimento, realiza-se uma amostragem por semana (Gallo *et al.*, 2002), analisando a última folha desenvolvida da planta (Fabretti & Costa, 1993).

Na fase inicial da cultura, devem-se vistoriar as folhas do ponteiro e os brotos novos em busca de colônias, acima de 12 indivíduos por folha. Em fase mais tardia da cultura, deve-se observar também a presença de “honeydew” sobre as folhas mais inferiores. A presença de indivíduos alados indica proximidade da migração e colonização de novas áreas (Miranda, 2006).

Em cultivares resistentes a viroses, o pulgão atua como praga e, em cultivares suscetíveis a viroses, este também atua como vetor de doença. Assim, a decisão de controle é diferenciada para cada grupo de cultivares (Papa, 2006).

As cultivares de algodoeiro resistente a viroses podem tolerar até 70% de infestação. Segundo Frabretti e Costa (1993), se durante a amostragem for verificado de 20 a 30 pulgões por folha é constatando que 70% das plantas apresentam pulgões, deve-se aplicar um inseticida químico. Já nas variedades suscetíveis, o nível de controle não pode passar de 10% de plantas com colônias (Miranda, 2006).

Observou-se que se for possível manter a cultura com um número reduzido de indivíduos por folha de algodão, isto é, em baixa infestação, os prejuízos causados pela praga não são relevantes (Messias & Passos, 1977). Assim, diversos tipos de controle podem ser utilizados visando a redução populacional dos pulgões, como o controle cultural, o controle biológico e, se necessário, o controle químico.

2.2.4.1. Controle cultural

O controle cultural se baseia nas modificações de práticas de manejo, de forma a dificultar a reprodução, dispersão, sobrevivência e danos das pragas nas culturas, favorecendo a produção. Tem como vantagens o baixo custo, ser adaptável às distintas realidades econômicas dos produtores e favorecer as outras medidas de controle (Miranda, 2006; Freire & Morello, 2003).

Algumas técnicas de controle cultural podem ser utilizadas na cultura do algodão, visando repelir ou diminuir populações de pulgão, sem agredir o meio ambiente.

A eliminação de ervas daninhas hospedeiras, de plantas voluntárias e de soqueiras de algodão reduz os focos iniciais da praga, ao eliminar indivíduos que completariam o seu desenvolvimento nestas plantas alternativas (Miranda, 2006). Já a rotação de culturas com plantas não hospedeiras, deve ser realizada analisando a estratégia de vida do inseto com a planta utilizada.

Quanto maior a ocorrência de ervas daninhas na cultura, maior será a frequência de plantas com viroses. Pesquisas afirmam que o milho e algumas plantas daninhas, como a trapoeraba (*Commelina benghalensis*) são hospedeiras de afídeos (Santos, 1999). Logo, deve-se evitar o plantio de algodão adjacente às lavouras de milho e retirar as plantas daninhas próximas.

Para evitar a disseminação de viroses na cultura, carece realizar a destruição das primeiras plantas com sintomas de mosaico das nervuras (Santos, 1999).

Segundo Ilharco (1992), certas plantas podem ser utilizadas junto das culturas auxiliando no combate as infecções viróticas causadas por pulgões. A planta-espiã é uma planta indicadora, pois os sintomas do vírus se manifestam nesta mais claramente. A planta armadilha é uma planta que captura afídeos, por exemplo, por ser pegajosa. Já a planta-isca e a planta-exurgo são utilizadas para atrair os afídeos. A primeira por ser preferida por estes insetos e a segunda, por ser mais alta que a cultura protegida.

2.2.4.2. Controle físico

Uma alternativa simples de controle é o controle físico de pragas. Este é baseado do manejo do campo com o uso de barreiras físicas, como valas e coberturas plásticas que dificultam a locomoção dos insetos de uma plantação para outra.

Outra técnica apropriada é o emprego de superfícies refletoras, como folhas de alumínio, colocadas entre as linhas da cultura, tem como finalidade evitar que formas aladas de afídeos pousem nas plantas. A instalação de redes de malha larga, de cor branca ou incolor, repele estes insetos. Já a aplicação por pulverização de branqueadores (substância em pó e cor branca) e óleos minerais, reduz a incidência de afídeos em diversas culturas, por repelência dos mesmos (Ilharco, 1992; Gallo *et al.*, 2002).

As chuvas fortes reduzem o nível populacional do *A. gossypii*, através do controle físico das gotas sobre o inseto (Kessing & Mau, 1991; Miranda, 2006). A irrigação por aspersão também pode contribuir para a redução da população de pequenos insetos, como o pulgão (Gallo *et al.*, 2002).

2.2.4.3. Controle químico

No Brasil são consumidas anualmente mais de 10 toneladas de inseticidas somente na cultura do algodão, onerando os custos de produção em torno de US\$ 190 milhões (CTNBio, 2007).

Uma das grandes desvantagens do uso de produtos químicos é que alguns são eficientes apenas em determinadas fases do crescimento do inseto. Os neonicotinóides e outros inseticidas de contato atuam sobre adultos, não causando

nenhum efeito sobre os ovos, e os reguladores de crescimento atuam somente nas formas de ninfa (Gallo *et al.*, 2002).

Para o controle de pulgões, normalmente realiza-se o tratamento das sementes com produtos sistêmicos. As sementes têm a coloração preta ou roxa, devido à adição de carvão ativado ou silicato de alumínio, como um alerta de sua alta toxicidade. Seu poder residual é de 20 a 30 dias após a germinação do algodão. Para evitar a resistência da praga ao inseticida, devem-se realizar as pulverizações com produtos do mesmo grupo utilizado no tratamento das sementes, observando o ciclo de vida do inseto. É indicada a troca o grupo ativo apenas na pulverização realizada aos 35 dias de germinação, quando a geração do inseto já mudou (Gallo *et al.*, 2002).

O controle químico não deve ser conduzido com apenas uma classe de ingrediente ativo, procurando rotacionar aproximadamente quatro modos de ação por ciclo da cultura. Em caso de misturas, compostos de mesmo modo de ação não devem ser misturados. Estas somente são justificáveis se permitirem controlar simultaneamente duas ou mais pragas que tenham atingido o nível de controle e/ou se a mistura fosse sinérgica (Degrande, 2002).

Em substituição ao tratamento das sementes, pode-se utilizar os granulados sistêmicos como aldicarb, disulfon, carbofuran, terbufós, imidacloprid, thiamethoxan, entre outros. O poder residual destes produtos é igual ao do tratamento de sementes.

Na tabela 2, estão expostos os três tipos de controle químico mais utilizados no controle do pulgão do algodoeiro, o princípio ativo, o nome comercial do produto e as dosagens que devem ser utilizadas por aplicação.

Tabela 2. Inseticidas recomendados para o controle de pulgões (Gallo *et al.*, 2002).

| 1. Tratamento de Sementes | | |
|----------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| Nome técnico | Nome Comercial | Dosagem |
| Carbofuran | Furadan 350 SC | 2,0L/ 100Kg sementes |
| Carbosulfan | Marshal TS 350 | 2,0Kg/ 100Kg sementes |
| Benfuracarb | Lazer 400 PM | 2,0Kg/ 100Kg sementes |
| Imidacloprid | Gaicho 700 P | 0,5Kg/ 100Kg sementes |
| Acefato | Orthene 750 TS | 1,0Kg/ 100Kg sementes |
| Thiamethoxan | Cruiser 700 WS | 0,2Kg/ 100Kg sementes |
| 2. Inseticidas Granulados | | |
| Nome Técnico | Nome Comercial | Dosagem |
| Aldicarb | Temik 150 GR | 5 a 7,5 Kg/ ha |
| Carbofuran | Furador 50 G | 40 Kg/ ha |
| Terbufós | Counter 50 G | 40 Kg/ ha |
| 3. Inseticidas para pulverização | | |
| Nome Técnico | Nome Comercial | Dosagem |
| Monocrotofós | Azodrin 400 S | 0,5 L/ ha |
| benfuracab | Alitrix 400 | 0,4 L/ ha |

Os inseticidas monocrotofós, endossulfan, metomil, metamidofós, dimetaoato são alguns produtos indicados para o controle do pulgão do algodoeiro (Fabretti & Costa, 1993). Estudos indicam que o endossulfan já foi uma das melhores escolhas para o controle desta praga (Kessing & Mau, 1991). Geralmente, duas aplicações feitas com um espaço de 15 a 20 dias são suficientes para controlar a praga (Messias & Passos, 1977). Como os pulgões colonizam a parte abaxial das folhas, o controle com inseticida não sistêmico fica um pouco comprometido. A aplicação deve ser realizada de baixo para cima, se certificando que foi obtida uma cobertura uniforme durante a pulverização.

Casos de resistência de *A. gossypii* a inseticidas químicos têm sido relatados em produtos dos grupos carbamatos, organofosforados e piretóides em alguns

países como na África, Estados Unidos, Austrália, China e Japão (Godfrey *et al.*, 2000).

Em geral, o uso de inseticidas químicos deve ser restrito. A utilização de produtos seletivos é importante, pois estes visam a preservar o meio ambiente e a manutenção da população de inimigos naturais.

2.2.4.4. Controle biológico

O controle biológico visa à introdução de um organismo capaz de causar mortalidade, fazendo com que a população de pragas se mantenha em níveis populacionais não prejudiciais. Este controle tem o objetivo de introduzir um ou mais agentes de controle que proporcionem alta mortalidade às pragas específicas. Estes agentes podem ser: predadores, parasitóides e patógenos, como bactérias, fungos, nematóides e vírus.

Os inimigos naturais são importantes para manter as populações de pulgões em equilíbrio. A maioria dos inimigos naturais dos afídeos são espécies polípagas, isto é, se alimentam de várias espécies de afídeos (Ilharco, 1992). Porém, predadores mais especializados, como as joaninhas, apresentam uma maior eficiência no controle deste inseto. A manutenção das espécies de inimigos naturais existentes no algodoeiro é de extrema importância, pois estes são capazes de manter esta praga em níveis relativamente baixos, sem a necessidade de aplicação de inseticida (Sujii *et al.*, 2005).

De acordo com Costa *et al.* (2006), predadores são insetos de vida livre, que durante sua fase larval e adulta, consomem um grande número de presas para completar o seu ciclo de vida. Já os parasitóides são aqueles que se desenvolvem dentro do corpo

de outro inseto, durante qualquer fase do seu desenvolvimento, alimentando-se do mesmo e causando muitas vezes a sua morte.

Na cultura de algodão ocorrem diversas espécies predadoras de pulgão, que exercem função na regulação populacional dos afídeos, como as formas adultas e larvais das joaninhas *Cycloneda sanguinea*, *Hippodamia convergens*, *Eriopis connexa*, *Coleomegilla maculata*, *Olla vnigrum*, *Hyperaspis festiva*, *Symnus spp.* e *Orius spp.* (Frabretti & Costa, 1993; Costa *et al.*, 2006). Alguns predadores comuns na cultura do algodão são as larvas de *Pseudodorus clavatus* e pequenos percevejos do gênero *Geocoris* (Costa *et al.*, 2006). O crisopídeo *Chysoperia externa*, a mosca sirfídeo *Toxomerus spp.* (Miranda, 2006) e a larva do “lixeiro”, *Chrisopa lanata* (Messias & Passos, 1977) também são predadores de pulgões.

Os parasitóides quando atacam afídeos, sua cutícula torna-se rígida e quebradiça, com o aspecto mumificado (múmia), de coloração dourada ou branca. Os parasitóides comumente presentes durante infestações de pulgão são as vespas *Lisyphlebus testaceips* (Ilharco, 1992; Miranda, 2006), que pode causar até 99% de parasitismo, *Aphelinus gossypi* (Kessing & Mau, 1991), *Diaeretiella ssp.*, *Praon ssp.* e *Ephedrus ssp.* A maioria das espécies do gênero *Encarcia* são parasitas de pulgões, cochonilhas e moscas-brancas (Costa *et al.*, 2006).

O controle biológico do pulgão em diferentes épocas do ano pode ser incrementado através da utilização de diferentes biótipos do parasitóide *Aphidius colemani*. Porém, este parasitóide não suporta temperaturas acima de 25°C, de acordo com Sampaio *et al.* (2005).

A maior abundância de alguns agentes naturais depende da densidade dos pulgões e, normalmente, ocorrem sobre altas populações destes. Os fungos podem eliminar infestações elevadas de pulgões no período de sete a dez dias (Santos, 1999).

Os fungos podem agir por contato, assim estes atacam os afídeos, matando-os por asfixia. Alguns desenvolvem um micélio branco sobre os pulgões, os quais morrem ocultos por estas estruturas, como os fungos *Verticillium apphidum* (Ilharco, 1992) e *Entomophthora ssp.* (Gallo *et al.*, 2002).

Como as bactérias necessitam ser ingerida para ter ação sobre as pragas, poucas são capazes de servir como controle biológico do pulgão. Porém, Monnerat *et al* (2003) demonstrou que a bactéria *Bacillus thuringiensis* é capaz de circular endofiticamente dentro da planta. Por tanto, esta bactéria pode ser tornar um agente de controle biológico potencial para insetos sugadores de seiva.

Dentro do controle biológico pode-se também utilizar extratos de plantas. Santos *et al.* (2004) avaliou os efeitos de extratos aquosos de pó de amêndoas de nin (*Azadirachta indica*), afirmando que esta é uma alternativa eficiente para o controle de *A. gossypii*, causando mortalidade de ninfas de 60 a 100% e reduzindo os períodos de sobrevivência e fecundidade.

2.3. Bactérias Entomopatogênicas

No final do século XIX, pesquisas sobre doenças bacterianas em insetos benéficos, como o bicho-da-seda (*Bombyx mori*) e abelhas (*Apis mellifera*) foram base fundamental para o controle microbiano de insetos pragas (Almeida & Filho, 2006).

As bactérias entomopatogênicas podem ser agrupadas em três categorias como obrigatórias, facultativas e potenciais, ou em outras categorias como esporulantes e não-esporulantes. As obrigatórias causam doenças específicas nos insetos e em um número limitado de hospedeiros. As facultativas são capazes de invadir, infectar e destruir tecidos, multiplicando-se no intestino do inseto. Quando as bactérias vivem no intestino

do inseto, não se multiplicam e são pouco específicas em relação ao hospedeiro, são chamadas de potenciais. As bactérias esporulantes formam uma estrutura de resistência conhecida como esporos. As não-esporulantes não possuem esporos. (Almeida & Filho, 2006).

As espécies entomopatogênicas de maior importância encontram-se nas famílias Enterobacteriaceae, Bacillaceae e alguns gêneros da ordem Pseudomonadales. A família Bacillaceae envolve dois gêneros de grande importância, *Bacillus* e *Clostridium* (Habib & Andrade, 1998).

O gênero *Bacillus* apresenta várias características que colocaram suas espécies entre os agentes altamente promissores no controle de insetos pragas, como *Bacillus thuringiensis*. Esta bactéria foi descrita em 1901, no Japão, pelo bacteriologista Ishiwata. Em 1911, o microbiologista alemão, Berliner, em pesquisas com esta bactéria descreveu novamente a sua atividade contra insetos da ordem lepidóptera.

2.3.1. *Bacillus thuringiensis*

2.3.1.1 Aspectos gerais

***Bacillus thuringiensis* é uma bactéria cosmopolita, sendo encontrada em diversos substratos como solo, água, superfície de plantas, insetos mortos e grãos armazenados (Krywunczyk & Fast, 1980; de Maagd *et al.*, 2001). As células desta bactéria têm forma de bastonete (alongada), de 1 a 1,2 µm por 3 a 5 µm (Habib & Andrade, 1998), possuindo esporos elípticos e cilíndricos localizados na região central da célula e seu esporângio é pouco estendido (Almeida & Filho, 2006). É uma bactéria gram positiva e aeróbia, podendo facultativamente crescer em anaerobiose, no intervalo de 10 a 45°C (Monnerat & Bravo, 2000).**

Como característica marcante, esse microorganismo sintetiza inclusões protéicas cristalinas quando em esporulação, que confere a sua característica entomopatogênica. Estas inclusões são formadas por δ-endotoxinas, também denominadas proteínas Cry, que apresentam ação extremamente tóxica à diversas

ordens de insetos (Valadarres-Inglis *et al.*, 1998; Monnerat & Bravo, 2000). Esta toxina é codificada por um único gene, sendo que este caráter monogênico facilita a manipulação dos genes em processos biotecnológicos (Arantes *et al.*, 2002).

Esta bactéria foi isolada em 1902, mas em 1960 foi isolada uma estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, chamada de HD-1 (Dulmage, 1970), que apresentou uma toxicidade de até 200 vezes superior às estirpes anteriormente utilizadas nos produtos comerciais. Hoje, esta estirpe é empregada como padrão no controle de lepidópteros.

Cerca de 50.000 estirpes de *B. thuringiensis* já foram identificadas e laboratórios de todo mundo vêm trabalhando na tentativa de descobrir novas estirpes que possuam novas toxinas (Monnerat & Bravo, 2000). A efetividade de estirpes para o controle de insetos é variável para cada espécie de inseto. A virulência das bactérias depende das suas diferentes características fisiológicas: produção de toxinas e enzimas; taxa de crescimento e de multiplicação; adequação do hospedeiro e suscetibilidade (Habib & Andrade, 1998).

As principais vantagens do emprego de *B. thuringiensis* são: alta especificidade aos insetos suscetíveis, devido à presença de cristais protéicos; efeito não poluente ao meio ambiente; inocuidade aos mamíferos e a outros vertebrados; e ausência de toxicidade às plantas (Whiteley & Schnepf, 1989).

Antes de 1960, havia confusão na nomenclatura de estirpes de *B. thuringiensis*, não existindo uma classificação segura. De Barjac e Bonnefoi (1962) apresentaram uma nomenclatura baseada em propriedades bioquímicas e na aglutinação de antígenos flagelares, antígeno H. Para a realização da caracterização sorológica é necessário que se produza um antígeno e um anti-soro. Os antígenos flagelares são produzidos a partir de células vegetativas e os anti-soros são produzidos em coelhos (De Barjac *et al.*, 1980). Essa classificação proporcionou uma considerável ordenação às estirpes de *B. thuringiensis*, que passaram a ser agrupadas em subespécies. Segundo o catálogo

“International Entomopathogenic *Bacillus* Center” do Instituto Pasteur (1998), foram classificadas 80 subespécies de *B. thuringiensis*.

Hoje, a técnica de caracterização sorológica não é tanto utilizada. O Instituto Pasteur não produz mais os antígenos específicos para a realização do teste de aglutinação. Entretanto, na ausência de uma outra caracterização, esta ainda é aceita para agrupar estirpes em subespécies.

Em 1998, outras técnicas foram propostas para a classificação do *B. thuringiensis*. Crickmore e colaboradores propuseram uma classificação das proteínas Cry, baseadas na seqüência de aminoácidos codificada pelos genes, não levando em consideração o perfil de toxicidade (Capalbo *et al.*, 2005). Entretanto, a semelhança na seqüência de aminoácidos, geralmente, indica uma similaridade no espectro dos insetos-alvo de uma proteína Cry (Griffitts & Aroian, 2005). Uma única estirpe normalmente sintetiza de uma a cinco proteínas Cry ou Cyt. A combinação dessas toxinas é que define o espectro de atividade de uma estirpe (de Maagd *et al.*, 2001).

O mercado mundial de bioinseticidas representa aproximadamente 5% do mercado de pesticidas. Porém, o uso destes produtos vem crescendo. Os produtos a base de *B. thuringiensis* representam 80% dos bioinseticidas e são utilizados principalmente nos Estados Unidos e na África, para o controle de vetores de doenças (Arantes *et al.*, 2006).

No mercado são encontradas formulações a base de *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* e *aizawai* para o uso agrícola. O êxito destes produtos no controle de inseto-praga está relacionado com a cobertura das folhas durante a aplicação, que deve proporcionar uma distribuição uniforme do produto sobre toda a folhas aonde os insetos se alimentarão (Habib & Andrade, 1998). A bactéria tem maior eficiência se aplicado

nos primeiros estágios larvais. Este método tem baixa eficiência quando utilizado para o controle de insetos sugadores, sendo necessária a sua utilização por via sistêmica.

Existem poucos relatos da susceptibilidade de insetos da ordem Hemiptera ao uso de *B. thuringiensis*, com isso novos estudos são necessários visando o isolamento de novas estirpes e conseqüentemente, o controle destes insetos, como por exemplo, *Aphis gossypii*.

2.3.1.2. Toxinas produzidas pelo *B. thuringiensis*

2.3.1.2.1. α -exotoxinas

As α -exotoxinas foram caracterizadas por Toumanoff, em 1952, como Lecitinase-C ou Fosfolipase-C (Habib & Andrade, 1998). É uma substância solúvel em água, termolábil e que exige um intervalo de pH ótimo entre 6,6 e 7,4 estendido (Almeida & Filho, 2006).

A α -exotoxina é uma enzima que possui atividade citolítica, atuando sobre os fosfolípidios que formam membranas celulares. Esta toxina é altamente tóxica a insetos por via oral ou via hemocélica, causando degeneração e lise de hemócitos (Krieg, 1971). Pode ser encontrada no sobrenadante de culturas (Monnerat & Bravo, 2000).

2.3.1.2.2. β -exotoxinas

As β -exotoxinas, também conhecida como thuringiensina, é uma substância termoestável em água. Esta é produzida durante a fase vegetativa em grandes

quantidades pela subespécie *thuringiensis* e em menor quantidade por outros sorotipos, sendo liberada no meio de cultura (Habib & Andrade, 1998).

Esta substância além de ser altamente tóxica a insetos pode agir sobre alguns vertebrados. Sendo a sua gama de insetos susceptíveis maior que as da δ -endotoxinas. Porém, insetos da ordem Hemiptera não são susceptíveis a thuringiensina (Habib & Andrade, 1998).

A toxina do tipo I age através da inibição de nucleotidases, impedindo a biossíntese de RNA. O efeito é mais visível durante as etapas da metamorfose, onde os adultos geralmente são menores e inférteis. Os sintomas são semelhantes a insetos infectados por *B. thuringiensis* (Monnerat & Bravo, 2000). Desde 1970 nos Estados Unidos, a utilização de linhagens de *B. thuringiensis* com alta produção desta toxina é proibida, devido à constatação de seu efeito teratogênico em intestino de bovinos e ratos (Almeida & Filho, 2006).

A toxina do tipo II apresenta toxicidade superior a toxina do tipo I, principalmente para coleópteros. Os genes responsáveis pela síntese de β -exotoxinas estão localizados em plasmídios de 75 a 110 MDa (Levinson *et al.*, 1990).

2.3.1.2.3. Vip3A

As proteínas Vip3A foram descritas primeiramente em *Bacillus cereus*, mas são produzidas e secretadas por várias subespécies de *B. thuringiensis* durante a fase vegetativa, antes da esporulação (Monnerat & Bravo, 2000). Durante seu experimento, Estruch *et al.* (1996), confirmaram que esta proteína está presente em abundância no sobrenadante e em menor quantidade no pellet.

Estas proteínas possuem forte atividade inseticida e não fazem parte do cristal protéico, possuindo 88,5 kDa. São classificadas em Vip3A(a) e Vip3A(b), com identidade de 98%. Seu espectro de hospedeiro engloba os insetos menos sensíveis às proteínas Cry, como os lepidópteros *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens* e *Hepicoverpa zea* (Estruch *et al.*, 1996).

As Vip3A determinam formas de intoxicação similares às proteínas Cry (Arantes *et al.*, 2002). Com a ativação da protoxina de 88,5 kDa, esta adquire um tamanho aproximado de 62 kDa. A ação desta proteína provoca paralisia alimentar em baixas concentrações e uma degeneração progressiva das células epiteliais do inseto susceptível (Lee *et al.*, 2003).

2.3.1.2.4. δ -endotoxinas

As toxinas do cristal protéico, as proteínas Cry (δ -endotoxinas), são altamente eficazes no controle de insetos, sendo consideradas como o fator principal da atividade patogênica do *B. thuringiensis*.

O peso molecular das δ -endotoxinas varia entre 27 e 140 kDa (Schnepf *et al.*, 1998) e se apresentam nas formas bipiramidal, redonda, cúbica e retangular. Esses cristais vistos através de exames microscópicos podem fornecer indicações sobre a atividade inseticida das estirpes (Taylor *et al.*, 1992; Lereclus *et al.*, 1993; Habib & Andrade, 1998). Os cristais são formados na fase estacionaria do crescimento e podem pesar até 25% do peso seco de uma célula totalmente esporulada, sendo liberada junto com o esporo. Porém, estirpes de *B. thuringiensis* em capacidade limitada de produção de cristais (Agaisse & Lereclus, 1995).

Diversas subespécies de *B. thuringiensis* produzem uma série de toxinas além das proteínas Cry. A principal dela é a proteína Cyt, de massa molecular de 26-30 kDa e constituída por dois grupos, Cyt1 e Cyt2. Essa toxina é uma citolisina de ação inespecífica produzida principalmente pela subespécie *israelensis*, sendo acumulada no cristal juntamente com as endotoxinas (Monnerat & Praça, 2006).

Estas proteínas são classificadas de acordo com sua seqüência de aminoácidos, onde cada protoxina recebe o prefixo Cry ou Cyt e são agrupadas em quatro níveis hierárquicos compostos por uma letra maiúscula, uma minúscula e números, como por exemplo: Cry25Aa1 (Agaisse & Lereclus, 1995; de Maagd *et al.*, 2001).

As proteínas Cry estão subdivididas em 53 classes, de Cry1 à Cry53 (atualização constante em: www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore) e existem mais de 400 genes *cry* diferentes (Crickmore *et al.*, 2007). Os genes *cry* estão localizados em plasmídios e algumas estirpes de *B. thuringiensis* podem carregar diferentes genes *cry*. Esta grande variedade de genes propicia uma expansão do espectro de hospedeiros da bactéria (Agaisse & Lereclus, 1995).

As características dos cristais têm correlação com a atividade inseticida dos genes. Os cristais bipiramidais geralmente estão associados a proteínas Cry1, os cristais cubóides estão relacionados às proteínas Cry2 e a morfologia de cristais relativos a proteínas Cry9 podem variar (Agaisse & Lereclus, 1995; Monnerat & Bravo, 2000). Os cristais podem ser bipiramidal, cubóide, rombóide, ovóide, esférico ou, ainda, sem forma definida (Habib e Andrade, 1998).

A família das proteínas Cry3 apresenta quatro integrantes: Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Bb e Cry3Ca. Essas toxinas apresentam peso molecular de 73 a 75 kDa (Crickmore *et al.*, 2007) e produzem cristais rombóides. Krieg *et al.* (1983) descreveram a primeira estirpe codificadora de gene *cry3*. As proteínas Cry3Ba,

Cry3Bb e Cry3Ca são tóxicas a insetos da ordem Coleóptera (Donovan *et al.*, 1988; Sick *et al.*, 1990). A proteína Cry3Aa é ativa contra o afídeo da batata, *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae).

A classe Cry8, por exemplo, é composta por 12 proteínas: Cry8Aa, Cry8Ab, Cry8Ba, Cry8Bb, Cry8Bc, Cry8Ca, Cry8Da, Cry8Db, Cry8Ea, Cry8Fa, Cry8Ga e Cry8Ha. A proteína Cry8Aa tem atividade dupla contra afídeos e coleópteros. As outras proteínas desta classe foram descritas apenas para coleópteros. Apresentam peso molecular em torno de 130-134 kDa (Monnerat & Praça, 2006; Crickmore *et al.*, 2007).

2.3.1.3. Estrutura tridimensional das proteínas Cry

As proteínas Cry possuem duas regiões distintas compostas por protoxinas: uma porção amino-terminal (N-terminal), normalmente variável, associada à toxicidade da proteína e uma porção carboxi-terminal (C-terminal), sendo esta conservada e associada à formação do cristal (Arantes *et al.*, 2002; Bravo *et al.*, 2006). A porção N-terminal contém até cinco blocos altamente conservados para a maioria das proteínas Cry, que são importantes para sua função biológica. A diversidade em seus comprimentos pode ser observada na figura 6a (de Maagd *et al.*, 2001).

A estrutura tridimensional da parte ativa da proteína determinada por difração de raios X (cristalografia), consiste em três domínios: I, II e III (Figura 6b). O N-terminal domínio I é composto por sete α -hélices antiparalelas, sendo responsável pela inserção na membrana e na formação do poro. Já o N-terminal domínio II é composto de três folhas β -antiparalelas e duas α -hélices curtas e o C-terminal domínio III é composto por duas folhas β -pregueadas que, aparentemente, conferem a especificidade de ligação aos

receptores celulares. A manutenção da estrutura da molécula também é realizada pelo domínio III.

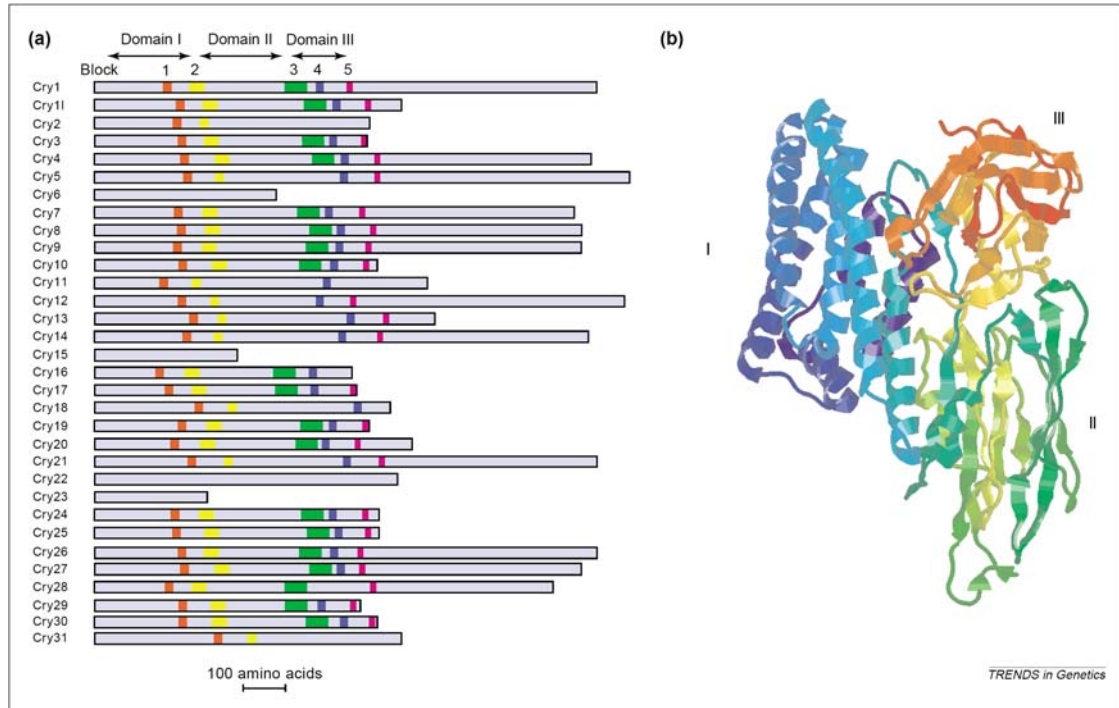


Figura 6. Estrutura das proteínas Cry. **A.** Demonstração do tamanho relativo de algumas protoxinas e dos seus cinco blocos conservados. **B.** Estrutura tridimensional dos domínios da toxina ativada Cry1Aa. Domínio I em azul, II em vermelho e III em verde (de Maagd *et al.*, 2001).

A comparação dos domínios I e II mostra que estes são estruturalmente muito similares, o que correspondem a classificação de suas protoxinas, como por exemplo a proximidade de Cry1Aa e Cry1Ab (Schnepf *et al.*, 1998; De Maagd *et al.*, 2001; Arantes *et al.*, 2002). Porém, as diferenças entre os domínios II e III influenciam na afinidade da ligação ao receptor e na atividade inseticida dessas toxinas (Bravo *et al.*, 2004). Algumas proteínas da família Cry1, como Cry1Ab, Cry1Ac, CryBa e CryEa apresentam baixa toxicidade contra larvas de *Spodoptera exigua*, entretanto quando alterado o domínio III destas proteínas com o da proteína Cry1Ca, estas se tornam tóxicas (De Maagd *et al.*, 2000).

As proteínas Cry e Cyt pertencem a uma classe de toxinas conhecidas como “toxinas formadoras de poros” (PFT), que são secretadas como proteínas solúveis em água, que sofrem mudanças conformacionais para se inserir ou atravessar a membrana celular de seu hospedeiro, causando sua morte (Bravo *et al.*, 2006). As proteínas Cry se ligam a receptores específicos presentes nas microvilosidades no intestino médio dos insetos, em contraste as proteínas Cyt não se ligam a estes receptores, se inserindo diretamente na membrana e formando poros (Soberón *et al.*, 2006).

2.3.1.4. Mecanismo de ação das proteínas Cry

Embora as proteínas Cry apresentem atividade inseticida específica para cada ordem de insetos, estas conservam o mesmo mecanismo de ação, devido à alta similaridade na estrutura de seus domínios (Griffitts & Aroian, 2005; Bravo *et al.*, 2006).

O mecanismo de ação das proteínas Cry se dá em um processo de seis etapas: solubilização do cristal, processamento das toxinas, união ao receptor, inserção na membrana, agregação e formação de poros e citólise (Monnerat & Bravo, 2000).

As proteínas Cry se apresentam como protoxinas sem ação entomopatogênica, necessitando ser ativada para o desencadeamento de seus efeitos tóxicos. Logo, quando injetado diretamente na hemolinfa do inseto, o cristal protéico não possui efeito tóxico. A infecção natural ocorre por via oral (Habib & Andrade, 1998).

A solubilização dos cristais de *B. thuringiensis* ocorre em pH alcalino. Ao serem ingeridas por um inseto suscetível, as protoxinas são solubilizadas no ambiente alcalino

do intestino médio destes (pH=10) e em seguida, processadas por proteases específicas (Capalbo *et al.*, 2005). As diferenças no grau de toxicidade entre diferentes proteínas a um mesmo inseto, pode estar relacionada a redução da solubilidade, sendo este um dos mecanismos de resistência dos insetos a algumas toxinas (Arantes *et al.*, 2002).

A maior parte das proteínas Cry são produzidas como protoxinas que, para serem ativadas, devem ser processadas pelas proteases do intestino médio dos insetos, principalmente as tripsinas, retirando a porção C-terminal e em alguns casos, parte da porção N-terminal, liberando o fragmento tóxico (monômero de toxina). Este processamento é um fator que contribui na determinação da especificidade ao inseto (Monnerat & Bravo, 2000; Bravo *et al.*, 2004; Bravo *et al.*, 2006). Por exemplo, a proteína cry1A tem uma massa molecular de 130-140 kDa e após processamento libera um fragmento tóxico de 60-65 kDa (Arantes *et al.*, 2002).

A união ao receptor ocorre após as proteínas Cry serem ativadas. Esta união é bifásica, composta de um passo reversível e outro irreversível (Van Rie *et al.*, 1989). A união reversível é o primeiro passo, envolvendo a interação entre a toxina e seu sítio de união, sendo este um requisito básico para que ocorra toxicidade, mas não suficiente (Schenpf *et al.*, 1998). No entanto, as proteínas Cry se unem, de maneira irreversível, a receptores específicos localizados nas microvilosidades das células do intestino médio das larvas dos insetos suscetíveis. Este fator é decisivo para a toxicidade e especificidade das toxinas ao inseto (Van Rie *et al.*, 1989; Monnerat & Bravo, 2000).

Para as proteínas da família Cry1A, por exemplo, existem quatro receptores descritos na literatura: caderina (CARD); aminopeptidase-N (APN) e alcalina fosfatase (APL), que são conjugadas a glicofosfatil inositol (GPI); e glico-conjugador de 270 kDa (Figura 7).

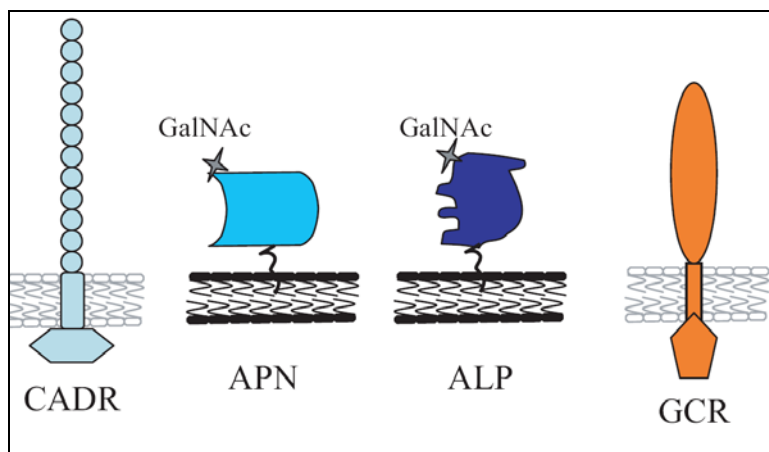


Figura 7. Receptores moleculares da proteína Cry1A (Bravo *et al.*, 2006).

O monômero de toxinas interage com o primeiro receptor (CARD ou GCR), que resulta em uma mudança conformacional. Este sofre uma quebra de sua α -hélice e é acomodado através da exposição da sua parte hidrofóbica, podendo resultar em uma perda de até 3 kDa no tamanho da toxina (Gómez *et al.*, 2002). Esta mudança facilita a formação de um oligômero de tamanho variável. O oligômero interage com maior afinidade ao segundo receptor (APN ou ALP), induzindo a inserção na membrana através de um pré-poro (Bravo *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 2006; Soberón *et al.*, 2006). O mecanismo de resistência mais freqüente de proteínas Cry envolve a alteração na ligação ao receptor (Bravo *et al.*, 2004).

A formação de um pré-poro através da estrutura do oligômero é importante para a inserção na membrana e para a toxicidade. A construção deste oligômero foi demonstrada para algumas proteínas das famílias Cry1 e Cry3. Experimentos mostraram que a formação do oligômero está associada a alta atividade e eficiência do poro, sustentando a hipótese que este mecanismo é necessário para a ação das proteínas (Bravo *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 2006). As proteínas devem se modificar parcialmente para facilitar a inserção na membrana e a formação dos poros (Bravo *et al.*, 2006) ou canais iônicos com diâmetro variando de 1 a 2nm (Monnerat & Bravo, 2000).

Na última etapa, as proteínas Cry causam a morte das células epiteliais por inativação do sistema que mantém o gradiente de pH e por citólise osmótica. As toxinas Cry aumentam a permeabilidade das microvilosidades das células a cátions, ânions, água e moléculas grandes, causando um colapso na diferença de potencial, na perda da força motriz que dirige a entrada de aminoácidos no interior celular, e a redistribuição dos cátions. Estas alterações propiciam a destruição e ruptura das células do intestino médio da larva e a proliferação de bactérias na hemolinfa, causando a morte das larvas por inanição e septicemia (Monnerat & Bravo, 2000). Estas etapas estão representadas resumidamente na figura 8, adaptado para infecção no pulgão do algodoeiro.

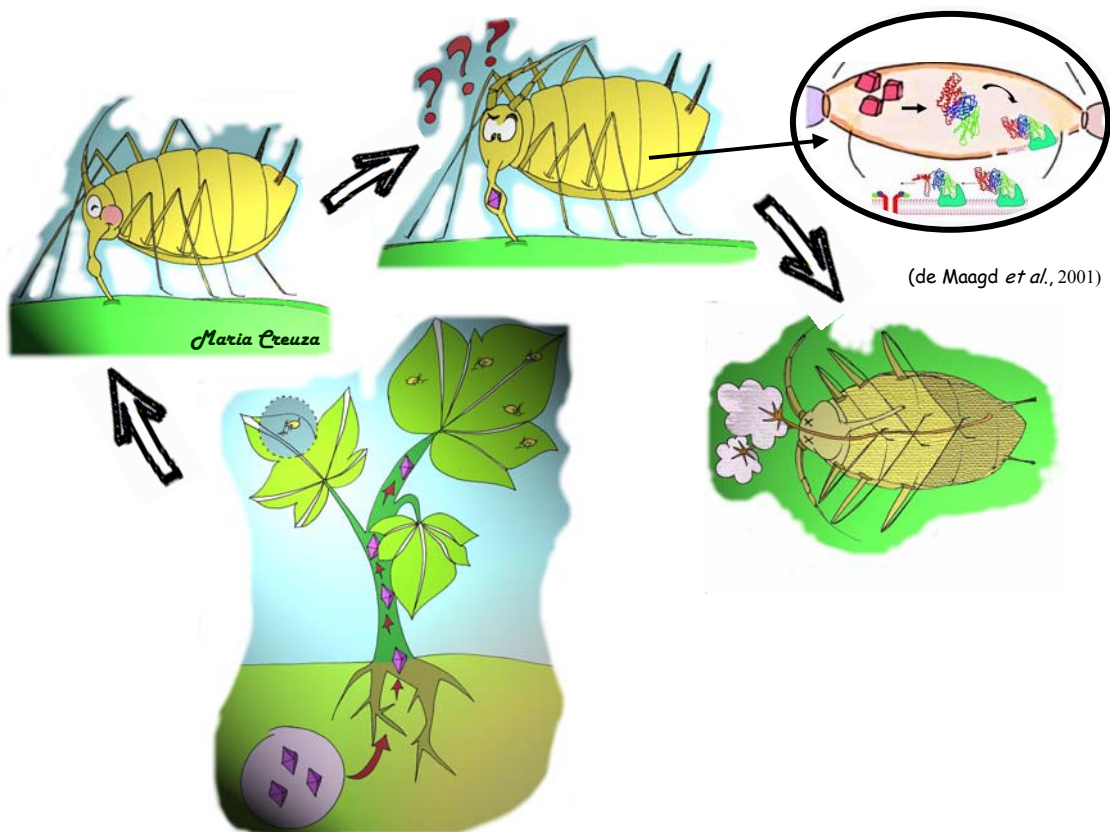


Figura 8. Modo de ação das toxinas de *B. thuringiensis* no intestino para *Aphis gossypii*. A bactéria é ingerida pelo inseto sugador através da seiva. Dentro do intestino médio do inseto, o cristal é ativado, ocorre a ligação ao receptor específico e a formação de um poro. Assim, as células epiteliais do intestino se rompem, ocorrendo uma proliferação de bactéria no corpo do inseto que morre por septicemia.

2.3.2. Bactérias Endofíticas

Segundo Azevedo e seus colaboradores (2002), microrganismos endofíticos são aqueles que vivem ou percorrem o interior de tecidos e órgãos vegetais sem aparentemente causar nenhum tipo de danos ao seu hospedeiro.

Estes microrganismos foram descritos no século XIX, onde eram considerados inócuos às plantas. No século XX verificou-se que alguns microrganismos endofíticos, principalmente bactérias e fungos, conferiam vantagens aos seus hospedeiros, como proteção a insetos e doenças. Ainda podem ter atuação na promoção de crescimento vegetal (Azevedo *et al.*, 2002) e na biorremediação de áreas poluídas, como água e solo (Bacar *et al.*, 2004).

Os principais gêneros de bactérias endofíticas utilizados na agricultura para combater doenças e pragas são: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clavibacter*, *Micrococcus* e *Erwinia* (Azevedo *et al.*, 2000).

Em várias culturas com importância econômica verificou-se o controle biológico efetivo de doenças utilizando bactérias endofíticas. No caso do algodão, as bactérias utilizadas para controlar os patógenos foram *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* e *Enterobacter cloacae* (Baldani *et al.*, 2002).

A utilização de microrganismos endofíticos na agricultura na área de biotecnologia é extremamente promissora. Estes poderão ser utilizados como vetores para a introdução de genes exógenos na planta hospedeira, conferindo novas características de interesse econômico.

A bactéria *Clavibacter xyli* serve como exemplo da utilização de bactérias endofíticas no controle de pragas. Nesta foi introduzida o gene *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis*, que causa a morte da broca do milho (*Ostrinia nubilalis*) pela produção de

cristais protéicos do *B. thuringiensis* (Azevedo *et al.*, 2002). Outro exemplo é a vetorização de bactérias diazotróficas endofíticas visando à indução de resistência de plantas a algumas classes de insetos, através do controle interno, nos tecidos da planta. As bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* são capazes de carregar e expressar o gene *cry3A*, sendo letal a algumas espécies de lepidópteros e coleópteros (Salles *et al.*, 2000; Baldanai *et al.*, 2002).

Uma pesquisa realizada por Monnerat *et al.* (2003) com estirpes de *Bacillus thuringiensis* isoladas de plantas de algodão, comprovou que a planta é capaz de absorver a bactéria aplicada no solo, protegendo-a contra insetos da ordem Lepidoptera. Isso comprova que *B. thuringiensis* é uma bactéria endofítica, devido a sua capacidade de se proliferar no interior da planta.

Outras pesquisas com amostras retiradas de mandioca, a maioria das bactérias endofíticas isoladas e identificadas foram caracterizadas como as do gênero *Bacillus*. Entre elas, as espécies: *B. thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megateriu*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus anthracis* (Teixeira *et al.*, 2007; Piza *et al.*, 2007).

Com isso, a bactéria endofítica *B. thuringiensis* pode ser utilizada como uma ferramenta promissora no controle de insetos de algumas ordens que vivem ou se alimentam no interior de plantas, como os insetos sugadores. Sendo esta forma de controle satisfatória, pois uma vez que confirmada a capacidade desta bactéria de circular pelo xilema da planta, esta pode ser absorvida pelo inseto sugador a partir de sua seiva, controlando-os. Assim, pode haver uma redução no emprego de inseticidas químicos para o controle de insetos sugadores.

Em relação à ação de biorremediação de áreas poluídas, foi demonstrado que a bactéria endofítica *Burkholderia cepacia* é capaz de degradar poluentes, resultando um

decréscimo da poluição e reduzindo de 50 a 70% os níveis de evaporação destes compostos pelas folhas. A associação da bactéria com a planta hospedeira protege a planta dos efeitos da poluição do solo ou da água (Barac *et al.* 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

- Estabelecer um protocolo de bioensaio seletivo e de dose contra o pulgão do algodoeiro;
- Selecionar estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficazes no controle do mesmo;
- Caracterização das estirpes selecionadas.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterização bioquímica, molecular e ultra-estrutural das estirpes selecionadas nos bioensaios seletivos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAISSE, H & LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **Journal of Bacteriology**. v. 177, 6027-6032 p., 1995.

ALGODÃO BRASILEIRO. **Cultura do Algodão**. Disponível em: <www.algodao.agr.br>. Acesso em: 27 de junho de 2007.

ALMEIDA, J.E. & FILHO, A. B. Microrganismos no controle de pragas. In: PINTO, A. S.; NAVA, D. E.; ROSSI, M. M.; MALERBO-SOUZA, D. T. **Controle Biológico de pragas – na prática**. Piracicaba: CP 2, 2006. 287 p.

ARANTES, O. M.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 433 p.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W. Jr.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic journal of Biotechnology**. v. 3, 2000.

AZEVEDO, J. L.; JÚNIOR, W. M.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 433 p.

BACAR, T.; TAGHAVI, S.; BORREMANS, B.; PROVOOST, A.; OEYEN, L.; COLPAERT, J.V.; VANGRONVELD, J.; LELIE, D. V. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. **Nature Biotechnology**. v. 22, 583-588 p., 2004.

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R.; BALDANI, V. L. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L.

A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 433 p.

BARBOSA, M. Z. **Análise e Indicadores do Agronegócio**. Instituto de Economia agrícola. v.1, 2006. Disponível: <www.iae.sp.gov.br>. Acesso em: 01 de agosto de 2007.

BRAUM, C. J.; JILKA, J. M.; HEMENWAY, C. L. & TUMER, N. E. Interactions between plants, pathogens and insects: possibilities for engineering resistance. **Current Opinion Biotechnology**. v. 02. 193-198 p., 1991.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**. 13 p., 2006.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; CONDE, C.; MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, M.; ZHUANG, S.; GILL, S.; SOBERÓN, M. Oligomerização triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochimica et Biophysica Acta**. 38-46 p., 2004.

CAPALBO, M.D.; VILAS-BÔAS, T.G.; ARANTES, M.O. & SUZUKI, T.M. *Bacillus Thuringiensis*. **Revista Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**. v 34, 78-84 p., 2005.

CHEN, J.; WANG, Q.; HUA, Z.; DU, G. Research and application of biotechnology in textile industries in China. **Enzyme and microbial technology**. 1651-1655 p., 2007.

CHRISTOU, P.; CAPELL, T.; COOLÍ, A.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. **Trends in Plant Scienc**. v.11, 302-308 p., 2006.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Série de Área plantada de algodão no Brasil**. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 16 de julho de 2007.

COSTA, V. A.; FILHO, E. B.; SATO, M. E. Parasitóides e predadores no controle de pragas. In: PINTO, A. S.; NAVA, D. E.; ROSSI, M. M.; MALERBO-SOUZA, D. T. **Controle Biológico de pragas – na prática**. Piracicaba: CP 2, 2006. 287 p.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.; FEILTESON, J.; SCHENEPF, E.; VANRIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: <www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore>. Acesso em: 01 de novembro de 2007.

CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Parecer técnico prévio conclusivo do Algodão-Bt**. Disponível em: < www.ctnbio.gov.br>. Acesso em: 03 de setembro de 2007.

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

DE BARJAC, H. VERON, M. & DUMANOIR, V. C. Caracterization biochimique et serologique dès souches de *Bacillus sphaericus* pathogenes ou non pour lês moustiques. **Annales de Microbiologia**. 191-201 p., 1980.

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

DE MAAGD, R.; WEEMEN-HENDRIKS, M.; STIEKEMA, W.; BOSCH, D. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. **Applied Environmental Microbiology**. v. 66, 1559-1563 p., 2000.

DEGRANDE, P. E. De olho nas pragas de algodão. 2002. **Cultivar**. Disponível em: <www.grupocultivar.com.br>. Acesso em: 23 de março de 2008.

DÍAZ, N.A.A. **El cultivo Del algodón: apuntes basicos**. Nicaragua:UMA, 1993. 136 p.

DONOVAN, W. P.; DANKOCSIK, C.; GILBERT, P. Molecular characterization of a gene encoding a 72-kilodalton mosquito toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. **Journal of Bacteriology**. v. 214, 365-372 p., 1988.

DOWNES, S.; MAHON, R.; OLSEN, K. Monitoring and adaptive resistance management in Australia for Bt-cotton: Current status and future challenges. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 95, 208-213 p., 2007.

DULMAGE, H. T. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 15. 232-239 p., 1970.

EMBRAPA ALGODÃO. **A Cultura do Algodão no Cerrado (2003)**. Disponível em: <www.cnpa.embrapa.br>. Acesso em: 27 de junho de 2007.

EMBRAPA ALGODÃO. **Algodão**. Disponível em: <www.cnpa.embrapa.br>. Acesso em: 27 de junho de 2007.

ESTRUCH, J.J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceeding of the National Academy of Sciences of USA**. v. 93, 5389-5394 p., 1996.

FABRETTI, J.P. & COSTA, F.A. **MIP – Manejo Integrado de Pragas do Algodoeiro**. São Paulo: HOECHST do Brasil, 1993. 159 p.

FEIRE, E.C. & MORELLO, C.E. **Cultura do Algodoeiro em Goiás**. Campina Grande: Embrapa Algodão. 29 p. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 68), 2003.

FERNANDES, O.D. Plantas geneticamente modificadas e o controle biológico. In: PINTO, A.S.; NAVA, D.E.; ROSSI, M.M.; MALERBO-SOUZA, D. **Controle Biológico de Pragas – na prática**. Piracicaba: CP 2, 2006. 287 p.

FONTES, E.M.; RAMALHO, F.; UNDERWOOD, E.; BARROSO, P.A.; SIMON, M.F.; SUJII, E.R.; PIRES, C.; BELTRÃO, N.; LUCENA, W.; FREIRE, E. The cotton

agricultural context in Brazil. In: HILBECK, A.; ANDOW, D.; FONTES, E. **Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms**. Wallingford – UK: CABI Publishing, 2006. V. 02, 373 p.

GALLO, D. (IN MEMORIAN); NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P.; BATISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. & OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. v.10. 920 p.

GODFREY, L. D.; ROSENHEIM, J. A.; GOODEL, P. B. Cotton aphid emerges as major pest in SJV cotton. **California Agriculture**. v. 54. 26-29 p.. 2000.

GÓMEZ, I.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **FEBS Letters**. 242-246 p., 2002.

GÓMEZ, I.; PARDO-LÓPEZ, L.; MUÑOZ-GARAY, C.; FERNANDEZ, L. E.; PÉREZ, C.; SÁNCHEZ, J.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**. 5 p., 2006.

GRIFFITTS, J. & AROIAN, R. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. **BioEssays**. v. 27, 614-624 p., 2005.

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

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: < www.ibge.gov.br >. Acesso em: 02 de setembro de 2007.

ILHARCO, F. A. **Equilíbrio Biológico de Afídeos**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1992. 303 p.

JAMES, C. **Situação global da comercialização de lavouras GM.** Manila, Filipinas: ISAAA, 2005. 46 p.

LEE, M. K.; WALTERS, F.; HART, H.; PALEKAR, N.; CHEN, J. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology.** v.69, 4648-4657 p., 2003.

LEVINSON, B.; KASYAN, K.; CHIU, S.; CURRIER, S.; GONZÁLES, J. Identification of β -exotoxin production, plasmids encoding β -exotoxin and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. **Journal of Bacteriology.** v. 172, 3172-3179 p., 1990.

LECADET, M. M.; FRACHON, E.; DUMANOIR, V. C.; RIPOUTEAU, H.; HAMON, S.; LAURENT, P. & THIERY, I. Updating the H-antigen classification of *B. thuringiensis*. **Journal of applied Microbiology.** v.86, 660-672 p., 1999.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A. & LECADET, M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTEWISTLE, P.; CORY, J.; BAILEY, M.; HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice.** New York, 1993. 37-69 p.

KESSING, J. M. & MAU, R. F. ***Aphis gossypii* Glover.** 1991. Disponível em: <www.extento.hawaii.edu>. Acesso em: 01 de maio de 2007.

KRIEG, a. Is the potential pathogenicity of bacilli for insect related to production of alpha-endotoxin? **Journal of Invertebrate Pathology.** v. 18, 425-426 p., 1971.

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

KURTZ, R.W.; MCCAFFERY, A.; O'REILLY, D. Insect resistance management for Syngenta's VipCot® transgenic cotton. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 95, 227-230 p., 2007.

MEDEIROS, A. A; OLIVEIRA, J. F; CHAGAS, M. C.; LEITÃO, F. A.; LIMA, J. S.; GUEDES, F. X.; OLIVEIRA, L. M. **Algodão: Plantio do Algodoeiro Herbáceo de Sequeiro**. Natal: Embrapa/ Embrapa/ Emater/ Sebrae, 2005. 28 p.

MESSIAS, S. & PASSOS, G. **Algodão**. São Paulo: Instituto de Ensino Agrícola, 1977. 323 p.

MIRANDA, JOSÉ EDNILSON. **Manejo integrado das pragas do algodoeiro do cerrado brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão. 24 p. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 98), 2006.

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

MONNERAT, R. & PRAÇA, L. B. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. In: OLIVEIRA-FILHO, E. C. & MONNERAT, R. G. **Fundamentos para a Regulação de Semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Brasília: Embrapa Cerrados, 2006. 352 p.

MONNERAT, R. G.; SANTOS, R. C.; BARROS, P. C.; BATISTA, A.; BERRY, C. **Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 04 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 98), 2003.

NEVO, E. & COLL, M. Effect o nitrogen fertilization on *Aphis gossypii*: Variation in size, color and reproduction. **Journal of Economic Entomology**. v. 94, 27-32 p., 2001.

PAPA, G. Pragas e seu controle. In: Fundo de Apoio à Cultura do Algodão. **Algodão: Pesquisas e resultados para o campo**. Cuiabá: FACUAL, 2006. 392 p.

PIZA, A. C. M.; CAPALBO, D. M. F.; SOUZA, C. P.; MELO, I. S.; SUZUKI, M. T. Isolamento de *Bacillus* spp. endofítico de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Anais de Eventos do UFSCar**. São Carlos: Congresso de Pós-graduação, v. 3, 1260 p., 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R.; EICHHORN, S. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001. 6° ed, 906 p.

SALLES, J. F.; GITAHY, P. M.; SHOT, L.; BALDANI, J. I. Use of endophytic diazotrophic bacteria as a vector to express the *cry3A* gene from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v 31, 155-161 p., 2000.

SANTOS, T. M.; COSTA, N. P.; TORRES, A. L. Effect of neem extract on the cotton aphid. **Pesquisa agropecuária Brasileira**. v. 39, 1071-1076 p., 2004.

SANTOS, W. J. Monitoramento e Controle das pragas do Algodoeiro. IN: Cia, E.; Freire, E. C.; Santos, W. J. **Cultura do Algodoeiro**. Piracicaba: POTAFÓS, 1999. 286 p.

SAMPAIO, M. V.; BUENO, V.H.; ROGRIGUES, S. M.; SOGLIA, M. C. Resposta a temperatura de *Aphidius colemani* Viereck originário de três regiões climáticas de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de entomologia**. v. 49, 141-147 p., 2005.

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

SICK, A.; GAERTNER, F.; WONG, A. Nucleotide sequence of a coleopteran-active toxin gene from a new isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. **Nucleic Acids Research**. v.18, 1305 p., 1990.

SIVASUPRAMANIAM, S.; HEAD, G.; ENGLISH, L.; LI, Y.J.; VAUGHN, T.T. A global approach to resistance monitoring. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 95, 224-22 p., 2007.

SLOSSER, J. E.; PARAJULEE, M.; HENDRIX, D.; HENNEBERRY, T.; PINCHAK, W. Cotton aphid (Homoptera: Aphididae) abundance in relation to cotton leaf sugars. **Environmental Entomology**. v. 33, 690-699 p., 2004.

SOBERÓN, M.; FERNÁNDEZ, L.; PÉREZ, C.; GILL, S.; BRAVO, A. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. **Toxicon**. 03 p., 2006.

SOGLIA, M. M.; BUENO, V.H.; ROGRIGUES, S.; SAMPAIO, M. V. Fecundidade e longevidade de *Aphis gossypii* Glover em diferentes temperaturas e cultivares comerciais de crisântemo (*Dendranthema grandiflora*). **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 47, 49-54 p., 2003.

SUJII, E. R.; BESERRA, V.; RIBEIRO, P.; SILVA-SANTOS, P.; SILVA, K.; MACEDO, T.; PIRES, C. S.; SCHIMIDT, F.; FONTES, E. M.; LAUMANN, R. A. **Avaliação do controle biológico natural do pulgão, *Aphis gossypii* e da curequerê, *Alabama argillacea* na cultura do algodoeiro do Distrito Federal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 22 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 113), 2005.

TABASHNIK, B. Control of resistant pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) by transgenic cotton that produce *Bacillus thuringiensis* toxins Cry2Ab. **Applied Environmental Microbiology**. v. 68. 3790-3794 p., 2002.

TAYLOR, R.; TIPPET, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L. & ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepdopteran larvae. **Molecular Microbiology**. V. 06. 1211-1217 p., 1992.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R.; COSTA, F. E. HARAKAVA, R. Microorganismos endofíticos da mandioca de áreas comerciais e variedades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 4, 43-49 p., 2007.

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**. Embrapa Meio Ambiente: Jaguariúna- SP, 1998. vol. 1. p.201-230.

VAN RIE, J.; JANSENS, S.; HOFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* endotoxinas. **European Journal of Biochemistry**. v. 186, 239-247 p., 1989.

WHITELEY, H. R. & SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual review of microbiology**. v. 40. 549-576 p., 1989.

CAPÍTULO ÚNICO

*Metodologia de Bioensaio, Seleção e Caracterização de estirpes de
Bacillus thuringiensis para o controle de Aphis gossypii*

RESUMO

Metodologia de bioensaio, seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para o controle do pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*)

Melatti, V. M.; Martins, E.; Praça, L. B.; Monnerat, R. G.

Uma alternativa viável para o controle biológico do pulgão do algodoeiro, *Aphis gossypii*, é a utilização de *Bacillus thuringiensis*. Recentemente, foi constatada que esta bactéria pode circular de forma sistêmica na planta, podendo ser utilizada no controle de insetos sugadores. Este trabalho teve como objetivo estabelecer uma metodologia de bioensaio seletivo de *B. thuringiensis* contra *A. gossypii*, selecionar e caracterizar estirpes tóxicas a este inseto. Um bioensaio foi realizado com uma estirpe de *B. thuringiensis* marcada com *gfp* (“*green fluorescence protein*”), que permitiu a visualização da bactéria em um macerado do inseto alimentado da planta tratada com essa bactéria, através de microscopia ótica de fluorescência, confirmando exposição do *A. gossypii* a bactéria. Em seguida, 400 estirpes do Banco de Germoplasma de *Bacillus* sp. da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram testadas através de bioensaio seletivo, das quais foram selecionadas as estirpes S29, S40, S616, S1168 e S1576 que apresentaram mortalidade superior a 50%. O bioensaio de dose destas estirpes foram realizados com proteínas purificadas, porém não houve diferença significativa entre as cinco estirpes testadas. As cinco estirpes selecionadas foram caracterizadas quanto ao perfil protéico, que variou de 50 a 130kDa, e ao perfil molecular, sendo algumas delas positivas para a presença dos genes *cry 1Aa*, *cry 1D*, *cry 2* e *cry 8*. A caracterização destas estirpes foi finalizada através da microscopia eletrônica de varredura, onde cristais esféricos e bipiramidais foram observados em quase todas as estirpes testadas, indicando que estes tipos de cristais podem ter alguma ação tóxica para o pulgão do algodoeiro

Palavras chaves : Algodão, controle biológico, protocolo de bioensaio de dose e gene *cry8*.

ABSTRACT

Bioassay methodology, selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains against the cotton Aphid (*Aphis gossypii*)

Melatti, V. M.; Martins, E.; Praça, L. B.; Monnerat, R. G.

A viable alternative to the biological control of the cotton aphid, *Aphis gossypii*, is the use of *Bacillus thuringiensis*. Recently, it was demonstrated that this bacterium can move in a systemic way in the plant and can be used to the control of suckers insects. This work aimed to establish a methodology for selective bioassay of *B. thuringiensis* against *A. gossypii*, select and characterize toxic strains for this insect. One bioassay was conducted with a strain of *B. thuringiensis* marked with *gfp* (“green fluorescence protein”), which allowed the visualization on optical fluorescence microscopy of the bacteria in a macerate of the insect fed on the plant treated with this bacterium through, confirming the exposition of the *A. gossypii* to the bacteria. Then, 400 strains of the Bank of Germplasm of *Bacillus spp.* of Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia were tested by selective bioassay which were selected the strains S29, S40, S616, S1168 and S1576 that showed more than 50% of mortality. The dose bioassay of these strains was performed with purified proteins, but no significant differences were noticed in the five strains tested. The five selected strains were characterized by protein profile, which ranged from 50 to 130 kDa, and by molecular profile, where some of them were positive for the presence of genes *cryIAa*, *cryID*, *cry2* and *cry8*. The characterization of these strains was finished by electronic microscopy, where round and bipiramidal crystals were found in the most strains tested, indicating that these types of crystals may have some toxic action for the cotton aphid.

Key words: Cotton, biological control, dose bioassay protocol and gene *cry8*.

1. INTRODUÇÃO

O uso de inseticidas químicos na agricultura pode causar problemas ambientais quando utilizados incorretamente, levando ao aumento populacional e seleção de insetos resistentes a um ou mais inseticidas.

O pulgão do algodoeiro, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae), por exemplo, apresenta um rápido aumento de sua população, associado ao uso do inseticida químico piretróide, demonstrando sua resistência a inseticidas com este composto químico (Wu & Guo, 2003; Slosser *et al.*, 2004). Por isso, novas formas de controle menos agressivas ao meio ambiente são necessárias para o controle deste inseto.

A bactéria *Bacillus thuringiensis* é um método eficiente de controle para diversas ordens de insetos, podendo ter potencial para ser utilizada para o controle dos insetos da Ordem Hemiptera, através do seu uso sistêmico ou como doador de genes para o desenvolvimento de plantas transgênicas. Além disso, o emprego desta bactéria apresenta diversas vantagens sobre o uso do controle químico, pois é altamente específica para o inseto alvo, não sendo tóxica pra outros invertebrados e vertebrados (Ceron *et al.*, 1995).

A forma de alimentação do inseto é fundamental para a contaminação por bactéria. No caso do pulgão, a alimentação ocorre através da introdução do estilete no caule ou nas folhas, até a perfuração dos tubos crivados presentes no floema, sugando a seiva das plantas (Raven, *et al.*, 2001). Por isso, esta contaminação é mais complicada, devido à infecção por *B. thuringiensis* ser por via oral (Bravo *et al.*, 1998) e o pulgão ser um inseto sugador de seiva (Gallo *et al.*, 2002). Ainda não existem registros de uma bactéria natural que seja eficiente para afídeos (Grenier *et al.*, 2006).

Entretanto, a utilização de plantas transgênicas expressando os genes ativos para esta espécie, pode ser empregada como uma possível forma de utilização de *B. thuringiensis* para o controle de pulgão. Burgio e seus colaboradores (2007) demonstraram que o gene *cryIAc* presente no algodão Bt está presente no floema da planta transformada, podendo ser recuperado nos pulgões verdes (*Myzus persicae*) que se alimentaram da seiva do floema desta planta. Porém, ainda não se sabe se este gene se expressa nos tecidos do floema ou se ele simplesmente transloca na seiva. Outra forma de utilização de *B. thuringiensis* contra este inseto é o uso sistêmico da bactéria.

Controle de *A. gossypii* através da utilização de *B. thuringiensis* trata-se de um novo assunto, com a perspectiva do desenvolvimento de uma nova forma de controle para insetos sugadores. Porém, para isso, se faz necessário o desenvolvimento de um protocolo de bioensaio seletivo e de dose para que se realize a seleção e caracterização de estirpes de *B. thuringiensis* que sejam tóxicas ao pulgão do algodoeiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Criação massal de *Aphis gossypii*

A colônia de *A. gossypii* foi iniciada em agosto de 2006 e está instalada na sala de criação massal de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, no Prédio Controle Biológico 2. Os primeiros indivíduos da colônia foram cedidos pela colônia de pulgão já existente no Laboratório de Bioecologia da Embrapa.

A sala de criação é climatizada, com a temperatura regulada em $26^{\circ}\text{C} \pm 2$, umidade relativa de $78\% \pm 2$ e fotofase de 12 horas (dia/ noite). A colônia possui iluminação adequada com luz de coloração “rosa”, que estimula produção de fotossíntese pela folha. Com a alta da taxa de fotossintética, os insetos permanecem mais tempo sobre a folha, devido sua melhor qualidade.

Os insetos foram criados em potes plásticos contendo uma folha de algodão em meio agar sólido 2%, onde se multiplicavam rapidamente. Uma vez por semana a colônia era repicada para dar continuidade a criação.

2.1.1. Coleta e manutenção da colônia de *A. gossypii*

As folhas de algodão utilizadas na colônia foram cultivadas em vasos plásticos, contendo quatro plantas de algodão variedade Delta Opal, localizados em casa de vegetação. Primeiramente, coletou-se quinze folhas novas de algodão. As folhas foram deixadas de molho em solução de hipoclorito 2% por 10 minutos e enxaguadas em água

corrente, até a retirada total da solução. Após a lavagem, as folhas foram distribuídas em papel toalha e deixadas ao ambiente até secar. O pedúnculo foi cortado, deixando apenas uma pequena parte, de aproximadamente um centímetro.

Os potes plásticos e suas tampas foram esterilizados com álcool 70% e em fluxo laminar com luz UV por 20 minutos.

Os meios agar sólidos 2% eram preparados com antecedência em erlenmeyers com capacidade para 1000 mL, autoclavados e armazenados no laboratório até a sua utilização, para garantir uma maior durabilidade e menor índice de contaminação no agar utilizado. Em cada erlenmeyer foram preparados 600 mL de meio. Quando necessário, o meio era derretido no aparelho microondas e aproximadamente 40 mL deste era distribuído em 15 potes plásticos.

Quando o agar estava quase frio, uma folha de algodão era colocada em cada pote. Com o auxílio do cabo de um pincel, as bordas e o pedúnculo da folha foram submersos delicadamente para dentro do agar, para que a mesma sobrevivesse por mais tempo.

Os insetos foram acondicionados sobre as folhas depois que o agar estava frio. Não foi estipulado um número exato de insetos por pote, colocando-se apenas um número maior que dez insetos por pote. Os potes plásticos foram fechados com suas devidas tampas plásticas, furadas e vedadas com voal ou um pedaço de algodão, para manter a circulação de ar dentro dos potes.

Os potes foram acomodados na colônia de maneira invertida, para não acumular umidade (Figura 9), servindo um de suporte para o próximo pote.



Figura 9. Acomodação dos potes com agar na colônia de pulgão.

Os pulgões se multiplicam rapidamente atingindo uma alta densidade populacional por pote e por isso, foram repicados semanalmente. Durante o repique, alguns potes antigos eram selecionados para a troca e montagem de novos potes, retirando-se os insetos de um pote para outros. Aqueles que se encontravam contaminados com fungo ou que as folhas estavam velhas foram descartados, dando continuidade a colônia de pulgão.

Os insetos utilizados nos bioensaios foram retirados da colônia e levados para o Laboratório de Bacteriologia. Retirou-se o número necessário de potes da colônia e depois de usado, o material foi descartado em saco de autoclave e os potes permaneceram de molho em solução com hipoclorito de sódio por no mínimo 48 horas, para a descontaminação dos mesmos.

2.2. Seleção das estirpes de *Bacillus thuringiensis*

As estirpes de *B. thuringiensis* escolhidas para a realização deste trabalho estão armazenadas no Banco de Germoplasma de *Bacillus* Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Algumas destas estirpes apresentam seu sorotipo determinado pelo Instituto Pasteur e outras não. Foram testadas 400 estirpes do banco, isoladas de amostras do solo, água, insetos mortos e superfície de plantas (Monnerat *et al.*, 2001).

2.3. Caracterização morfológica

As estirpes foram cultivadas em meio NYSM (Yousten, 1984), em incubador rotativo a 200 rpm, 30°C, durante 48 a 72h, até sua completa esporulação. Em seguida, estas foram observadas em microscópio de contraste de fases a fresco, para observação da forma dos esporos e dos cristais.

2.4. Determinação da toxicidade

Para realização da caracterização entomopatogênica foi necessário o desenvolvimento de dois protocolos de bioensaio contra *A. gossypii*, um de bioensaio seletivo e outro de bioensaio de dose.

No seletivo foram selecionadas as estirpes que causavam acima de 20% de mortalidade para a realização da caracterização bioquímica e acima de 50% para a realização dos bioensaios de dose e caracterização molecular. Nos bioensaios de dose se calculou a dose letal necessária para matar 50% da população testada.

2.4.1. Bioensaios Seletivos

O bioensaio seletivo consistiu em um “screening” inicial do banco de *Bacillus*, na busca de estirpes que tenham resultados positivos para o controle do pulgão do algodoeiro. A partir destes ensaios foram selecionadas as estirpes que darão continuidade ao trabalho. Foram utilizadas 400 estirpes de *B. thuringiensis* nesta etapa do trabalho.

As estirpes foram cultivadas em meio NYSM (Yousten, 1984), em incubador rotativo a 200 rpm, 28°C, durante 48 a 72h, até sua completa esporulação.

Então, coletou-se o número necessário de folhas novas de algodão. Estas folhas foram deixadas de molho em solução de hipoclorito 2% por 10 minutos e enxaguadas em água corrente, até a retirada total da solução. Após a lavagem, as folhas foram distribuídas em um papel toalha para a secagem das folhas, se necessário às folhas eram totalmente enxugadas.

Enquanto isso, o fluxo laminar foi organizado. Neste colocou-se os potes plásticos e suas tampas, os tubos de vidro de 5 mL autoclavados, algodão autoclavado, as pipetas automáticas (p1000 e p5000), as ponteiros brancas e amarelas, e uma placa de Petri de vidro pequena.

O bioensaio consistiu em colocar 4 mL de água em cada pote de vidro de 5 mL e adicionar 1 mL da bactéria crescida desejada. Para cada estirpe testada foram feitas três

repetições. Em seguida, colocou-se uma folha de algodão lavada em cada pote de vidro, vedado com o auxílio de um algodão, de acordo com a figura 10. O pedúnculo das folhas foi cortado novamente com um bisturi, dentro da placa de Petri contendo água. Isto auxilia na retirada do ar que a planta absorveu durante este período de espera, a fim de evitar que o ar penetre nos elementos condutores do xilema, bloqueando a entrada de água (Raven *et al.*, 1978). Com isso, mantém-se a circulação de água dentro do xilema e floema da folha.

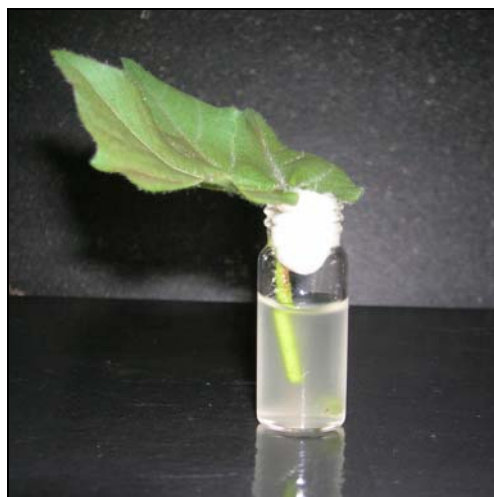


Figura 10. Pote de vidro preparado com a solução de bactéria e a água, acomodado com a folha de algodão.

Cada pote de vidro pronto foi acomodado dentro de potes plásticos, onde foram colocadas 10 ninfas de 2º instar de *A. gossypii* retiradas da colônia, na parte abaxial das folhas. Estes foram fechados com suas tampas que eram furadas e vedadas com voal ou um pedaço de algodão, para permitir a circulação de ar dentro do ensaio. As tampas de plástico foram identificadas com o número da estirpe utilizada e a data do início do bioensaio (Figura 11). O bioensaio foi acomodado na sala de bioensaio com condições de iluminação, umidade e fotoperíodo adequadas com as da colônia de pulgão.



Figura 11. Acomodação do bioensaio para a colocação dos insetos e vedação com tampa de plástico.

A avaliação e o descarte do bioensaio seletivo foi realizado cinco dias após o início do ensaio. Os pulgões foram contados e o número de insetos vivo e mortos nas três repetições foi avaliado. Assim, o percentual de mortalidade foi calculado, considerando 30 insetos mortos como 100% de mortalidade.

Junto com os bioensaios foi preparado um controle negativo, com três repetições. Este foi realizado da mesma maneira, porém não se utilizou bactéria crescida, apenas água. O percentual máximo de mortalidade permitido no controle negativo é de 15%, caso ultrapasse este valor, o bioensaio deverá ser descartado e repetido.

2.4.1.1. Validação da metodologia proposta

Para confirmar a exposição do pulgão do algodoeiro à bactéria ativa através da alimentação, realizou-se um bioensaio experimental com a bactéria *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* transformada, que expressa o gene da *green fluorescent protein (gfp)*.

Esta proteína, quando exposta a luz ultravioleta, emite fluorescência verde, permitindo a detecção da bactéria no material observado (Azevedo *et al.*, 2002).

O bioensaio foi realizado igual ao descrito no item anterior, também com três repetições.

Após os cinco dias de ensaio, os insetos vivos e mortos foram colocados em um eppendorf de 1,5 mL, adicionado a 200 µL de água destilada estéril. Os insetos foram macerados com o auxílio de um bastão de vidro. A amostra passou por choque térmico, 80°C por 12 minutos, seguido de gelo por 5 minutos. Após o choque térmico foi realizado o plaqueamento da amostra com auxílio de uma alça de platina em uma placa com meio seletivo com eritromicina, pois esta bactéria transformada é naturalmente resistente a este antibiótico. As placas foram incubadas na estufa a 30°C por 24 horas para a avaliação do crescimento de colônias. As colônias que cresceram foram observadas em microscópio de fluorescência (Axyophoth Zeiss), para a análise das células vegetativas, pois a fluorescência é observada apenas em células vegetativas.

Para cada repetição realizou-se o mesmo processo.

2.4.2. Bioensaios de Dose

Para a realização dos bioensaios de dose foram selecionadas as estirpes que causaram mortalidade igual ou acima de 50% nos bioensaios seletivos. Neste bioensaio as amostras utilizadas foram purificadas, utilizando-se apenas a proteína pura.

2.4.2.1. Purificação de proteína através de gradiente de sacarose

A purificação de cristais de δ -endotoxinas das estirpes de *B. thuringiensis* selecionadas foi realizada por meio de gradiente de sacarose, de acordo com o protocolo descrito por Bravo & Silva-Filha (2001), em seu manual de metodologias.

A purificação foi realizada apenas uma estirpe por vez. Cada estirpe foi cultivada em meio para esporulação (meio SP), em dois erlenmeyers de 2000 mL contendo 600 mL de meio crescidos em incubador rotativo (Labline 3526) a 200 rpm, 28°C, durante 72h até a obtenção de sua completa esporulação.

O material foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos na centrífuga (Jouan BR4i). O sobrenadante foi descartado e 40 mL deste foi armazenado a -20°C para testes de toxicidade posteriores. Ressuspendeu-se o sedimento em 30 mL de solução de 0,3 M de NaCl e 0,01 M EDTA, pH 8,0 e o material foi centrifugado novamente por iguais condições. Este passo foi repetido três vezes.

O sedimento foi novamente ressuspendido, porém em 30 mL de solução de PMSF a 1 mM em água destilada, repetindo esta etapa três vezes.

Terminada esta etapa, ressuspendeu-se o sedimento em tampão TTN (20 mM de Tris, 300 mM de NaCl, 0,1% de Triton X-100 pH 7,2). O material foi levado ao sonicador (VirSonic CelDisrupter 16-850), dando três pulsos de um minuto com intervalos de um minuto a 15W.

O gradiente de sacarose foi montado nas concentrações de 84, 79, 72, 67 e 54%, com a adição de 2,0 mL de tampão TTN em cada gradiente. Seis mililitros de cada gradiente foram distribuídos em seis tubos plásticos próprios para ultracentrífuga (Sovall) e deixados

a 4°C por 16 horas para a formação do gradiente. A seguir, 6 mL do material sonificado foi distribuído nos tubos em cima do gradiente de sacarose. Os tubos plásticos foram adaptados nos tubos “buckets” da ultracentrífuga. Estes foram centrifugados a 23.000 rpm por uma hora a 15°C, utilizando o rotor swing-buket.

Após a centrifugação, o material foi retirado do adaptador e as bandas visíveis foram colocadas em tubos falcon estéril. Para eliminar o excedente de sacarose, o material foi processado na centrífuga (Jouan BR4i) com água destilada a 10.000 rpm por 10 min, uma vez e duas vezes com 40 mL de triton X-100 a 1%. O sobrenadante foi descartado. Geralmente, as bandas se encontraram entre as frações 72 e 67% de sacarose, porém isto depende do tamanho dos cristais. O sedimento final foi ressuscitado em solução de Tris 50mM pH 8,0 e PMSF 1 mM, sendo a quantidade de solução proporcional ao tamanho do sedimento obtido.

O material final foi observado em microscópio de contraste de fases e armazenado a -20°C, em ependoffs de 2 mL identificados com o nome da estirpe e a banda onde foi encontrado (exemplo: banda 1, 2 e 3). Em seguida, as proteínas purificadas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), com o corante azul de brilhante Coomassie em espectrofotômetro (Hitachi U-2000), com leitura de 595 nm.

Após a quantificação, um bioensaio seletivo, com apenas uma repetição foi realizado para a escolha das bandas de cada estirpe que seriam utilizadas para o bioensaio de dose. O bioensaio seletivo foi realizado da mesma maneira do descrito anteriormente, porém com a utilização de 1 mg de cada banda das proteínas purificadas.

O sobrenadante das estirpes obtido durante a primeira centrifugação do protocolo de purificação de proteína foi armazenado a -20°C, para a realização de um bioensaio seletivo,

para verificar a presença ou não de toxinas ou metabólitos secundários produzidos pelo *B. thuringiensis* importante para o controle do pulgão do algodoeiro.

2.4.2.1. Desenvolvimento do bioensaio de dose

Para a realização do bioensaio de dose, foram escolhidas as bandas de cada amostra que continha a maior concentração de cristais puros determinadas através da quantificação por Bradford e do bioensaio seletivo com as bandas obtidas de cada estirpe.

As etapas desta metodologia são semelhantes ao do bioensaio seletivo. Foi realizado o bioensaio como descrito anteriormente, diferindo apenas na etapa da aplicação da bactéria. Este bioensaio foi composto de cinco diluições para cada estirpe. As diluições estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Diluições utilizadas nos bioensaios de dose.

| Diluição | Concentração (mg/ 5mL) 1º dia | Concentração (mg/ 5mL) 2º, 3º e 4º dia | Concentração final (mg/mL) |
|-----------------|--------------------------------------|---|-----------------------------------|
| 1 | 10 | 6,6 | 30 |
| 2 | 5 | 3,3 | 15 |
| 3 | 2,5 | 1,6 | 7,5 |
| 4 | 1 | 0,7 | 3 |
| 5 | 0,5 | 0,3 | 1,5 |

No primeiro dia de bioensaio, as diluições foram preparadas em eppendorf de 1,5 mL e diluídas em água, com o volume final de 1 mL. Isto é, de acordo com o resultado a quantificação de proteínas, de cada estirpe foi retirada uma quantidade diferente de microlitros para atingir a concentração estipulada na tabela 3.

O bioensaio de dose foi realizado com aplicações diárias. Logo, uma segunda diluição foi preparada para ser aplicada durante os três dias seguintes. A dose então foi duplicada e as diluições foram preparadas em eppendorf de 2 mL da mesma maneira da diluição anterior, totalizando um volume final de 2 mL.

No segundo, terceiro e quarto dia de ensaio, aplicou-se 666,6 µL das diluições preparadas nos tubos de vidro respectivo a sua dose, com cuidado para não retirar o pedúnculo da planta da água. Em seguida, os tubos foram novamente vedados com algodão e armazenados nos seus respectivos potes plásticos. O bioensaio foi outra vez acomodado na sala de bioensaio com condições semelhantes as da colônia de pulgão.

No quinto dia de ensaio, o mesmo foi avaliado e descartado, determinando-se o número total de insetos mortos, adultos e ninfas. As ninfas foram desconsideradas do bioensaio, pois estas nasceram durante o desenvolvimento do ensaio. Foram analisados apenas os insetos mortos e os adultos. Os dados de mortalidade foram analisados através do programa estatístico Probit (Finney, 1971), onde a concentração letal (CL_{50}) foi determinada.

O bioensaio de dose foi realizado em duplicata.

Junto com os bioensaios foi preparado um controle negativo. Este foi realizado com as mesmas etapas, porém não se utilizou proteína purificada, apenas água. O percentual máximo de mortalidade permitido no controle negativo é de 15%, caso ultrapasse este valor, o bioensaio deverá ser descartado e repetido.

2.5. Caracterização bioquímica

A caracterização bioquímica foi realizada com todas as estirpes que causaram mortalidade igual ou superior a 20%. Esta caracterização foi realizada por meio de eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE a 12%), onde as proteínas foram obtidas através de extração de proteína.

Para tal, as estirpes foram crescidas em meio NYSM (Yousten, 1984) por 72 horas em incubador rotativo (Labline 3526) a 28 °C e 200 rpm. A extração de proteína foi realizada segundo o protocolo descrito por Lecadet *et al.* (1991), com algumas modificações.

A extração de proteína baseou-se na centrifugação de 1,5 mL da bactéria crescida na microcentrífuga (Eppendorf 5410), a 14.000 rpm por 20 min, três vezes. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 1,5 mL de NaCl 5M. O material foi centrifugado por 20 min. O sobrenadante foi novamente descartado, as paredes do eppendorf foram secas para a retirada de todo NaCl e o sedimento foi ressuspensionado em 1,5 mL da solução de PMSF 1 mM + EDTA 100 mM. O material foi centrifugado por 15 minutos. Esta etapa foi realizada duas vezes. Para finalizar, o sedimento foi ressuspensionado em 200 µL da solução de PMSF 1 mM e EDTA 100 mM, e estocado a -20°C.

Em seguida, como descrito por Laemmli (1970), as preparações de esporos-cristais das estirpes foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS a 12% (gel concentrador 4% + gel separador 12%), em aparelho de sistema vertical Hoefer miniVE (Amersham Pharmacia), a voltagem constante de 120 V, por aproximadamente 2 horas.

O gel foi corado em solução corante de Comassie blue (40% de metanol, 10% de ácido acético e 25% de comassie blue 250 R) por 16 horas e descorado em solução descorante (40% de metanol, 10% de ácido acético) de uma a duas horas, até visualização dos perfis protéicos. O gel foi seco em papel celofane especial, a temperatura ambiente.

2.6. Caracterização molecular

As estirpes estudadas foram caracterizadas quanto à presença de genes *cry* por meio de reação em cadeia da polimerase - PCR. O DNA total das estirpes foi extraído segundo o protocolo de Bravo *et al.* (1998) modificado.

Para a extração de DNA, as estirpes de *B. thuringiensis* escolhidas foram riscadas em placa de Petri descartável com meio lúria (LB) ou agar e crescidas por 16 horas em estufa à 30°C. Em seguida, uma “alçada” da cultura foi colocada em um eppendorf de 1,5 mL estéril contendo 200 µL de água milli-Q estéril. As amostras foram homogeneizadas em Vortex e congeladas por uma hora à -20°C. Após uma hora, ferveram-se as amostras por 10 min. a 100°C. Durante este período, preparou-se novos tubos estéreis identificados com o nome das estirpes e data da extração. Depois de ferver, as amostras foram deixadas no gelo por dois minutos e centrifugadas por um minuto a 14.000 rpm (Eppendorf 540). O sobrenadante foi retirado e armazenado nos novos eppendorfs na geladeira até sua utilização.

Após a extração de DNA, prepararam-se as reações em cadeia da polimerase. Para as reações de PCR foram utilizados oligonucleotídeos (primers) gerais que reconhecem os

genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry8*, *cry10*, *cry11*, *cry12*, *cry14*, *cry21*, *cry17+27*, *cry19+39*, *cry25*, *cry24+40*, *cry29*, *cry30*, *cry32*, *cyt*, e específicos na identificação de *cry1*, *cry4*, *cry7*, *cry8*, *cry9* e *cry13* (Ceron *et al.*, 1994, 1995; Bravo *et al.*, 1998, Ibarra *et al.*, 2003).

A tabela 4 aponta a seqüência dos primers utilizados e o tamanho esperado do produto da PCR.

Tabela 4. Características dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR.

| Primers | Seqüência | Genes | Bandas de DNA (pb) | Cristal protéico (kDa) |
|--|--|---|---|------------------------|
| <i>cry1</i> Ceron <i>et al.</i> , 1995 | 5'TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA (d) 5'TATCGGTTTCTGGGAAGTA (r) | <i>cry1Aa</i> | 272 | 133 |
| | | <i>cry1Ab</i> | 284 | 130 |
| | | <i>cry1Ac</i> | 272 | 133 |
| | | <i>cry1B</i> | 290 | 140 |
| | | <i>cry1C, D</i> | 284 | 132-134 |
| | | <i>cry1Ea</i> | 275 | 133 |
| | | <i>cry1Eb</i> | 290 | 133 |
| <i>cry1</i> esp. Ceron <i>et al.</i> , 1993 | 5'TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA (d) 5'TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA (r) 5'CAGCCGATTACCTTCTA (d) 5'TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA (r) 5'AACAACATCTGTTCTTGAC (d) 5'CTCTTATTATACTTACACTAC (r) 5'GTTAGATTAATAGTAGTGG (d) 5'TGTAGGTGGTACTGTTATTG (r) 5'CTTCATCACGATGGAGTAA (d) 5'CATAATTTGGTCGTTCTGTT (r) 5'AAAGATCTGGAACACCTTT (d) 5'CAAACCTCTAAATCCTTTCAC (r) 5'CTGCAGCAAGCTATCCAA (d) 5'ATTTC AATTGTCAAGGCCTG (r) | <i>cry1F, Fa</i> | 284 | 132-134 |
| | | <i>cry1Aa</i> | 246 | 133 |
| | | <i>cry1Ad</i> | 171 | 133 |
| | | <i>cry1Ab</i> | 216 | 130 |
| | | <i>cry1Ac</i> | 180 | 133 |
| | | <i>cry1B</i> | 367 | 140 |
| | | <i>cry1C</i> | 130 | 134 |
| | | <i>cry1D</i> | 290 | 132 |
| | | <i>cry3A</i> | 703 | |
| | | <i>cry3B, C</i> | 709 | |
| <i>cry3</i> Ceron <i>et al.</i> , 1995 | 5'TTAACCGTTTTTCGCAGAGA (d) 5'TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG (r) | <i>cry3Cb, Cc</i> | 694 | 73 |
| | | <i>cry3D</i> | 718 | |
| | | <i>cry3F</i> | 652 | |
| | | <i>cry3G</i> | 733 | |
| | | <i>cry4 esp.</i> Ibarra <i>et al.</i> , 2003 | 5'TCAAAGATCATTTC AAAATTACATG (d) 5'CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT (r) 5'CGTTTTCAAGACCTAATAATATAATACC (d) | <i>cry4A</i> |
| <i>cry4B</i> | 321 | 72 | | |

| | | | | |
|--|---|---|-------------------|-------------------|
| Ibarra <i>et al.</i> , 2003 | 5'CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT (r) | <i>cry5Aa,Ab,Ac, cry5B</i> | 474 | 152-142 |
| <i>cry5</i> +12+14+21 Bravo <i>et al.</i> , 1998 | 5'TTCGTAAATTGGTCAATCAAGCAA (d) 5'AAGACCAAATTCAATACCAGGGTT (r) | <i>cry12</i> <i>cry14</i> <i>cry21</i> | 477 483 489 | 142 132 |
| <i>cry8</i> Bravo <i>et al.</i> , 1998 | 5'ATGAGTCCAAATAATCTAAATG (d) 5'TTTGATTAATGAGTTCTTCCACTCG (r) | <i>cry8A</i> <i>cry8B</i> <i>cry8C</i> | 376 | 131 134 130 |
| <i>cry8 esp.</i> Bravo <i>et al.</i> , 1998 | 5'ATGAGTCCAAATAATCTAAATG (d) 5'TCTCCCATATATCTACGCTC (r) | <i>cry8A</i> | 338 | 131 |
| <i>cry8 esp.</i> Bravo <i>et al.</i> , 1998 | 5'ATGAGTCCAAATAATCTAAATG (d) 5'GAACATCTCGTAAGGCTC (r) | <i>cry8B</i> | 510 | 134 |
| <i>cry8 esp.</i> Bravo <i>et al.</i> , 1998 | 5'ATGAGTCCAAATAATCTAAATG (d) 5'GGTACTCGATTGTCCAGT (r) | <i>cry8C</i> | 963 | 130 |
| <i>cry9 esp.</i> Bravo <i>et al.</i> , 1998 | 5'GTTGATACCCGAGGCACA (d) 5'CCGCTTCCAATAACATCTTTT (r) | <i>cry9A</i> | 571 | 130 |
| <i>cry9 esp.</i> Bravo <i>et al.</i> , 1998 | 5'TCATTGGTATAAGAGTTGGTGATAGAC (d) 5'CCGCTTCCAATAACATCTTTT (r) | <i>cry9B</i> | 402 | 130 |
| <i>cry9 esp.</i> Bravo <i>et al.</i> , 1998 | 5'CTGGTCCGTTCAATCC (d) 5'CCGCTTCCAATAACATCTTTT (r) | <i>cry9C</i> | 306 | 130 |
| <i>cry10</i> Ibarra <i>et al.</i> , 2003 | 5'TCAATGCTCCATCCAATG (d) 5'CTTGTATAGGCCTTCCTCCG (r) | <i>cry10</i> | 348 | 78 |
| <i>cry11</i> Bravo <i>et al.</i> , 1998 | 5'TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC (d) 5'CATTCTACTTGAAGTTGTTAATCCC (r) | <i>cry11A</i> <i>cry11B</i> | 305 | 72 81-84 |
| <i>cry13</i> Bravo <i>et al.</i> , 1998 | 5'CTTTGATTATTTAGGTTTGTGATTC (d) 5'TTGTAGTACAGGCTTGTGATTC (r) | <i>cry13</i> | 313 | 88 |
| <i>cry17+27</i> Ibarra <i>et al.</i> , 2003 | 5'CATTGTTCTACTTGGTATAA (d) 5'GATACAATTACATCTCCTCCTGTA (r) | <i>cry17</i> <i>cry27</i> | 832 895 | 72 |
| <i>cry19+39</i> Ibarra <i>et al.</i> , 2003 | 5'AAGCTGCGAATCTGCATTTACTTTT (d) 5'CTCATAATTTTCCGTCATAAAAT (r) | <i>cry19Aa</i> <i>cry19Ba</i> <i>cry39</i> | 616 631 619 | 75 |
| <i>cry25</i> Ibarra <i>et al.</i> , 2003 | 5'GGCTTCTAGATCAGGAGATGG (d) 5'CATCATAATCAGAGCGCAGG (r) | <i>cry25</i> | 560 | 76 |
| <i>cry24+40</i> Ibarra <i>et al.</i> , 2003 | 5'TTATCAATGTAAAGGGATGC (d) 5'ACTGGATCTGTGTATATTTTCCTAG (r) | <i>cry24Aa</i> <i>cry40Aa</i> | 304 366 | 76 |
| <i>cry29</i> Ibarra <i>et al.</i> , 2003 | 5'TCAGCTCCAATAACTGGTG (d) 5'GCATGTCATCCCCTGTCTA (r) | <i>cry29</i> | 451 | |
| <i>cry30</i> Ibarra <i>et al.</i> , 2003 | 5'AACTCACACATCCTCCATCG (d) 5'ATCGAAGGCAATCATTCG (r) | <i>cry30</i> | 265 | |
| <i>cry32</i> Ibarra <i>et al.</i> , 2003 | 5'TGGTCCGGAGAGAATGGATGGA (d) 5'ATGTTTGCACACCATTTTC (r) | <i>cry32Aa</i> <i>cry32Ba</i> <i>cry32Ca</i> <i>cry32D</i> | 677 676 | |
| <i>cyt1</i> Bravo <i>et al.</i> , 1998 | AACCCCTCAATCAACAGCAAGG(d) GGTACACAATACATAACGCCACC(r) | <i>cyt1Aa</i> <i>cyt1Ab</i> | 522 525 | 27 |
| <i>cty2</i> Ibarra <i>et al.</i> , 2003 | ATTACAAATTGCAAATGGTATTCC (d) TTTCAAACATCCACAGTAATTTCAAATGC (r) | <i>cyt2Aa</i> <i>cyt2Ba</i> <i>cyt2Bb</i> <i>cyt2Ca</i> | 355 | 29 |

Para a realização da reação de PCR foi preparado um “Mix” composto de 5 µL do tampão 10 X da enzima Taq DNA polimerase (PHT), 1 µL da mistura dos quatro dNTPs (10 mM cada), 2 µL de cada um dos oligonucleotídeos a 12,5 µM (primer direto e reverso), 0,5 µL da enzima Taq DNA polimerase (PHT) e 29,5 µL de água “Milli-Q”, completando um volume de 40 µL. Nos tubos de polipropileno de 200 µL foi adicionado 10 µL do DNA respectivo e 40 µL do mix anteriormente preparado, totalizando um volume final de 50 µL. As condições de amplificação foram descritas por Ceron *et al.* (1994, 1995) e Bravo *et al.* (1998).

Após amplificação, 20 µL de cada produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio por 10 min. e descorado por 20 min. O gel foi visualizado em fotodocumentador (Eagle Eye Stratagene) e em seguida foi descartado. As estirpes *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk), *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Btt), *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti), *B. thuringiensis* subsp. *medellin* (Btmed) e *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan* (Btjeg) foram utilizadas como padrão.

2.7. Caracterização ultra-estrutural

A caracterização ultra-estrutural foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura. Apenas foram caracterizadas as estirpes que causaram mortalidade acima de 50% nos bioensaios seletivos.

Para isso, utilizaram-se proteínas purificadas e diluídas em 50 µL de água destilada estéril. Estas foram depositadas em suportes metálicos (stubs) e cobertas com ouro por 180

segundos através do metalizador Emitech (modelo K550). As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss (modelo DSM 962), para a análise das formas dos cristais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização morfológica

As 400 estirpes de *B. thuringiensis* analisadas apresentaram morfologia correspondente a *B. thuringiensis*, contendo esporos e cristais de formas variáveis. Algumas estirpes apresentaram mais cristais do que outras.

Segundo Benintende *et al.* (2001), *B. thuringiensis* se diferencia de outros *Bacillus* por conter um corpo paraesporal, com um cristal de natureza protéica dentro da célula mãe. Estes esporos e cristais podem ser facilmente identificados através de microscopia óptica de contraste de fase (Figura 12).

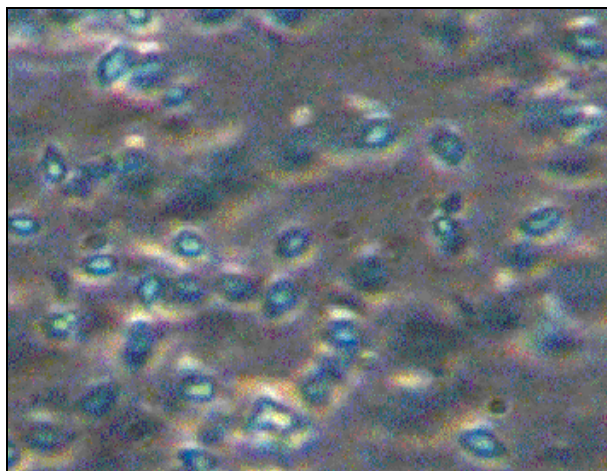


Figura 12. Microscopia de contraste de fase da estirpe de *B. thuringiensis* S1576, em 1.000X de aumento. Sendo ep: esporos.

3.2. Determinação da toxicidade

Das 400 estirpes testadas, 24 causaram mortalidade superior a 20%. Destas, apenas cinco obtiveram mortalidade igual ou superior a 50% nos bioensaios seletivos e foram selecionadas para o bioensaios de dose, realizados em duplicata.

3.2.1. Validação da metodologia proposta

A metodologia descrita foi primeiramente testada através do uso da bactéria *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* transformada com o gene de fluorescência (*gfp*) e em seguida, com as outras estirpes a serem estudadas. A confirmação da metodologia foi satisfatória.

Após a realização do bioensaio com a bactéria transformada, preparou-se um macerado de insetos, para o plaqueamento das amostras em eritromicina. O plaqueamento foi realizado para a verificação do crescimento de colônias naturalmente resistentes ao antibiótico eritromicina, presentes na bactéria com o gene *gfp*. O macerado de *A. gossypii* foi realizado com todos os insetos encontrados, separando-os por repetição. Coletaram-se tanto insetos adultos como ninfas, utilizando 15 a 19 insetos em cada uma das três repetições. Nenhum inseto foi encontrado morto demonstrando que esta estirpe de *B. thuringiensis* não causa dano ao pulgão do algodoeiro.

Em todos os plaqueamentos, realizados com as amostras (macerado) submetidas à choque térmico plaqueadas em meio seletivo com eritromicina, foram obtidas colônias de *B. thuringiensis*. As colônias encontradas apresentaram tamanho médio, coloração

esbranquiçada e opaca, com bordas irregulares, sendo estes aspectos característicos *B. thuringiensis*, de acordo com Benintende e seus colaboradores (2001a).

As lâminas foram preparadas a fresco com as colônias crescidas do plaqueamento, para a observação no microscópio de fluorescência (Axyophoth Zeiss). Em todas as repetições observou-se um grande número de células vegetativas com fluorescência verde (Azevendo *et al.*, 2002), como demonstrado na figura 13. Esta fluorescência permitiu a detecção do *Btk-gfp* no material analisado, confirmando que a bactéria observada era a mesma que foi inoculada na água da planta.

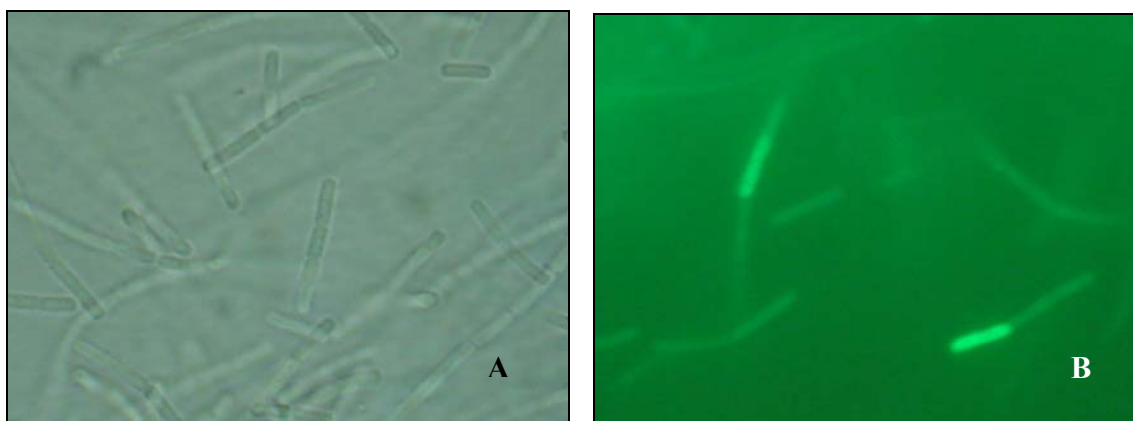


Figura 13. Observação das células de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* com o gene *gfp* através de microscopia de fluorescência, em aumento de 12.000X. **A.** Observação das células sem fluorescência; **B.** Observação das células com fluorescência. Foto: Felipe Ramos.

Através destas microscopias foi confirmado que o *B. thuringiensis* foi absorvido pela planta de algodão com o pedúnculo imerso em água e ainda, sua capacidade em se translocar pela mesma, sendo sugado através do floema pelo inseto, *A. gossypii*. Situação semelhante foi relatada por Monnerat e colaboradores (2003), porém utilizando a lagarta *S.*

frugiperda em plantas de algodão e couve. Eles demonstraram que esta bactéria era capaz de circular na planta e causar mortalidade nas lagartas que desta se alimentavam.

Embora a bactéria inoculada na água tenha sido absorvida pelo xilema da folha, esta foi capaz de se translocar para o floema da planta e ser ingerida pelo pulgão que da seiva do floema se alimentava. Este transporte lateral de água e minerais do xilema para o floema ocorre por meio dos raios vasculares (células parenquimatosas), sendo o movimento descrito por Raven e seus colaboradores (1978).

A partir destes resultados, foi confirmado que a metodologia de bioensaio é eficiente, sendo capaz de fornecer resultados satisfatórios. Deram-se seqüências aos outros bioensaios seletivos utilizando as estipes de *B. thuringiensis* retiradas o banco de germoplasma de *Bacillus spp.*

3.2.2. Bioensaios seletivos

O bioensaio seletivo foi realizado com 400 estipes pertencentes ao banco de *Bacillus spp.* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Das 400 estirpes testadas, apenas 24 causaram um índice de mortalidade igual ou superior a 20%, sendo este índice considerado baixo para a produção de um produto sistêmico ou planta transgênica, visando o controle de *A. gossypii* (Tabela 5).

As estirpes S29, S40, S616, S1168 e S1576 foram as mais tóxicas contra *A. gossypii*, causando mortalidade superior a 50%, sendo selecionadas para o bioensaio de dose. Dentre estas, a estirpe S29 e S1168 foram as mais eficazes no bioensaio seletivo entre as estirpes analisadas, causando 76 e 73% de mortalidade, respectivamente, contra *A. gossypii*.

Resultados semelhantes foram encontrados por Wellman-Desbiens e Côté (2004) em um experimento realizado com ninfas de 2º instar do percevejo *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) tratados com a cultura crescida de *B. thuringiensis* em dieta artificial. As estirpes testadas obtiveram mortalidade de aproximadamente 98% contra *L. hesperus*, depois de sete dias de ensaio.

O percentual de mortalidade encontrado nos controles negativos dos bioensaios seletivos foi no máximo de 10%.

Tabela 5. Resultados de mortalidade das estirpes que causaram mortalidade igual ou acima de 20% no pulgão do algodoeiro.

| Estirpes | Subespécies | Mortalidade (%) |
|-----------------|-----------------------|------------------------|
| 13 | — | 20,0 |
| 29 | — | 76,0 |
| 40 | — | 60,0 |
| 84 | — | 20,0 |
| 93 | <i>kurstaki</i> | 40,0 |
| 97 | — | 20,0 |
| 112 | — | 20,0 |
| 135 | <i>tolworthi</i> | 33,0 |
| 142 | — | 33,3 |
| 146 | — | 20,0 |
| 185 | — | 23,3 |
| 394 | — | 36,6 |
| 464 | — | 23,3 |
| 468 | — | 20,0 |
| 467 | — | 23,3 |
| 468 | — | 20,0 |
| 546 | <i>kurstaki</i> | 23,3 |
| 473 | — | 26,6 |
| 475 | — | 20,0 |
| 616 | <i>aizawai</i> | 63,3 |
| 701 | <i>kurstaki</i> | 20,0 |
| 764 | <i>kurstaki</i> | 20,0 |
| 907 | — | 23,3 |
| 1168 | — | 73,33 |
| 1176 | <i>kurstaki</i> | 20,0 |
| 1269 | <i>thuringiensis</i> | 43,33 |
| 1576 | <i>aizawai</i> | 56,6 |
| 1989 | <i>israelensis</i> | 26,6 |

O baixo percentual de mortalidade e pequeno número de estirpes eficazes contra o pulgão do algodoeiro indicam que o modo de alimentação e o sistema digestivo do inseto sugador dificultam a ação do *B. thuringiensis*. O contrário disto é observado na facilidade com que os insetos desfolhadores, como lepidópteros e coleópteros, e os insetos filtradores como dípteros, ingerem a bactéria demonstrando que o modo de alimentação influencia a suscetibilidade do inseto às proteínas Cry (Wellman-Desbiens & Cote, 2004).

Os resultados obtidos no bioensaio seletivo realizado com os sobrenadantes da purificação das proteínas das estirpes S29, S40, S616, S1168 e S1576 foi de no máximo 16% de mortalidade, nas três repetições. A mortalidade mais alta foi obtida com a estirpe S1168, enquanto as outras estirpes apresentaram apenas 10% de mortalidade. Isto indica que nenhum dos metabólitos solúveis secretados pelas estirpes no sobrenadante possui capacidade de causar uma mortalidade significativa para o pulgão do algodoeiro.

3.2.2. Bioensaios de dose

Através do bioensaio seletivo foi possível identificar as cinco estirpes com maior potencial para o controle de *A. gossypii*, pois a técnica de bioensaios é a única que prova o nível de toxicidade das estirpes testadas (Benintende *et al.*, 2001).

As bandas de cristais purificadas de cada estirpe foram observadas em microscópio de contraste de fase, para a análise da presença e quantidade de cristais. As estirpes S616 e S1576 apresentaram uma alta concentração de cristais nas bandas purificadas, diferentemente da S29 que apresentou uma baixa concentração de cristais. Estas bandas foram utilizadas para realização de bioensaios.

O bioensaio seletivo com as bandas obtidas na purificação de cristais permitiu que fosse escolhida para cada estirpe a banda que apresentasse maior índice de mortalidade, para realização do bioensaio de dose. Para as estirpes S29, S1168 e S1576 foram escolhidas a banda dois, que se formou entre os gradientes de 54% e 68% e, para as estirpes S40 e S616 a banda de número três, que se formou entre os gradientes de 68% e 72%. As estirpes S616 e S40 obtiveram maior porcentagem de mortalidade contra *A. gossypii* no bioensaio seletivo com as bandas purificadas. A estirpe S29 apresentou pouca quantidade de cristal purificando não sendo suficiente para realização dos bioensaios de dose.

No bioensaio de dose, a análise estatística através do Probit (Finney, 1971) para cálculo da CL_{50} (concentração letal para matar 50% da população testada) demonstra que quanto menor for o valor da CL_{50} apresentado pela estirpe testada, maior sua toxicidade, pois é necessária uma menor quantidade de proteína para obter um bom resultado.

Bioensaios de dose com a bactéria *Dickeya dadantii* em doses baixas apresentaram alta virulência em dieta artificial contra o pulgão da pêra (*Acyrtosiphon pisum*) (Grenier *et al.*, 2006). Por serem os genes da *D. dadantii* homólogos aos encontrados na família *cyt* de *B. thuringiensis*, sugere-se que *B. thuringiensis* poderia ser tóxico ao pulgão do algodoeiro tanto em bioensaios seletivos como de dose.

Nos resultados dos bioensaios de dose, a estirpe S616 apresentou a menor CL_{50} dentre as estirpes testadas (Tabela 6), embora todas as estirpes testadas não tenham apresentado diferença estatística de toxicidade contra *A. gossypii*. A segunda estirpe com menor valor absoluto de CL_{50} foi a S40.

Tabela 6. Resultados dos bioensaios de dose, em duplicata, contra *Aphis gossypii*.

| Estirpe | N | CL₅₀ (mg/mL) | Intervalo de confiança a 95% |
|----------------|----------|--------------------------------|-------------------------------------|
| S40 | 20 | 3,14 | 1,92 –7,49 |
| S616 | 20 | 2,51 | 1,08–28,37 |
| S1168 | 20 | 15,40 | 4,54–5.584.561 |
| S1576 | 20 | 3,37 | 1,79–15,98 |

Sendo n: número total de indivíduos testados e CL₅₀ concentração letal para 50% da população.

O valor absoluto da CL₅₀ da estirpe S616 foi numericamente 0,63, 0,86 e 12,89 vezes menor que das estirpes S40, S1576 e S1168, respectivamente. Já o da estirpe S40 foi numericamente menor que das estirpes S1576 e S1168.

Todas as estirpes, apesar de apresentarem valores de CL₅₀ distintos, não apresentaram diferenças estatísticas entre si, pois seus intervalos de confiança se sobrepuseram. O percentual de mortalidade encontrado nos controles negativos dos bioensaios de dose foi de no máximo 5%.

A estirpe S1168 apresentou uma CL₅₀ superior a todas as estirpes testadas, obtendo uma CL₅₀ aproximadamente 12 vezes maior que a das outras estirpes, embora não tenham sido estatisticamente diferentes. Esta estirpe não deverá ser indicada para a produção em larga escala para o controle de *A. gossypii*, devido a grande quantidade de material que deverá ser utilizado para o controle deste inseto, em comparação com as outras estirpes, devido a um possível alto custo em sua produção.

A estirpe S1168 foi a segunda mais eficaz nos bioensaios seletivos com a bactéria crescida. Com relação ao bioensaio com o sobrenadante, esta estirpe apresentou resultado

superior a todas as outras, porém o mesmo não foi observado no valor da CL_{50} utilizando proteína purificada. Observou-se que esta estirpe possui muitos cristais pequenos, que podem ter sido perdidos durante o processo de purificação, no sobrenadante e nas outras bandas do gradiente de sacarose e, talvez as proteínas ativas contra este inseto possam estar cristalizadas nestas pequenas inclusões, o que também pode justificar o maior valor de CL_{50} dentre todas as estirpes no bioensaio de dose.

Ensaio realizado por Wellman-Desbiens e Cote (2004) concluíram que proteínas de *B. thuringiensis* das subespécies *thuringiensis*, *morrisoni*, *tolworthi* e *darmstadiensis* solubilizadas com tripsina causaram uma mortalidade de 77 a 100% contra ninfas de 2º instar do percevejo do algodoeiro, *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) depois de sete dias de ensaio. Estes resultados demonstram que algumas estirpes de *B. thuringiensis* apresentam proteínas que são capazes de controlar pragas da Ordem Hemiptera encontradas no algodoeiro, corroborando os resultados encontrados neste trabalho para pulgão do algodoeiro.

Os pulgões encontrados mortos durante os bioensaios de dose perderam o brilho, adquirindo tonalidade de cor avermelhada à marrom-escuro, não chegando a ficar com a coloração preta. Apresentaram início de deterioração dos tecidos sem o rompimento do tegumento (Figura 14). Estes aspectos apresentados pelas ninfas de *A. gossypii* são característicos de insetos mortos pela ação de *B. thuringiensis*, estando de acordo com Habib & Andrade (1998), Monnerat & Bravo (2000) e Loguercio (2002), para lepidópteros.



Figura 14. *A. gossypii* com infecção característica por *B. thuringiensis*, encontrado no bioensaio de dose com a estirpe S616. Foto: Felipe Ramos.

Provavelmente, o pulgão depois de contaminado por uma bactéria, não é capaz de transmitir a bactéria ingerida da planta para outras plantas, devido ao tamanho do filtro presente no estilete do inseto (Grenier *et al.*, 2006). Com isso, este inseto não será capaz de disseminar *B. thuringiensis* para outras plantas livres da bactéria, agindo somente onde este foi inoculado.

3.3. Caracterização bioquímica

O perfil protéico das 24 estirpes selecionadas no bioensaio seletivo foi obtido a partir de extração de proteína descrito por Lecadet e colaboradores (1991) resolvidos em gel desnaturante de SDS-PAGE 12%. A tabela 7 mostra os resultados obtidos nesta caracterização.

Tabela 7. Perfil protéico das estirpes selecionadas nos bioensaios seletivos contra *A. gossypii*.

| Estirpes | Perfil protéico (KDa) |
|-----------------|------------------------------|
| 13 | 50, 25 |
| 29 | 100, 72, 65 |
| 40 | 65, 50 |
| 84 | 65, 50, 20 |
| 93 | 130 |
| 97 | 130, 50, 20 |
| 112 | 75, 65, 49, 25 |
| 135 | 70-50, 18 |
| 142 | 65, 50, 30, 20 |
| 146 | 65, 50, 45, 30, 20 |
| 185 | 130, 20 |
| 394 | 50, 27 |
| 467 | 100, 25 |
| 468 | 100, 25 |
| 546 | 60, 50 |
| 473 | 25 |
| 475 | 100, 43, 25 |
| 616 | 130, 50 |
| 701 | 140 |
| 764 | 130, 65 |
| 907 | 130, 50, 30, 20 |
| 1168 | 80, 65, 50 |
| 1176 | 130, 65 |
| 1269 | 50 |
| 1576 | 130, 73, 65 |
| 1989 | 150, 72, 29 |

A maior parte das estirpes apresentaram um perfil protéico contendo uma banda de 130 e 65 kDa, sendo este perfil, característico de estirpes ativas contra lepidópteros e coleópteros (Crickmore *et al.*, 2007). Este resultado sugere que esta proteína possa ter alguma atividade tóxica contra o *A. gossypii*, devido a sua presença observada diversas vezes nas estirpes testadas.

As cinco melhores estirpes estudadas apresentaram diferentes perfis protéicos com bandas variando entre 50-130 kDa (Figura 15).

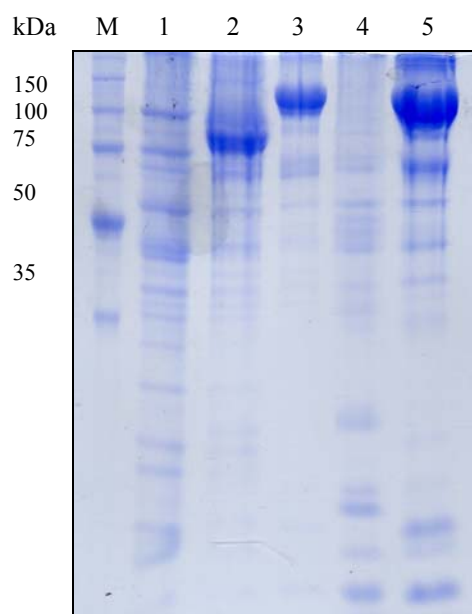


Figura 15. Análise das proteínas das estirpes que obtiveram mortalidade igual ou acima a 50%, em gel SDS-PAGE corado com Comassie Blue. Sendo M: marcador de peso molecular, 1: S29; 2: S1168; 3: S616; 4: S40; e 5: S1576.

3.4. Caracterização molecular

As cinco melhores estirpes foram caracterizadas quanto ao conteúdo de genes *cry* por reação em cadeia da polimerase (PCR), pois esta técnica permite uma rápida determinação da presença ou ausência de seqüências conhecidas. É uma caracterização altamente sensível e relativamente rápida (Benintende *et al.*, 2001b).

As amplificações foram consideradas positivas apenas quando o fragmento específico amplificou no tamanho esperado em gel de agarose 1,5%. Os resultados de PCR foram considerados negativos, se nenhuma amplificação foi obtida depois de duas tentativas. Somente as estirpes S616 e S1576 apresentaram produtos de amplificação de PCR para alguns dos genes testados.

A estirpe S616 possui o gene *cry8* e apresentou uma banda de proteína de 130 kDa, que corresponde ao produto de expressão deste gene (Figura 16). Esta estirpe foi a que apresentou maior toxicidade nos bioensaio de dose realizados com a proteína pura. Isto indica que o gene *cry8* pode estar relacionado à patogenicidade de estirpes de *B. thuringiensis* para *A. gossypii*, estando de acordo com a literatura, onde Habib e Andrade (1998) e Monnerat e Praça (2006), citam a dupla atividade do gene *cry8* para afídeos e coleópteros.

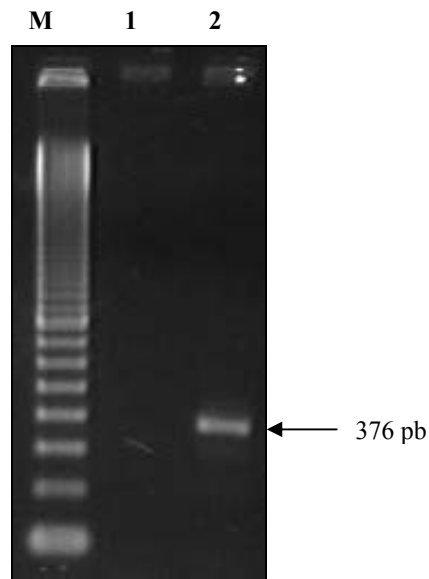


Figura 16. Análise do gene *cry8* da estirpe S616, em gel de agarose 1,5%. Sendo M: Marcador; 1: controle negativo; e 2: S616.

A estirpe S1576 apresentou produtos de amplificação para os genes *cry1Aa*, *cry1D* e *cry2* e seu perfil protéico foi de 130 e 70 kDa, que correspondem, respectivamente a estes genes (Figura 17). A estirpe S1576, conhecida como *B. thuringiensis* subsp. *azawai* HD-137, é utilizada para o controle de diversa espécies de lepidópteros, devido a presença de genes das famílias *cry1* e *cry2*, e seu perfil protéico semelhante ao do padrão para lepidópteros, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Lereclus *et al.*, 1993). Sendo ainda base do produto biológico Xentari®, ativo para esta ordem de insetos. Esta estirpe pode apresentar até cinco genes codificadores de proteínas Cry (Bourgouim *et al.*, 1988). Entretanto, algumas estirpes de *B. thuringiensis* que possuem mais de um *cry* gene podem ser ativas contra diferentes insetos (Swiecicka & Mahillon, 2005), podendo este ser o caso da ação desta estirpe contra o pulgão do algodoeiro.

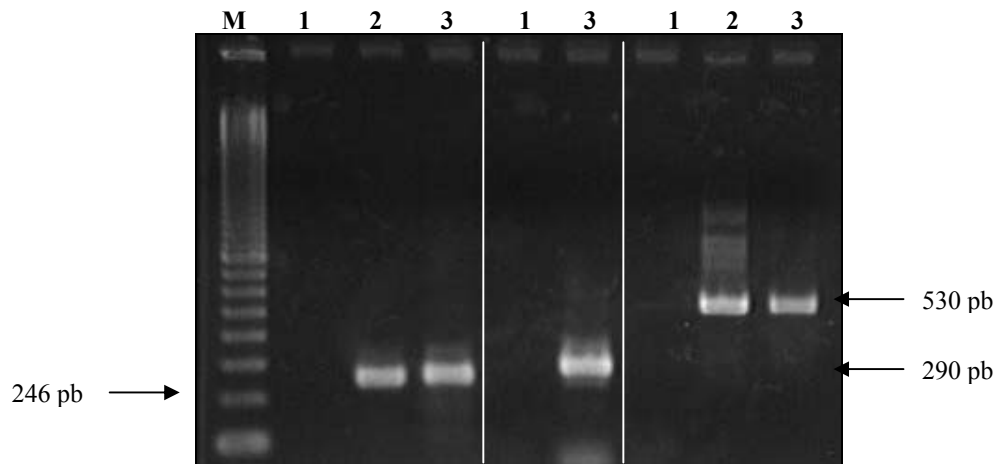


Figura 17. Análise dos genes *cry1Aa*, *cry1D* e *cry2* da estirpe S1576, em gel de agarose 1,5%. Sendo M: Marcador; 1: controle negativo; 2: Controle positivo (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* - Btk); e 3: S1576.

Os genes *cry1* e *cry2* observados na estirpe S1576 são os genes mais frequentemente encontrados nas coleções de *B. thuringiensis* espalhadas pelo mundo (Bravo *et al.*, 1998). Wang *et al.* (2003) avaliaram a distribuição de genes *cry* na China e confirmaram o alto índice dos genes *cry1A* (67.7%), *cry1I* (60.6%), *cry1C* (43.9%), *cry1D* (39.4%) e *cry2* (15,5%) nas estirpes de *B. thuringiensis* analisadas em suas pesquisas. Assim como, as estirpes que foram recuperadas do intestino de pequenos roedores no norte da Polônia (Swiecicka & Mahillon, 2005).

Os resultados encontrados sugerem que as proteínas Cry1Aa, Cry1D, Cry2 e Cry8 podem ter atividade contra o *A. gossypii*. Porém, para uma melhor conclusão da ação destas proteínas, estas necessitam ser caracterizadas por bioensaios separadamente contra o inseto-alvo (Swiecicka & Mahillon, 2005).

Já foi demonstrado que a proteína Cry3A apresenta atividade contra o pulgão da batata, *Macrosiphum euphorbiae* Thomas (Walters & English, 1995), indicando que as

proteínas presentes no *B. thuringiensis* podem ser ativas contra afídeos. Porém, as estirpes testadas não apresentaram genes da família *cry3*.

As outras estirpes não amplificaram ou produziram bandas de tamanhos inespecíficos indicando que a atividade contra o pulgão do algodoeiro pode estar relacionada a produtos de expressão de genes não testados ou ainda não identificados. Segundo Benintende e seus colaboradores (2001b), quando o produto da PCR apresenta uma migração ligeiramente diferente da esperada, isto permite a identificação novos genes.

Wu e Guo (2003) afirmam que a utilização de algodão transgênico com o gene *cry1A* tóxico para a lagarta *Helicoverpa armigera* é capaz de prevenir a resurgência de *A. gossypii* devido à baixa utilização de inseticidas. Este resultado indica que a utilização de uma variedade que possua um gene específico para o pulgão auxiliará ainda mais neste controle, sendo os genes *cry1Aa*, *cry1D*, *cry2* e *cry8* possíveis candidatos.

3.5. Caracterização ultra-estrutural

A forma dos cristais pode indicar a atividade inseticida de uma estirpe (Habib & Andrade, 1998; Lereclus *et al.*, 1993), desta forma, os cristais encontrados nas cinco estirpes analisadas podem ter associação com os genes obtidos através da caracterização molecular.

As estirpes S29 e S40 apresentaram cristais esféricos. Já as estirpes S616, S1168 e S1576 possuem cristais esféricos e bipiramidais. (Figura 18).

Os cristais bipiramidais podem estar associados a proteínas da família Cry1 e os cristais redondos a proteínas da família Cry2 (Agaisse & Lereclus, 1995; Monnerat &

Bravo, 2000). A estirpe S1576 apresentou os genes *cryIAa* e *cryID* podendo estes ter associação com os cristais bipiramidais, e os cristais esféricos com o gene *cry2* observados na microscopia eletrônica de varredura.

Os cristais esféricos e os bipiramidais foram observados em grande parte estirpes testadas, indicando que estes tipos de cristais podem ter alguma ação tóxica para o pulgão do algodoeiro. Segundo Bobrowski (2003), o espectro de ação de diferentes isolados de *B. thuringiensis* depende da combinação das endotoxinas individuais presentes no cristal.

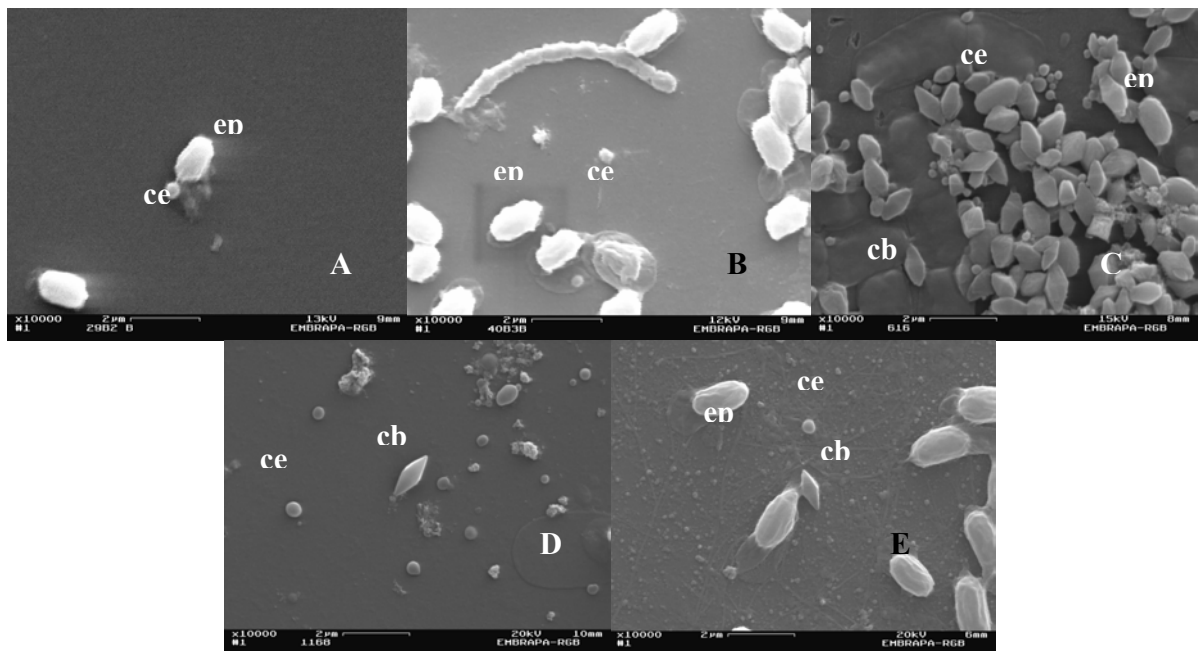


Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura das proteínas purificadas de *B. thuringiensis* S29 (A), S40 (B), S616 (C), S1168 (D) e S1576 (E). Sendo ce: cristal esférico, cb: cristal bipiramidal, ep: esporo.

4. CONCLUSÕES

Através dos estudos realizados nesta pesquisa foi confirmado que *B. thuringiensis* tem ação tóxica contra o pulgão do algodoeiro, quando utilizado de forma sistêmica na planta de algodão.

Das 400 estirpes de *B. thuringiensis* armazenadas no Banco de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, cinco delas causaram mortalidade acima de 50% nos bioensaios seletivos contra *A. gossypii*. Embora as estirpes S40, S616, S1168 e S1576 tenham apresentado valores absolutos de CL_{50} diferentes nos testes de toxicidade, não houve diferenças estatísticas entre a atividade dos quatro isolados. Dentre elas, a estirpe *B. thuringiensis* subsp. *azawai*, S616, foi a que apresentou um menor valor, com uma CL_{50} de 2,51 mg/mL no bioensaio de dose contra *A. gossypii*. Esta estirpe apresentou uma banda de proteína de 130 kDa, que corresponde ao produto de expressão do gene *cry8*, por ser um gene ativo contra afídeos, poderá vir a ser uma forte candidata como base de um bioinseticida sistêmico.

Além do gene *cry8* da estirpe S616, foram detectados os genes *cry1Aa*, *cry1D* e *cry2* na estirpe S1576 que poderão ser utilizados no futuro para testes a fim de se conhecer e confirmar quais destas toxinas são responsáveis pela toxicidade a *A. gossypii* e se elas agem individual ou conjuntamente.

A busca de uma estirpe que apresente características favoráveis e alta patogenicidade contra *A. gossypii*, para a produção de bioinseticidas sistêmicos ou plantas transgênicas, é um trabalho inicial, onde pesquisas deverão ser realizadas para selecionar novas estirpe ou gene mais tóxico para este inseto-alvo.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Ensaio de ligação com BBMV's (proteínas da borda da membrana intestinal) de *A. gossypii* usando proteínas purificadas;
- Expressão dos genes codificadores das toxinas Cry1, Cry2 e Cry8 para purificação e bioensaio com toxinas isoladas para *A. gossypii*;
- Clonagem e seqüenciamento das bandas amplificadas inespecificamente para tentar identificar possíveis genes que podem codificar toxinas ativas para *A. gossypii*;
- Ensaio de Imunocitoquímica com cortes de intestino de *A. gossypii* usando proteínas purificadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAISSE, H & LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **Journal of Bacteriology**. v. 177, 6027-6032 p., 1995.

AZEVEDO, J. L.; JÚNIOR, W. M.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 433 p.

BENINTENDE, G.; GLEN, A.; IBARRA, J.; BRAVO, A; ESPINOSA, A. *Bacillus thuringiensis e Bacillus sphaericus*. 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 em investigación sobre bacterias entomopatógenas**. México, D.F., UNAM, 2001a.

BENINTENDE, G.; IBARRA, J.; BRAVO, A. Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis*. . In: BRAVO, A.; ARRIETA, G.; BENINTENDE, G.; REAL, M.; ESPINOZA, A. M.; IBARRA, J.; MONNERAT, R.; ORDUZ, S.; SOBERÓN, M. **Metodologias utilizadas em investigación sobre bacterias entomopatógenas**. México, D.F., UNAM, 2001.

BOBROWSHI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G. & BODANESE-LANETTINI, H. H. Genes de *B. thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**.

BOURGOUIN, C.; DELÉCLUSE, A.; RIBIER, J.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. A *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* gene encoding a 125-kilodalton larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences. **Journal of Bacteriology**. v. 170, 3575-3583 p., 1988.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, 248-254 p., 1976.

BRAVO, A. & SILVA-FILHA, M. H. Purificación de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. IN: BRAVO, A.; ARRIETA, G.; BENINTENDE, G.; REAL, M.; ESPINOZA, A. M.; IBARRA, J.; MONNERAT, R.; ORDUZ, S.; SOBERÓN, M. **Metodologías utilizadas em investigación sobre bacterias entomopatógenas**. México, D.F., UNAM, 2001.

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

BURGIO, G.; LANZONI, A.; ACCINELLI, G.; DINELLI, G.; BONETTI, A.; MAROTTI, I.; RAMILLI, F. Evaluation of Bt-toxin uptake by the no-target herbivore *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), feeding on transgenic oilseed rape. **Bulletin of Entomological Research**. v. 97, 211-215 p., 2007.

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

CERON, J.; ORTIZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECA, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, 3826-3831 p., 1995.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.; FEITELSON, J.; SCHENEPEF, E.; VAN, R.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: <www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore>. Acesso em: 01 de outubro de 2007.

FINNEY, D. **Probits analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. p. 80.

GALLO, D. (IN MEMORIAN); NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P.; BATISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. & OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. vol.10. 920 p.

GRENIER, A.; DUPORT, G.; PAGÈS, S.; CONDEMINE, G.; RAHBÉ, Y. The phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chysanthemi* 3937) is a pathogen of the pea aphid. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, 1956-1965 p., 2006.

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

IBARRA, J. E.; RINCÓN, M. C.; ORDÚZ, S.; NORIEGA, D.; BENNINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; OLIVEI in RA, C. M. F.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M. H.; SÁNCHEZ, S.; PEÑA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains from Latin America with Insecticidal Activity against Different Mosquito Species. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, 5269-5274 p., 2003.

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

LECADET, M. M.; CHAUF AUX, J.; RIBIER, J.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and

transformation. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington. v. 58, 840-849 p., 1991.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A. & LECADET, M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTEWISTLE, P.; CORY, J.; BAILEY, M.; HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice**. New York, 1993. 69 p.

LOGUERCIO, L.L.; CARNEIRO, N. P.; CARNEIRO, A. A. Milho Bt. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. nº 21, 46-50 p., 2002.

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

MONNERAT, R.G. & PRAÇA, L. B. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. In: OLIVEIRA-FILHO, E. C. & MONNERAT, R. G. **Fundamentos para a Regulação de Semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Brasília: Embrapa Cerrados, 2006. 352 p.

MONNERAT, R. G.; SANTOS, R. C.; BARROS, P. C.; BATISTA, A.; BERRY, C. **Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 04 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 98), 2003.

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

RAVEN, P. H.; EVERT, R.; CURTIS, H. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1978. 2° ed, 728 p.

RAVEN, P. H.; EVERT, R.; EICHHORN, S. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001. 6° ed, 906 p.

SLOSSER, J. E.; PARAJULEE, M.; HENDRIX, D.; HENNEBERRY, T.; PINCHAK, W. Cotton aphid (Homoptera: Aphididae) abundance in relation to cotton leaf sugars. **Environmental Entomology**. v. 33, 690-699 p., 2004.

SWIECICKA, I. & MAHILLON, J. The clonal structure of *Bacillus thuringiensis* isolates from north-east Poland does not correlate with their *cry* gene diversity. **Environmental Microbiology**. v. 7, 34-39 p., 2005.

WALTERS, F. W. & ENGLISH, L. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* endotoxins toward the potato aphid in an artificial diet bioassay. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v. 77, 1995.

WANG, J.; BOETS, A.; VAN RIE, J.; REN, G. Characterization of *cry1*, *cry2*, and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 82, 2003.

WELLMAN-DESBIENS, E. & CÔTÉ, J. Screening of the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains against *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) nymphal population. **Journal of Economical Entomology**. v. 97, 251-258 p., 2004.

WU, K. & GUO, Y. Influences of *Bacillus thuringiensis* Berliner cotton planting on population dynamics of the Cotton Aphis, *aphis gossypii* Glover, in Northern China. **Environmental Entomology**. v. 32, 312-318 p., 2003.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes**. New York, NY. v. 03, 315-343 p., 1984.