



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

***Bacillus thuringiensis* COMO ENDOFÍTICOS EM ALGODÃO:
AVALIAÇÃO NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE DE
*Spodoptera frugiperda***

FLÁVIA SANTANA SOUZA DA COSTA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA/DF

FEVEREIRO/2014



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

***Bacillus thuringiensis* COMO ENDOFÍTICOS EM ALGODÃO:
AVALIAÇÃO NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE DE
*Spodoptera frugiperda***

FLÁVIA SANTANA SOUZA DA COSTA

ORIENTADORA: ROSE GOMES MONNERAT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

PUBLICAÇÃO 68/2014

BRASÍLIA/DF

FEVEREIRO/2014

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

***Bacillus thuringiensis* COMO ENDOFÍTICOS EM ALGODÃO:
AVALIAÇÃO NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE DE
*Spodoptera frugiperda***

FLÁVIA SANTANA SOUZA DA COSTA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM AGRONOMIA.

APROVADA POR:

Rose Gomes Monnerat, Ph.D. Pesquisadora Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Orientadora) CPF 512.803.701-86
e-mail: rose.monnerat@embrapa.br

Maria Lucrécia Gerosa Ramos, Ph.D. Professora Associada UnB - FAV (Examinador interno) CPF 002.094.438-12
e-mail: lucrecia@unb.br

Roseane Cavalcanti dos Santos, Dra. Pesquisadora da Embrapa Algodão (Examinador externo) CPF 174.693.334-87
e-mail: roseane.santos@embrapa.br

BRASÍLIA/DF, 25 de FEVEREIRO de 2014.

FICHA CATALOGRÁFICA

Santana, Flávia Souza da Costa

***Bacillus thuringiensis* como endofíticos em algodão: avaliação na promoção de crescimento e controle de *Spodoptera frugiperda*.** / Flávia Santana Souza da Costa; orientação de Rose Gomes Monnerat. - Brasília, 2014.

99 p. : il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014.

1. *Gossypium hirsutum*. 2. Endofítico. 3. Crescimento de plantas. 4. Biocontrole.

I. Monnerat, R. G. II. PhD.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Flávia Santana Souza da Costa

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ***Bacillus thuringiensis* como endofíticos em algodão: avaliação na promoção de crescimento e controle de *Spodoptera frugiperda*.**

GRAU: Mestre

ANO: 2014

É concedida à Universidade de Brasília 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.

Flávia Santana Souza da Costa

CPF: 623.525.471-72

QND 49, lote 24, casa 01. Taguatinga Norte

CEP 72.120-490 - Brasília-DF

Tel.: (61) 3877.3735 / 9949.1302

e -mail: flaviasantana_agr@hotmail.com

Dedico em especial aos meus amores Osmar e Hellen, à minha família, que, com seu carinho, compreensão e ajuda também comigo caminharam. Junto à eles obtia energia e coragem, imprescindíveis para continuar e produzir mesmo em momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à **Deus** acima de todas as coisas.

Agradeço à minha orientadora, **Dra. Rose Monnerat**, pela oportunidade, confiança e pelo privilégio de fazer parte de sua equipe de pesquisa.

À **Dra. Lílian Praça** pela amizade, paciência e apoio no planejamento e execução dos experimentos.

Ao **Dr. Paulo Queiroz** pelo incentivo, pela disponibilidade e o apoio de sempre.

Ao **Dr. Marcelo Soares** pela boas ideias e também pelo incentivo.

À **Dra. Roseane Santos** pela gentileza ao conceder as sementes de algodão e pelo apoio no planejamento inicial do trabalho.

À **Ana Cristina Menezes** por sua ternura de sempre ao falar. Pela colaboração e agradável convivência no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Embrapa-Cenargen.

À **Dra. Érica Martins** pelas valiosas dicas e pela gentileza ao compartilhar o conhecimento.

Ao meu marido **Osmar Santana** e minha filha **Hellena** infinitos agradecimentos pela incrível paciência, tolerância, companheirismo, por entender minha ausência e pelo apoio nas minhas decisões, sempre com muito carinho.

Aos meus pais **Lázaro de Souza** e **Iria Santana** pela base e cuidados com a minha formação. Aos irmãos **Danilo** e **Silvestre** - "Os Santana" - tão somente pelo amor que nos une.

À **Prof^ª. Maria Lucrécia** por aceitar o convite e participar da banca examinadora.

Aos colegas do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa-Cenargen: **Cris Macedo, Carla Caixeta, Elias Sabiá, Fernanda Bernardes, Neila Damasceno, Luiza Arlete, Zezinho**, pelo apoio e valiosa ajuda.

Aos amigos **Marcelo Castro** e **Sandro Montalvão** pela amizade, críticas construtivas e pela alegre convivência.

À amiga **Lunalva Sallet** pelo companheirismo, amizade e pelo apoio importante na execução dos trabalhos.

À amiga **Clarinha Motta** por suas doses de doçura diária.

À **Renata Timbó** e **Luciana Ramalho** pela gentileza e colaboração.

Às pessoas que conheci durante este período: **Gabi, Anita, Antônio, Tati, Marcelo "Buda"**.

Aos funcionários dos Departamentos de Controle Biológico, com quem tive uma boa convivência.

A todos os colegas do PPG de Agronomia da UnB, ao **Profº José Ricardo Peixoto** coordenador do curso e à **Rosana Balbino**, secretária do programa de pós-graduação, por toda a atenção.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na elaboração deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigada!

ÍNDICE

ÍNDICE.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Cultura do Algodoeiro	3
2.2 Pragas da cultura do algodão	4
2.3 <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797).....	6
2.4 <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner,1911)	8
2.5 Microrganismos endofíticos.....	11
3. HIPÓTESES.....	14
4. OBJETIVOS.....	14
4.1 Objetivo Geral.....	14
4.2 Objetivos Específicos	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

CAPÍTULO I - Avaliação da ação endofítica de *Bacillus thuringiensis* no desenvolvimento vegetativo de genótipos de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) em resposta a dois métodos de inoculação

RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.1 Estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i>	26
2.2 Material Vegetal.....	26
2.3 Preparo e liofilização das estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i>	26
2.4 Contagem de esporos.....	27
2.5 Ensaio de promoção de crescimento no estágio vegetativo de plantas do algodoeiro após inoculação por <i>B. thuringiensis</i>	29
2.5.1. Inoculação das estirpes de <i>B. thuringiensis</i> via sementes.....	30
2.5.2. Inoculação das estirpes de <i>B. thuringiensis</i> via plantas.....	30
2.5.3 Avaliação do desempenho e desenvolvimento das plantas.....	31
2.6 Bioensaio com <i>Spodoptera frugiperda</i> em plantas.....	32
2.7 Teor nutricional de plantas inoculadas com <i>B. thuringiensis</i>	35
2.8 Autoradiografia de plantas de algodão colonizadas pelas estirpes de <i>B. thuringiensis</i> marcadas com Metionina ³⁵ S.....	36
2.9 Observação de <i>B. thuringiensis</i> em sementes de algodão inoculadas utilizando microscopia eletrônica de varredura.....	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

CAPÍTULO II - Inoculação de sementes de algodão com diferentes concentrações de *Bacillus thuringiensis* e avaliação da ação e colonização endofítica na promoção de crescimento e biocontrole

RESUMO.....	69
ABSTRACT.....	70
1. INTRODUÇÃO.....	71
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
2.1 Ensaio de promoção de crescimento após inoculação de <i>B. thuringiensis</i> em sementes de algodão.....	73
2.1.1 Inoculação de diferentes concentrações da estirpe S2122 de <i>B. thuringiensis</i> em sementes da cultivar BRS 8H.....	73
2.1.2 Avaliação do desempenho e desenvolvimento das plantas.....	73
2.2 Bioensaio "in vitro" com <i>S. frugiperda</i> utilizando folhas de plantas de algodão.....	75
2.4 Detecção de <i>B. thuringiensis</i> nas estruturas das plantas do algodão por microscopia eletrônica de varredura.....	76
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	91
ANEXOS.....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lavoura de algodão em pós emergência de plantas e capulho de algodão com exposição da fibra.

Figura 2 - Estágios de desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda*.

Figura 3 - Esquema do modo de Ação de toxinas Cry para lepidópteros.

Figura 4 - Equipamentos usados no preparo das amostras. Fermentador em funcionamento com crescimento bacteriano e liofilizador durante a secagem do material bacteriano concentrado.

Figura 5 - Esquema representativo do procedimento das diluições em série.

Figura 6 - Ilustração do procedimento para determinação da concentração de células bacterianas. Processo de diluição em série e plaqueamento.

Figura 7 - Inoculação de um mL da suspensão bacteriana em plantas de algodão e experimento em casa de vegetação.

Figura 8 - Larvas se alimentando da dieta após a eclosão e gaiolas de adultos de *Spodoptera frugiperda*.

Figura 9 - Bioensaio *in vivo* em plantas de algodão e *S. frugiperda*.

Figura 10 - Segundo momento do bioensaio no qual as lagartas foram colocadas em dieta artificial.

Figura 11 - Equipamentos utilizados para preparo e visualização das amostras por microscopia eletrônica de varredura.

Figura 12 - Índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes tratadas com estirpes de *B. thuringiensis* nas cultivares de algodão BRS 8H, BRS Aroeira e BRS 286.

Figura 13 - Altura de plantas do algodoeiro da cultivar BRS 8H inoculadas com *B. thuringiensis* na semente e na planta ao longo de quatro semanas.

Figura 14 - Altura de plantas do algodoeiro da cultivar BRS Aroeira inoculadas com *B. thuringiensis* na semente e na planta ao longo de quatro semanas.

Figura 15 - Altura de plantas do algodoeiro das cultivares BRS 286 inoculadas com *B. thuringiensis* na semente e na planta ao longo de quatro semanas.

Figura 16 - Avaliação semanal do efeito de inoculação com as estirpes de *B. thuringiensis* sobre o número de folhas da cultivar BRS 8H de algodão.

Figura 17 - Avaliação semanal do efeito de inoculação com as estirpes de *B. thuringiensis* sobre o número de folhas da cultivar BRS AROEIRA de algodão.

Figura 18 - Avaliação semanal do efeito de inoculação com as estirpes de *B. thuringiensis* sobre o número de folhas da cultivar BRS 286 de algodão.

Figura 19 - Autorradiografia de plantas de algodão após 7 dias de exposição às estirpes de *B. thuringiensis* marcado com metionina ³⁵S.

Figura 20 - Micrografia eletrônica de varredura mostrando *B. thuringiensis* em sementes de algodão após inoculação com a bactéria.

Figura 21 - Estádios vegetativos do algodoeiro.

Figura 22 - Bioensaio "in vitro" com larvas de *S. frugiperda* usando folhas de plantas algodão que receberam *B. thuringiensis* na semente.

Figura 23 - Índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes da cultivar BRS 8H inoculadas com as concentrações 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC/mL da estirpe S2122 de *B. thuringiensis*.

Figura 24 - Leitura semanal da percentagem de plantas usando escala fenológica do algodão.

Figura 25 - Altura da parte aérea de plantas do algodoeiro da cultivar BRS 8H inoculadas com *B. thuringiensis*.

Figura 26 - Efeito de inoculação com as concentrações 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC/mL da estirpe S2122 de *B. thuringiensis* sobre o número de folhas da cultivar BRS 8H de algodão.

Figura 27 - Comparativo de plântulas de algodão que foram inoculadas com *B. thuringiensis* na semente com treze dias de emergidas.

Figura 28 - Comparativo de plantas de algodão que foram inoculadas com *B. thuringiensis* na semente aos vinte e dois dias de emergidas.

Figura 29 - Folhas cotiledonares de algodoeiro com 8 dias de emergência que foram oferecidas à lagartas neonatas de *S. frugiperda* para alimentação por 48 horas.

Figura 30 - Micrografia eletrônica de varredura mostrando a colonização da estirpe S2122 de *B. thuringiensis* em diferentes partes da planta de algodoeiro.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias da matéria seca e comprimento da raiz da cultivar BRS 8H inoculadas com diferentes estirpes de *B. thuringiensis* via semente.

Tabela 2 - Médias da matéria seca e comprimento da raiz da cultivar BRS 8H 8H inoculadas com diferentes estirpes de *B. thuringiensis* via planta.

Tabela 3 - Médias da matéria seca e comprimento da raiz da cultivar BRS Aroeira inoculadas com diferentes estirpes de *B. thuringiensis* via semente.

Tabela 4 - Médias da matéria seca e comprimento da raiz da cultivar BRS Aroeira inoculadas com diferentes estirpes de *B. thuringiensis* via planta.

Tabela 5 - Médias da matéria seca e comprimento da raiz da cultivar BRS 286 inoculadas com diferentes estirpes de *B. thuringiensis* via semente.

Tabela 6 - Médias da matéria seca e comprimento da raiz da cultivar BRS 286 inoculadas com diferentes estirpes de *B. thuringiensis* via planta.

Tabela 7 - Teores nutricionais para os elementos N, P, K de folhas da cultivar BRS 8H de algodão que receberam inóculo com a estirpe S2122 de *B.thuringiensis*.

Tabela 8 - Teores nutricionais para os elementos Ca, Mg, S e B de folhas da cultivar BRS 8H de algodão que receberam inóculo com a estirpe S2122 de *B.thuringiensis*.

Tabela 9 - Teores nutricionais para os elementos (Zn, Fe, Mn e Cu) de folhas da cultivar BRS 8H de algodão que receberam tratamento com a estirpe S2122 de *B.thuringiensis*.

Tabela 10 - Efeito da inoculação de diferentes concentrações da estirpe S2122 de *B. thuringiensis* sobre a matéria seca de raízes de plantas de algodão com avaliações semanais.

Tabela 11 - Efeito da inoculação de diferentes concentrações da estirpe S2122 de *B. thuringiensis* sobre o comprimento de raízes de plantas de algodão com avaliações semanais.

Tabela 12 - Média de produção de matéria seca e comprimento radicular da cultivar BRS 8H inoculadas com diferentes concentrações da estirpe S2122 de *B. thuringiensis*.

RESUMO

Bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* (Bt) são os mais comercializados e conhecidos em todo o mundo por seu potencial no controle de insetos-praga. Porém seu efeito como organismo endofítico e promotor de crescimento são pouco estudados. Para avaliação desses efeitos, foram realizados testes iniciais para verificar a ação de Bt sobre o crescimento vegetativo de plantas de algodão a partir da seleção de quatro estirpes de Bt (S1450, S1905, S2122 e S2124) por sua atividade tóxica sobre insetos da ordem Lepidoptera, três genótipos de algodão (BRS 8H, BRS Aroeira e BRS 286) e dois métodos de inoculação (via semente e via planta) em casa de vegetação. Os parâmetros analisados foram: germinação, altura, número de folhas, massa seca da parte aérea e radicular e comprimento de raiz. Ao final do experimento as plantas foram oferecidas a larvas de *S. frugiperda* para avaliar a mortalidade. Com base nas análises dos resultados de eficiência em altura, massa seca e número de folhas, foi possível selecionar a estirpe S2122, a cultivar BRS 8H e o método de inoculação em sementes. Um segundo ensaio foi, então, planejado para dar continuidade dos estudos com diferentes concentrações da estirpe S2122 de Bt e observação dos mesmos parâmetros. A cada semana foi realizado um bioensaio oferecendo folhas destes tratamentos para larvas de *S. frugiperda*. Os resultados dos testes iniciais permitiram a conclusão de que o método de inoculação mais eficiente na promoção de crescimento de plantas de algodão foi via sementes e que diferentes estirpes possuem padrões de interações diferenciados para determinada cultivar. Na segunda parte do trabalho, os resultados dos experimentos apresentaram diferenças estatísticas na concentração 10^8 UFC/mL, mostrando incremento no crescimento vegetal das plantas de algodão e na produção de fitomassa. Embora tenha sido verificada baixa mortalidade das lagartas nos bioensaios realizados semanalmente, as lagartas que se alimentaram de folhas dos tratamentos com Bt exibiram sintomas de intoxicação com aparência debilitada. Provavelmente as larvas destes insetos se alimentaram da proteína tóxica, porém em concentrações sub-letais. Estes sintomas de intoxicação foram observados até dezoito dias após a emergência das plantas.

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum*, endofítico, crescimento de plantas, biocontrole

ABSTRACT

Bioinsecticides based on *B. thuringiensis* (Bt) are the most commercialized and well-known ones worldwide due to their potential for controlling insect pests. However, their effects as an endophytic organism and growth promoter have scarcely been studied. To evaluate these effects, initial tests were carried out to verify the action of Bt on the vegetative growth of cotton plants, from the selection of four strains of Bt (S1450, S1905, S2122 and S2124), for their toxic activity on insects of the order Lepidoptera, using three cotton genotypes (BRS 8H, BRS Aroeira and BRS 286) and two methods of inoculation (via seed and via plant) in a greenhouse. The parameters analyzed were: germination, height, number of leaves, dry mass of the aerial and root parts and length of the root. At the end of the experiment the plants were offered to larvae of *S. frugiperda* to evaluate the mortality rate. Based on the analyses of the results for efficiency in terms of height, dry mass and number of leaves, it was possible to select strain S2122, cultivar BRS 8H and the method of seed inoculation. A second assay was then planned, to continue the studies with different concentrations of strain S2122 of Bt and observation of the same parameters. A bioassay was carried out each week, offering leaves from these treatments to larvae of *S. frugiperda*. The results of the initial tests led to the conclusion that the most efficient inoculation method in promoting cotton plant growth was via seeds, and that different strains have different patterns of interaction for each cultivar. In the second part of the work, the experimental results presented statistical differences at a concentration of 10^8 UFC/mL, showing an increase in vegetative growth of cotton plants and in the production of plant mass. Although low mortality was seen for larvae in the weekly bioassays, those that fed on the leaves of treatments with Bt exhibited symptoms of intoxication and a debilitated appearance. The larvae of these insects probably fed on the toxic protein, but in sub-lethal concentrations. These symptoms of intoxication were observed until 18 days after the plants emerged.

Key-words: *Gossypium hirsutum*, endophytic, plant growth, biocontrol

1. INTRODUÇÃO

A cotonicultura é caracterizada por estar entre as dez maiores fontes de riqueza no setor agropecuário no mundo, pela organização do setor e pela elevada tecnificação. O algodoeiro é uma planta que possui variados produtos de utilidade, porém, a produção nacional é, prioritariamente, destinada à indústria têxtil (Anuário Brasileiro do Algodão, 2012).

Nos sistemas de produção agrícola, o algodoeiro permanece por um período vegetativo maior que o das outras culturas, quando comparada a soja e o milho (SANTOS, 1999). Existem fatores que influenciam positivamente o desempenho das plantas como uniformidade de germinação e o rápido desenvolvimento radicular nesta fase de estabelecimento da lavoura. Existe alta correlação entre o desenvolvimento inicial das plântulas e a produtividade, por isso é necessária a adoção de práticas que possam auxiliar o algodoeiro a superar os estresses existentes nas primeiras fases de seu desenvolvimento (BECKER *et al.*, 1999).

Esta cultura hospeda várias espécies de insetos-praga, obrigando o produtor a efetuar pulverizações, muitas vezes, indiscriminadas. O controle destes, no algodoeiro, é um dos fatores que mais onera os custos de produção, superando inclusive, os gastos com a aquisição e aplicação de fertilizantes (CZEPAK *et al.* 2005, GALLO *et al.* 1988, SANTOS 1997).

A espécie *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das hospedeiras do algodoeiro (SOARES & VIEIRA, 1998) e seus danos ocorrem desde a emergência até a maturação dos frutos (VELOSO *et al.* 1983; ALI *et al.* 1989; SANTOS, 2001; GALLO *et al.* 2002). Sua permanência é prolongada pelo tipo de agroecossistema que compõe o manejo e pelo uso de inseticidas químicos como a única forma de controle (VALICENTE & FONSECA, 2004).

Entre as formas mais efetivas de controle citam-se as adotadas por meio de inseticidas químicos e por produtos de baixo impacto, como os formulados a base de *Bacillus*

thuringiensis (Berliner, 1911), que podem produzir toxinas altamente específicas aos seus insetos-alvo, inócuas ao ser humano, vertebrados e plantas e não poluentes ao meio ambiente.

Estudos preliminares demonstraram que existem estirpes de *B. thuringiensis* colonizando tecidos de plantas de algodão (MONNERAT *et al.*, 2003) e que a estirpe padrão de *B. thuringiensis* HD-1 uma vez inoculada no solo próximo às raízes de plantas de algodão e couve se espalharam por todos os tecidos, chegando aos insetos que se alimentam dessas plantas (MONNERAT *et al.*, 2009). Estudos estes que abriram perspectivas e comprovaram que estirpes de *B. thuringiensis* podem atuar como organismo endofítico em plantas de repolho conjugado à sua capacidade tóxica para *Plutella xylostella* (PRAÇA *et al.*, 2012).

Na busca de elevação dos níveis atuais de produtividade e redução nos custos de produção do algodoeiro no Brasil, novas tecnologias vêm sendo incorporadas ao sistema de produção. A utilização de microrganismos endofíticos na agricultura é uma ferramenta extremamente promissora que abre novas perspectivas de uso de *B. thuringiensis* no desenvolvimento vegetativo do algodão e no controle de insetos que vivem ou se alimentam da planta, como por exemplo, os insetos desfolhadores.

Os estudos propostos neste trabalho podem trazer benefícios colaborando em um maior entendimento dessa interação hospedeiro-endófito, da sua colonização em plantas de algodão e da observação do potencial tóxico de *B. thuringiensis* atuando endofiticamente em um lepidóptero de importância econômica para a cultura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura do Algodoeiro

A cotonicultura brasileira é um dos setores mais organizados e modernos do agronegócio brasileiro e com forte evidência também no âmbito internacional. Na safra 2012/2013, as regiões Centro-Oeste e Nordeste representaram 96,3% da área cultivada no país com concentração da produção algodoeira no cerrado. O avanço da tecnologia e o aumento da produtividade permitiram ao Brasil passar de maior importador mundial de algodão para o terceiro maior exportador do produto, logo atrás dos Estados Unidos e Índia e à frente da Austrália (Anuário Brasileiro do Algodão, 2013).

A planta de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (Figura 1) oferece os mais variados produtos como: pluma, línter, fibrilha, fios, tecidos, malhas, caroço, torta e farelo, óleo bruto e biodiesel. Porém, a produção nacional de algodão é, prioritariamente, destinada à indústria têxtil. Os estados do Mato Grosso e da Bahia participam com 82% da área cultivada (MAPA, 2013) e 81,6% de toda a fibra produzida, juntos se destacam pelo investimento em biotecnologia, gerenciamento do setor e novas técnicas de manejo. A produção destes estados contribuíram para o superávit da balança comercial e com as exportações do agronegócio brasileiro (ABRAPA, 2012).

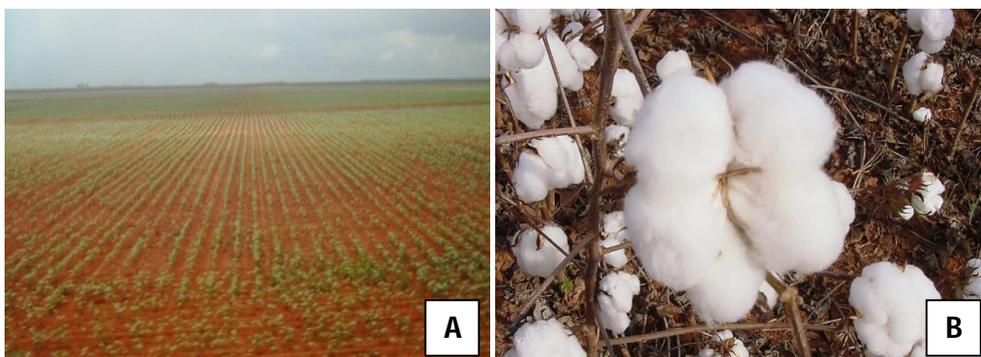


Figura 1 - Lavoura de algodão em pós emergência de plantas (A); capulho de algodão com exposição da fibra (B).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a produtividade média do algodão em caroço deverá chegar a 3.674 quilos por hectare nesta safra 2013/2014, contra os 3.513 quilos por hectare obtidos na safra anterior em 2012/2013.

Na busca de elevação dos níveis atuais de produtividade e redução nos custos de produção, principalmente no que diz respeito ao controle de pragas do algodoeiro, tem crescido o interesse em pesquisa que explorem o potencial tecnológico de organismos naturais que possam integrar o manejo da cultura e ainda trazer benefícios como o baixo impacto ambiental e de maior segurança no manuseio.

2.2 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 as medidas de controle necessárias e este é um grande desafio da agricultura sustentável.

De acordo com FREIRE (2011) ao todo, existem no Brasil vinte pragas de importância econômica para o cotonicultor e cinco pragas ocasionais, além de quinze doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides.

O controle de insetos-praga do algodoeiro é um dos fatores que mais onera os custos de produção, superando inclusive, os gastos com a aquisição e aplicação de fertilizantes. Em muitas situações é registrada a necessidade de 12 a 14 pulverizações, ou mais, para o controle de insetos e ácaros (RICHETTI *et al.*, 2004). Na safra 2012/2013, por problemas atípicos provocados pelo ataque severo de lagartas do gênero *Helicoverpa*, o número de pulverizações com inseticidas químicos para o controle da praga chegou a 25 pulverizações na região do oeste da Bahia, onde as produções foram mais prejudicadas (Anuário Brasileiro do Algodão, 2013).

Independente do local onde se cultiva o algodoeiro, cerca de quatro a cinco espécies de insetos exigem que, frequentemente, sejam adotadas medidas de controle para contenção dos surtos populacionais sendo, por isso, denominadas de pragas-chave do algodoeiro. As espécies ou grupos que assumem esse *status* de praga-chave podem variar de região para região, sendo que algumas delas são categorizadas como tal em mais de uma região de cultivo, como é o caso do bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae); do pulgão-do-algodoeiro, *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae); as espécies desfolhadoras: curuquerê do algodão (*Alabama argillacea*) (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta militar (*Spodoptera frugiperda*) (Lepidoptera: Noctuidae) e a lagarta falsa medideira (*Pseudoplusia includens*) (Lepidoptera: Noctuidae); e do complexo de lagartas das maçãs, representado por três espécies: *Heliothis virescens* e *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) e novamente *S. frugiperda*.

A adição de outras espécies a esta lista pode ocorrer em virtude de condições climáticas específicas incidentes em determinados anos de cultivo e de similaridade entre locais de plantio. Entre as demais espécies com frequente relato de necessidade de pulverizações, destacam-se a mosca-branca, *Bemisia* spp. (Heteroptera: Aleyrodidae); o tripses, *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera: Thripidae); o ácaro rajado, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae); além de quatro espécies de percevejos: o percevejo-manchador, *Dysdercus* sp. (Hemiptera: Pyrrhocoridae) e os percevejos da soja, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii* e *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). Verifica-se ainda a presença do percevejo-castanho (*Scaptocoris castanea*) (Hemiptera: Cydnidae) no início do desenvolvimento do algodão associado às raízes da planta (TORRES, 2008).

Geralmente, as lagartas iniciam o ataque da metade até o final do desenvolvimento da cultura do algodão (FABRETTI & COSTA, 1993), porém o período crítico de ataque de

curuquerê, *A. argillacea*, se inicia aos 15 dias após a emergência das plantas e perdura até a abertura do primeiro capulho. Para *S. frugiperda*, ataques precoces podem ocorrer logo após a germinação quando as lagartas promovem o tombamento e a morte das plantinhas com sintomas confundidos com o ataque de lagarta rosca (MIRANDA, 2010).

2.3 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797)

S. frugiperda é uma praga polífaga que se alimenta de um grande número de hospedeiros (LUGINBILL, 1928). Apesar de apresentar preferência alimentar por plantas da família das gramíneas como milho, milheto, trigo, sorgo, arroz e cana-de-açúcar, também ataca plantas de outras famílias botânicas como alfafa, feijão, amendoim, batata, batata doce, repolho, espinafre, tomate, couve, abóbora, soja e algodoeiro (SILVA *et al.* 1968; ALI *et al.* 1989; CRUZ, 1995; BARLOW & KUHAR, 2005).

Os danos causados por *S. frugiperda* às plantas de algodoeiro, ocorrem desde a emergência até a maturação dos frutos (VELOSO *et al.* 1983; ALI *et al.* 1989; SANTOS, 2001; GALLO *et al.* 2002). As lagartas cortam as plantas jovens logo acima do coleto, reduzindo o estande da cultura (VELOSO *et al.* 1982; ALI *et al.* 1989; SANTOS, 2001; GALLO *et al.* 2002; SANTOS *et al.* 2003). Após a eclosão, as lagartas se dispersam rapidamente para outras plantas, uniformizando o ataque na lavoura (SANTOS, 1998). As etapas de desenvolvimento de *S. frugiperda* até a fase de pupa são ilustradas na Figura 2.

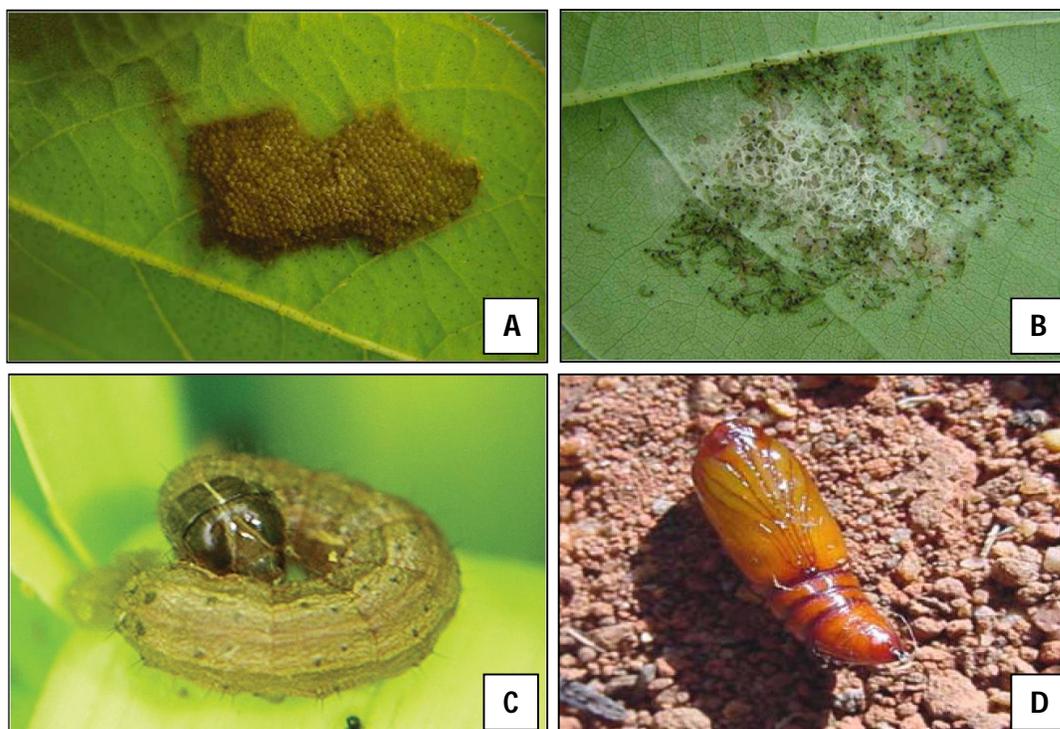


Figura 2 - Estágios de desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda*. Postura de ovos (A); larvas de primeiro ínstar (B); lagarta em dieta (C); pupa no solo (D). Fonte: www.fmcagricola.com.br/coletaneafmc.aspx

Nos sistemas agrícolas constituídos por soja, milho, feijão e algodão ocorrem uma oferta continuada de alimento a insetos polívoros, como é o caso de espécies do gênero *Spodoptera* (SANTOS, 2001). A existência de culturas irrigadas, principalmente na região de cerrado, prolonga no tempo a sobrevivência de insetos, aumentando o número de gerações neste tipo de agroecossistema. Nessa situação, as mariposas estabelecem um processo migratório entre lavouras formadas por espécies vegetais semelhantes, naquelas implantadas em épocas diferentes e, também entre diferentes espécies botânicas (SANTOS, 2001; SANTOS, 2003).

A lagarta do cartucho, *S. frugiperda*, nos últimos anos, vem crescendo em importância nas principais regiões produtoras de algodão no País (FERNANDES, *et al.* 2002; SANTOS *et al.* 2003), provocando perdas de até 30% (MIRANDA & FERREIRA, 2005).

Em plantas de algodão, três a quatro dias após a postura as lagartas eclodem dos ovos e iniciam a alimentação raspando o parênquima das folhas. À medida que vão crescendo, as lagartas passam a se alimentar com maior voracidade, perfurando folhas, brácteas, flores e maçãs do algodão. No início da fase larval, o inseto destrói a epiderme das brácteas dos botões, flores e maçãs. Lagartas maiores danificam o interior das flores ou a base das maçãs (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Os danos causados pela *S. frugiperda* na lavoura algodoeira no Brasil (SILVA, 2003), a sua importância econômica para a cultura (SOARES & VIEIRA, 1998) e o uso de inseticidas químicos como a única forma de controle (VALICENTE & FONSECA, 2004) demandam esforços para novas técnicas de controle desse inseto de modo a favorecer o manejo da cultura de forma econômica e sustentável.

Entre as opções de controle destas pragas, categorizados como produtos de baixo impacto, encontram-se produtos formulados a base de *B. thuringiensis*, os denominados reguladores de crescimento, os acaricidas a base de enxofre, o dicofol, espinosade entre outros. A adoção de controle por meio de produtos biológicos possibilita o desenvolvimento de outras táticas adicionais como o uso de parasitóides e de predadores (TORRES, 2008).

2.4 *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911)

B. thuringiensis é uma bactéria do solo, Gram positiva, aeróbia, da família Bacillaceae que produz no momento de sua esporulação inclusões proteicas cristalinas. As inclusões proteicas são compostas por proteínas, conhecidas como δ -endotoxinas ou proteínas Cry, que são altamente tóxicas a uma ampla variedade de insetos-pragas de importância econômica, como também outros invertebrados (ARANDA *et al.*, 1996; MONNERAT & BRAVO, 2000). Essas toxinas são altamente específicas aos seus insetos-alvo, inócuas ao ser humano,

vertebrados e plantas e tem efeito não poluente ao meio ambiente, por serem completamente biodegradáveis (WHITELEY & SCHNEPF, 1986; BRAVO *et al.*, 2005).

Ainda de acordo com MONNERAT & BRAVO (2000), outro aspecto importante nesse processo é a característica de ocorrência cosmopolita do *B. thuringiensis*, por ser uma bactéria encontrada em todas as partes do mundo, nos vários substratos, tais como solo, água, superfície das plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados.

Esta bactéria foi isolada primeiramente 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. Atualmente, esta estirpe é empregada como padrão e como base de produtos no controle de lepidópteros.

Além das proteínas Cry e Cyt, *B. thuringiensis* pode produzir várias outras toxinas, incluindo proteínas com atividade inseticida como as proteínas Cyt, as α -exotoxina, β -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (HANSEN & SALAMITOU, 2000).

As formulações da maior parte dos produtos existentes no mercado são baseadas nas estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (HARRISON & BONNING, 2000), *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e *B. thuringiensis* subsp. *azaiwai* (BRAVO *et al.*, 2011).

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).

Uma vez ingeridos pelas lagartas dos insetos suscetíveis (Figura 3), os cristais protéicos são solubilizados no intestino alcalino e as protoxinas liberadas são clivadas por proteases formando segmentos protéicos tóxicos (ARONSON *et al.*, 1986; KNOWLES *et al.*, 1994; BRAVO *et al.*, 2005). Assim, as toxinas tornam-se aptas a serem reconhecidas e a se ligarem

aos receptores presentes na membrana das células do intestino médio do inseto, levando à formação de poros que alteram o gradiente iônico e osmótico. As células se intumescem e se rompem, propiciando o extravasamento do conteúdo intestinal para a hemocele do inseto causando a morte do inseto por septcemia ou inanição (MONNERAT & BRAVO, 2000; BRAVO *et al.*, 2007). As diferenças no grau de toxicidade entre diferentes proteínas a um mesmo inseto podem estar relacionada à redução da solubilidade, sendo este um dos mecanismos de resistência dos insetos a algumas toxinas (ARANTES *et al.*, 2002; BRAVO *et al.*, 2005).

Após ingestão os sintomas observados nas larvas são: perda do apetite, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia geral e por fim morte do inseto. Não há atividade de *B. thuringiensis* nas fases de pupa e de adulto dos insetos (ARONSON *et al.*, 1986; MONNERAT & BRAVO, 2000).

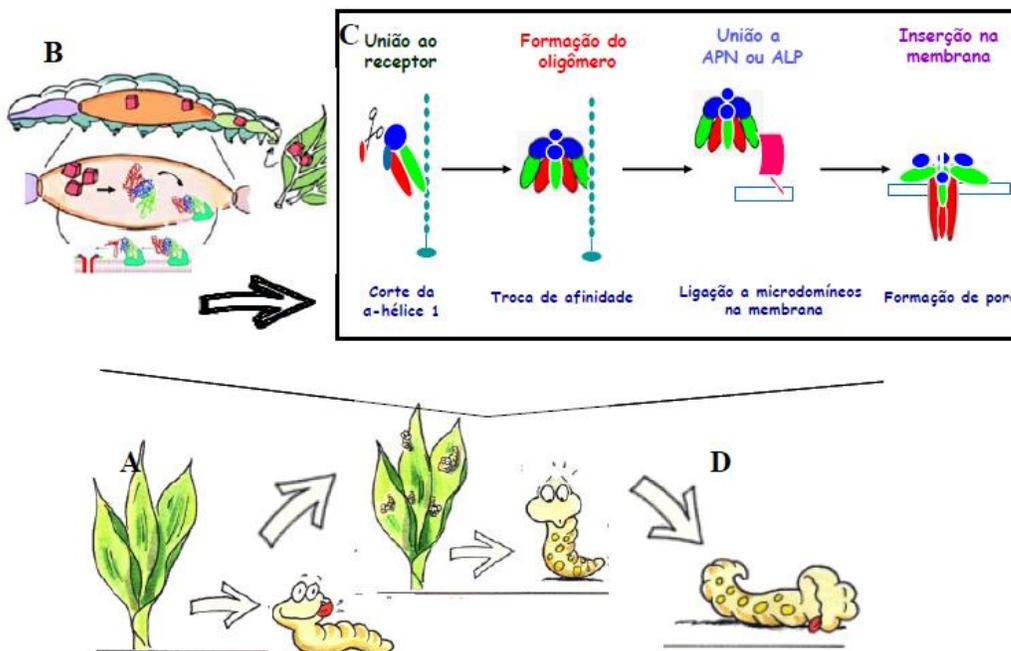


Figura 3 - Esquema do modo de ação de toxinas Cry para lepidópteros. A – O inseto ingere a proteína cristal; B – no intestino médio da larva os cristais são solubilizados e ativados em proteínas que se ligam ao receptor C – Esta ligação resulta na ativação de vias de sinalização intracelulares. Após se ligar ao receptor, há a inserção da toxina na membrana, formando poros e ativando vias de sinalização

intracelular que podem ativar respostas apoptóticas e choque osmótico induzidos pela formação do poro, contribuindo para a morte celular; D – levando o inseto à morte (Adaptado de Bravo *et al.*, 2007).

2.5 Microrganismos endofíticos

São denominados de endofíticos todos os microrganismos capazes de colonizar, em alguma fase do seu ciclo de vida, o interior de tecidos vegetais, sem causar danos aparentes às plantas hospedeiras e sem formar estruturas externas visíveis (CAROLL, 1986; HALLMANN *et al.*, 1997; AZEVEDO e ARAÚJO, 2007).

A utilização de microrganismos endofíticos na agricultura na área da 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 (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2009).

A introdução de um microrganismo endofítico no hospedeiro pode ocorrer de várias formas, ativamente pela produção de enzimas ou estruturas que facilitam a sua penetração ou por meio de aberturas naturais como estômatos, hidatódios, ferimentos (DÖBEREINER *et al.*, 1993), via raiz e sementes. Os microrganismos chegam a diferentes tecidos e colonizando a planta de maneira sistêmica, demonstrando a habilidade de se adaptarem a nichos ecológicos específicos, rizosfera, filosfera, antosfera (HALLMANN *et al.*, 1997) ou espermosfera (LUZ, 1998). Mesmo colonizando sistemicamente a planta, as bactérias endofíticas apresentam preferência de colonização por certos tecidos. As bactérias endofíticas podem alterar as condições fisiológicas e morfológicas do hospedeiro, além de atuar sobre outros microrganismos presentes no interior da planta (ANDREOTE *et al.*, 2004).

Microrganismos endofíticos já foram isolados de flores, frutos, folhas, caules, raízes e sementes de várias espécies de vegetais. Eles penetram e colonizam os espaços inter e intracelulares de diferentes tecidos vegetais como parênquima, epiderme, bainha do feixe

vascular, xilema e floema e outro, de forma sistêmica ou localizada (QUADT-HALMANN *et al.*, 1997; GERMAINE *et al.*, 2004). A colonização das plantas pelos microrganismos endofíticos foi detectada ocorrendo de forma piramidal, com uma quantidade decrescente de microrganismos a partir das raízes, caule e folhas (KUKLINSKY-SOBRAL *et al.*, 2004; MENDES *et al.*, 2007).

Uma pesquisa realizada por MONNERAT *et al.* (2003) com estirpes de *B. 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. Estudos com algodão e couve tratados com *B. thuringiensis* HD-1 demonstraram que além de colonizar estas espécies vegetais, *B. thuringiensis* poderia, também de forma sistêmica, controlar os insetos-pragas *S. frugiperda* e *P. xylostela*, respectivamente (MONNERAT *et al.*, 2009).

TEIXEIRA *et al.* (2007) isolaram 482 microrganismos em planta de mandioca, dentre eles, o gênero *Bacillus* foi o que apresentou maior número de espécies obtendo dados e identificação de *B. thuringiensis* como bactéria endofítica. Estudos de FERREIRA (2008) mostraram que *Bacillus* podem ser isolados de sementes e plântulas. Recentemente, foi possível comprovar a colonização e a penetração de *B. thuringiensis* nas raízes, caules e folhas de plântulas de repolho (PRAÇA *et al.*, 2012).

Nos sistemas de produção agrícola, o algodoeiro permanece por um período vegetativo maior que o das outras culturas, como por exemplo, a soja e o milho (SANTOS, 1999). Na fase de estabelecimento da lavoura, diversos fatores podem influenciar negativamente o desempenho das plantas, como desuniformidade de germinação e lento desenvolvimento do sistema radicular. Existe alta correlação entre o desenvolvimento inicial das plântulas e a produtividade da lavoura, por isso é necessária adoção de práticas que possam ajudar o algodoeiro a superar os estresses existentes nas primeiras fases de seu desenvolvimento (BECKER *et al.*, 1999).

Diante do exposto, denota-se que a inoculação do *B. thuringiensis* e sua atuação endofítica pode ser utilizada como uma ferramenta promissora nessa etapa de desenvolvimento vegetativo e no controle de insetos de algumas ordens que vivem ou se alimentam da planta de algodão, como os insetos desfolhadores, por exemplo. Diversos são os benefícios atribuídos à utilização de determinadas espécies endofíticas como ampla proteção, produção de fitohormônios e de antibióticos e fixação de nitrogênio. Todos estes fatores podem, direta ou indiretamente, favorecer o crescimento e desenvolvimento de mudas, resistência a nematóides e outros patógenos, bem como tolerância a condições ambientais e nutricionais adversas (VERMA *et al.*, 2001; STROBLE & DAISY, 2003). O fato da bactéria atuar de forma endofítica pode proporcionar uma maior proteção da toxina no interior dos tecidos vegetais, reduzindo desvantagens como a sua sensibilidade aos raios ultravioletas.

Ressalta-se, contudo, que os solos representam um ecossistema complexo e as variações nos níveis de pH, compostos inorgânicos e matéria orgânica podem representar um fator limitante na colonização, estabelecimento e esporulação de microrganismos (MELO & AZEVEDO, 1998). Além disso, composição da comunidade associada às plantas pode, ainda, ser diferente, dependendo da espécie, do cultivar, e até mesmo entre espécies transgênicas e suas respectivas progenitoras (ANDREOTE *et al.*, 2010).

As transformações microbianas ocorrem devido às diferentes populações que habitam o solo e suas distintas reações químicas podem ser alteradas sempre que o ecossistema sofrer algum tipo de interferência. Assim, na aplicação de diversos tipos de manejo, podem existir diferentes disponibilidades de substratos que determinarão o favorecimento ou a inibição do estabelecimento dos diferentes grupos microbianos (CASTRO & PRADO, 1993).

Trabalhos envolvendo *B. thuringiensis* como endofíticos e promotor de crescimento são praticamente inexistentes. Portanto, espera-se que os ensaios e estudos de avaliação da influência desse microrganismo sobre plantas cultivadas abram novas perspectivas

tecnológicas, não só como estratégia complementar para ser utilizada como ferramenta no manejo de pragas, mas também pela promoção de crescimento obtida pela ação sistêmica na cultura.

3. HIPÓTESES

- A inoculação das estirpes S1450, S1905, S2122, S2124 de *B. thuringiensis* é capaz de promover crescimento em plantas de algodão em período vegetativo de desenvolvimento;
- Há diferença entre as formas de inoculação via semente e inoculação via planta;
- Os materiais genéticos de algodão, BRS 286, BRS Aroeira, BRS 8H, respondem diferentemente a essa interação com o microrganismo;
- Plantas que receberam as duas formas de inoculação possuem potencial tóxico sobre *S. frugiperda*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Selecionar uma estirpe de *B. thuringiensis*, uma cultivar de algodão e um método de inoculação com potencial para promoção de crescimento e de biocontrole contra *S. frugiperda*.

4.2 Objetivos Específicos

- Identificar a estirpe mais promissora para promoção de crescimento e a cultivar que possui uma melhor resposta;

- Identificar a estirpe mais apta a controlar *S. frugiperda* de forma endofítica;
- Identificar entre as cultivares de algodão aquela mais susceptível a ser colonizada pela estirpe que controle *S. frugiperda*;
- Identificar a melhor forma de inoculação das bactérias selecionadas;
- Identificar uma concentração de *B. thuringiensis* mais eficiente no crescimento de plantas e no controle de *S. frugiperda*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAPA. A cadeia do algodão brasileiro: desafios e estratégias. Biênio 2011/2012. <<http://www.abrapa.com.br/Documents/Livro%20A%20Cadeia%20do%20Algodao%20-%20Abrapa.pdf>>. Acesso em: 4 de out. 2012

ALI, A.; LUTTREL, R. G.; PITRE, H. N.; DAVIS, F. M. Distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) egg masses on cotton. **Environmental Entomology**, College Park, v. 18, n.5, p. 881-885, 1989.

ANDREOTE, F. D., GULLO, M. J. M., de SOUZA LIMA, A. O., JUNIOR, W. M., AZEVEDO, J. L., & ARAUJO, W. L. (2004). Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL**, 42(3), 169-173.

ANDREOTE, F. D., ROCHA, U. N., ARAÚJO, W. L., AZEVEDO, J. L. & OVERBEEK, L. S. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, p. 389-399, 2010.

Anuário Brasileiro do Algodão 2012. Cleonice de Carvalho[*et al.*]-. Editora Gazeta Santa. Santa Cruz do Sul. ISSN 1808-2378. 136 p.: ill

Anuário Brasileiro do Algodão 2013. Erna Regina Reetz...[*et al.*]-. Editora Gazeta Santa. Santa Cruz do Sul. ISSN 1808-2378. 144 p.: ill

ARANDA, E. *et al.* Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.68, p.203-212, 1996.

ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: SERAFINE, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). *Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. Caxias do Sul: Agropecuária, 2002. p. 269-293.

ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiology Review**, v. 50, p. 1-24. 1986.

ASSUMPÇÃO, L. C., LACAVA, P. T., DIAS, A. C. F., DE AZEVEDO, J. L., MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 2009, 44(5), 503-510.

AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. **Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, p. 117-137, 1998.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plant. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKHI, S. K.; (Eds.) **Fungi: Multifaceted Microbes**, New Delhi: Anamaya Publishers, 2007. chap.6 p. 189-207.

BARLOW, V. M.; KUHAR, T. P. **Fall armyworm in vegetable crops**. Virginia Cooperative Extension, 2005. 3p. Disponível em: <<http://www.ext.vt.edu/pubs/entomology/444-015/444-015.html>>.

BECKER, W. D.; HOPPER, N. W.; MCMICHAEL, B. L.; JIVIDEN, G. M. Seed applied plant growth regulators effects on cotton germination, emergence and growth. In: Proceedings of the Beltwide Cotton Conference, v. 1: 625-627. National Cotton Council, Memphis, TN, 1999.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S. SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry*, v. 41, n.7, p. 423-431. 2011.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. *Bacillus thuringiensis* **mechanisms and use**. In: *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 6, Elsevier, New York, NY, USA., p. 175-206, 2005.

CAROLL, G. C. The biology of endophytism in plants with particular reference to Woody perennials. In: FOKKEMA, N. J.; HEUVEL, J. VANDEN, Eds. *Microbiolgy of Phyllosphere*, London: Cambridge University Press: p. 205-222, 1986.

CASTRO, O. M.; PRADO, H. Avaliação da atividade de microrganismos do solo em diferentes sistemas de manejo de soja. *Ciência agrícola*, 2: 12-219. 1993

CRUZ, I. A lagarta do cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS. Circular Técnica 21, 45p, 1995.

CZEPAK, C., FERNANDES, P. M., ALBERNAZ, K. C., RODRIGUES, O. D., SILVA, L. M., SILVA, E. A. D., Borges, J. D. Seletividade de inseticidas ao complexo de inimigos naturais na cultura do algodão (*Gossypium hirsutum* L.). *Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)*, 35(2), 123-127, 2007.

DÖBEREINER, J.; REIS, V. M.; PAULA, M. A.; OLIVARES, F. Endophytic diazotrophic in sugar cane, cereal and tuber plants. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, WF. (Ed)

New horizons in nitrogen fixation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 671-676.

DULMAGE, H. T. Insecticidal activity of AD-1, anew isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 15, p. 232-239, 1970.

FABRETTI, J. P.; COSTA, F. A. (Coord.). **Relatório Técnico Anual do Programa de Algodão do MIP-Algodão no Estado do Paraná - safra 1991/92.** Cooperativas-PR, EMATER-PR, Hoechst do Brasil Química e Farmacêutica S/A, 1993. 159 p

FERNANDES, M. G.; BUSOLI, A. C.; BARBOSA, J. C. Distribuição espacial de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em algodoeiro. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 3, p. 203-211, 2002.

FERREIRA, A. Interações entre bactérias endofíticas e do rizoplano com Eucalyptus. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008. 77 p. Dissertação de Mestrado.

FREIRE, E. C. Algodão no Cerrado. 2ª. Ed. rev. e ampl. Brasília: Abrapa, 2011.

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

GALLO, D.; NAKANO O.; SILVEIRA-NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B; VENDRAMIM, J. D. Manual de entomologia agrícola. Ceres, São Paulo. 1988. 649p.

GERMAINE, K.; KEOGH, E. BORREMANS, B.; VAN DER LELIE, D.; BARAC, J.; OEYEN, L.; VANGRONVELD, J.; MOORE, F. P.; MOORE, E. R. B., CAMPBELL, C. D.; RYAN, D. DOWLING, D. N. Colonization of poplar trees by gfp expression bacterial endophytes. **FEMS Microbiology and Ecology**, v. 48, p. 109-118, 2004

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HANSEN, B. M., SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. 2000. In: **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application** (Charles, J. et al., eds), pp. 41-46, Kluwer Academic Publishers.

HARRISON, R. L.; BONNING, B. C. Genetic engineering of biocontrol agents for insects. In: **Biology and biotecnology control of insect pest**. Edited by Jack E, Rechaige and Nancy A. Rechalg. By CRC Press LLC. p. 243-280, 2000.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Advances Insect Physiology**, v. 24, p. 275-308, 1994.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANIKLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

LUGINBILL, P. H. **The fall armyworm**. Washington, USDA., 1928. 73 p. (Technical Bulletin, n. 34).

LUZ, W. C. Ecologia da espermosfera. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed) **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998, cap. 6, p. 167-183.

Manual de Pragas do Algodoeiro - www.fmcagricula.com.br/coletaneafmc.aspx

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/algodao>. Acesso em: 18 de jan. 2013.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. 1998. Ecologia Microbiana. EMBRAPA-CNPMA, Jaguariúna, 488p.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAÚJO, W. L.; RAAIJMAKERS, J. M. Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7259-7267, 2007.

MIRANDA, J. E. Manejo integrado de pragas do algodoeiro no cerrado brasileiros. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010. 37 p. (Circular Técnica, 131).

MIRANDA, J. E.; FERREIRA, A. C. B. Contra-ataque. Caderno Técnico Cultivar, Pelotas, p. 7-10, 2005.

MONNERAT, R. G.; SOARES, C. M. S.; GOMES, A. C. M.; JONES, G.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.; BERRY, C. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* bacteria living inside of plants. **Microbial Bioechnology**. v. 2. p. 1560-1562, 2009.

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

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

OLIVEIRA, E. A. R. de; VIEIRA, B. da S.; FERNANDES, P. M.; CZEPAK, C.; ALVES, E. P. Eficácia dos inseticidas thiodicarb e methoxifenozeide no controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do algodão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 3, 2001, Campo Grande. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2001. p.240-242.

PRAÇA, L. B.; Gomes, A. C. M. M.; Cabral, G.; Martins, E.; Sujji, E. H.; Monnerat, R. G. Endophytic Colonization by Brazilian Strains of *Bacillus thuringiensis* on *Cabbage* Seedlings Grown *in Vitro*. Bt Research 2012, Vol.3, No.3, 11-19.

QUADT-HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, 43, p. 577-582, 1997.

RICHETTI, A.; MELO FILHO, G. A.; F. M. LAMAS; STAUT, L. A.; FABRÍCIO, A.C. 2004. Estimativa do custo de produção de algodão, safra 2004/05, para Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. Dourados: Embrapa Pecuária Oeste. 16p. (Embrapa, Comunicado Técnico, 91).

SANTOS, W. J.; SANTOS, K. B.; SANTOS, R. B. Ocorrência, descrição e hábitos de *Spodoptera* spp. em algodoeiro no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 4, 2003, Goiânia. **Anais...** Goiânia: 2003. (CD ROM).

SANTOS, W. J. Identificação, biologia, amostragem e controle das pragas do algodoeiro. In: **Algodão: tecnologia e produção**. EMBRAPA-CPAO. Dourados. 296p. 2001.

SANTOS, W. J. Monitoramento e controle de pragas do algodoeiro. In: CIA, E.; FREIRE, E. C.; SANTOS, W. J. (Ed). Cultura do algodoeiro. Piracicaba: POTAFOS, 1999. p. 133-179.

SANTOS, W. J. Problemas e soluções do manejo integrado de pragas do algodão. In: SEMINÁRIO ESTADUAL Do ALGODÃO, 4. 1998. **Anais...** Cuiabá: Fundação-MT. p. 39-48, 1998.

SANTOS, W. J. Manejo integrado de pragas do algodoeiro no Brasil. 1997. p. 48-71. In O. A. Fernandes, A. do C. B. Correia & S. A. de Bortoli. (Org.). Mato Grosso autossuficiência: O algodão no caminho do sucesso. Boletim de Pesquisa, Rondonópolis, MT. 352 p.

SOARES, J. J.; VIEIRA, R. M. *Spodoptera frugiperda* ameaça a cotonicultura brasileira. Campina Grande: Embrapa-CNPA, 1998. (Comunicado Técnico, 96).

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products microbiol. **Microbiology and Molecular Biology Review**, Washington, v. 67, p. 491-502, 2003.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S. de; VIEIRA, R. F. COSTA, F. E. C.; HARAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1, p. 43-49, 2007.

TORRES, J. B. Controle de Pragas do Algodoeiro: Expectativas e mudanças. Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Alagoas. *Ciência Agrícola*, v8, n1, p.37-49, 2008.

VALICENTE, F. H.; FONSECA, M. M. Suceptibilidade da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*, a diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*, 2004. **Revista Brasileira de milho e sorgo**, v. 3, n. 1 p. 21-29, 2004.

VELOSO, V. R. S. **Aspectos biológicos e avaliação de danos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em algodoeiro**. Piracicaba, 1982. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

VELOSO, V. R. S.; PARRA, J. R. P.; NAKANO, O. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em algodoeiro e milho. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, 12/13, n. 1, p.127-140, 1983.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 549-576. 1986.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ENDOFÍTICA DE *Bacillus thuringiensis* NO DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO DE GENÓTIPOS DE ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum*) EM RESPOSTA A DOIS MÉTODOS DE INOCULAÇÃO

RESUMO

A cultura do algodão (*Gossypium hirsutum*) depende de um bom estabelecimento inicial de plantas para que haja uma boa condução e sucesso da lavoura. *Bacillus thuringiensis* (Bt) destaca-se como agente microbiano que possui atividade entomopatogênica, cujos produtos contendo o gene ou o próprio microrganismo são utilizados em práticas de manejo do algodoeiro. Este trabalho propõe o uso de Bt atuando como microrganismo endofítico no período de desenvolvimento vegetativo do algodão. Sua utilização, seja no controle sistêmico de pragas ou na promoção do crescimento vegetal, poderá se tornar uma forma inovadora de uso com dupla aptidão. Para melhor elucidar o efeito de Bt como endofítico, ensaios em casa de vegetação e em laboratório foram instalados para avaliar a estirpe mais eficiente na colonização de plantas e a melhor forma de inoculação. Para este estudo, foram selecionadas as estirpes S1450, S1905, S2122 e S2124, já conhecidas pela atividade a insetos lepidópteros. Os tratamentos consistiram da aplicação de suspensão concentrada destas estirpes de Bt no colo da planta próximo ao solo e via inoculação das sementes de três genótipos de algodão: BRS 286, BRS Aroeira e BRS 8H. Após 40 dias, os seguintes parâmetros foram avaliados: índice de velocidade de germinação, altura de plantas, número de folhas, comprimento de raiz, matéria seca da parte aérea e das raízes. Em laboratório, foi realizada a inoculação destas estirpes de Bt marcadas com Metionina ³⁵S em plantas de algodão para observação da colonização endofítica por radiomarcagem, após secagem e exposição ao filme de autoradiografia. As plantas da cultivar BRS 8H apresentaram incremento em sua parte aérea, na matéria seca e no número de folhas quando suas sementes foram tratadas com a estirpe S2122 em comparação com as estirpes S1450 e S1905. Esta mesma estirpe quando inoculada na semente da cultivar BRS Aroeira apresentou efeito inibitório na velocidade de emergência e no crescimento das plantas até os 27 dias após emergência, além de redução da matéria seca quando comparados com a testemunha. Nos ensaios com radiomarcagem, a colonização das estirpes de Bt foi observada em todos os tecidos das plantas. Os resultados demonstram que a melhor interação foi o tratamento de sementes com a estirpe S2122 e o BRS 8H, mostrando que diferentes estirpes podem estabelecer diferentes padrões de colonização e interação com diferentes genótipos.

Palavras-chave: Bt, endofítico, colonização, promoção de crescimento

ABSTRACT

The cotton crop (*Gossypium hirsutum*) depends on a good initial establishment of plants so that the plantation can be well run and successful. *Bacillus thuringiensis* (Bt) stands out as a microbial agent that has entomopathogenic activity, and its products that contain the gene or the microorganism itself are used in cotton management practices. This work proposes the use of Bt working as an endophytic microorganism in the vegetative development period of cotton. Its use, be it in systemic control of pests or in the promotion of plant growth, may become an innovative way of using it doubly. To better elucidate the effect of Bt as an endophyte, greenhouse and laboratory assays were installed to evaluate the strain that was most efficient in colonizing plants and the best form of inoculation. For this study, strains S1450, S1905, S2122 and S2124 were selected, already known for their activity against lepidopteran insects. The treatments consisted of applying concentrated suspension of these strains of Bt around the stem close to the soil and via seed inoculation of three cotton genotypes: BRS 286, BRS Aroeira and BRS 8H. After 40 days, the following parameters were evaluated: germination speed index, plant height, number of leaves, root length, dry matter of the aerial part and of the roots. In the laboratory, these Bt strains marked with 35 S Methionine were inoculated into cotton plants for the observation of endophytic colonization by radiomarking, after drying and exposure of the autoradiographic film. Plants of the cultivar BRS 8H presented an increment in their aerial part, in the dry matter and in the number of leaves when their seeds were treated with strain S2122 in comparison to strains S1450 and S1905. This same strain, when inoculated into the seed of cultivar BRS Aroeira, presented an inhibitory effect on the speed of plant emergence and growth until 27 days after emergence, as well as reducing dry matter when compared with the control. In the assays with radiomarking, colonization of Bt strains was observed in all plant tissues. The results demonstrated that the best interaction was the treatment of seeds with strain S2122 and cultivar BRS 8H, showing that different strains can establish different patterns of colonization and interaction with different genotypes.

Key-words: Bt, endophytic, colonization, growth promotion

1. INTRODUÇÃO

Nos sistemas de produção agrícola, o algodoeiro permanece por um período vegetativo maior que o das outras culturas, quando comparada à soja e ao milho (SANTOS, 1999). Existem fatores que influenciam positivamente o desempenho das plantas como uniformidade de germinação e o rápido desenvolvimento radicular nesta fase de estabelecimento da lavoura. Existe alta correlação entre o desenvolvimento inicial das plântulas e a produtividade, por isso é necessária a adoção de práticas que possam auxiliar o algodoeiro a superar os estresses existentes nas primeiras fases de seu desenvolvimento (BECKER *et al.*, 1999).

Entre os estresses existentes, cita-se a ocorrência de insetos-praga, sendo a *Spodoptera frugiperda* uma das mais danosas porque ocorre desde a emergência até a maturação dos (SANTOS, 2001; GALLO *et al.* 2002). Um dos métodos mais utilizados no controle dessa praga é por meio de produtos químicos com aplicações subsequentes o que oneram os custos de produção e a aumentam as chances de resistência dos insetos aos princípios ativos.

Uma alternativa de controle para essa praga seria por meio de produtos formulados a base de *Bacillus thuringiensis*. Todavia, a disponibilidade de relatos sobre o uso deste microrganismo como endofítico é limitada. Estudos demonstraram que existem estirpes de *Bacillus thuringiensis* capazes de colonizar plantas de algodão e de couve, configurando-as como organismos endofíticos, conjugado à sua capacidade tóxica à insetos lepidópteros (MONNERAT *et al.*, 2003; PRAÇA *et al.*, 2012).

Neste trabalho avaliou-se duas metodologias de inoculação de *B. thuringiensis* com o objetivo de investigar se há promoção de crescimento de plantas de algodoeiro no estágio vegetativo de desenvolvimento e efeito de toxidez sobre *S. frugiperda*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Quatro estirpes de *B. thuringiensis* foram avaliadas quanto ao seu potencial de promoção de crescimento e biocontrole sobre *S. frugiperda* em três cultivares de algodão herbáceo. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas e em casa de vegetação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Brasília-DF.

2.1 Estirpes de *Bacillus thuringiensis*

Foram utilizadas três estirpes: S1905, S2122, S2124, isoladas de solo e pertencentes à Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa), e a estirpe S1450 - *Bacillus thuringiensis* subespécie *kurstaki* (Btk) - HD 1 obtida da Coleção de *Bacillus thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus* do Instituto Pasteur de Paris, tomada como padrão. Todas consideradas tóxicas à insetos da ordem Lepidoptera e ativas contra *S. frugiperda*.

2.2 Material Vegetal

Sementes de três cultivares de algodão: BRS 8H, BRS Aroeira, BRS 286 cedida pela Embrapa Algodão - Campina Grande-PB. Foram cultivadas em casa de vegetação para a avaliação do efeito de *B. thuringiensis* como organismo endofítico.

2.3 Preparo e liofilização das estirpes de *Bacillus thuringiensis*

As três estirpes bacterianas e a estirpe controle foram cultivadas em meio Embrapa (MONNERAT *et al.*, 2007) a 28°C, por 48 horas a 400 rpm em Fermentador Microferm New

Brunswick, modelo MF 214 (Figura 4-A). As estirpes foram visualizadas em microscópio óptico de contraste de fases com aumento de 1000X para observação de esporos e cristais. Para cada estirpe multiplicada em fermentador foram realizadas centrifugações a 9.500 rpm por 30 minutos (Centrífuga Hettich Zentrifugen, modelo Rotanda 460R), o sobrenadante foi desprezado para obtenção de um *pellet* concentrado ao final do trabalho. Este *pellet* foi ressuspensionado em água destilada, congelado e depois liofilizado em Liofilizador Christ, modelo Alpha 2-4 LD plus (Figura 4-B). Os materiais liofilizados foram acondicionados em tubos Falcon e armazenados a -20°C.

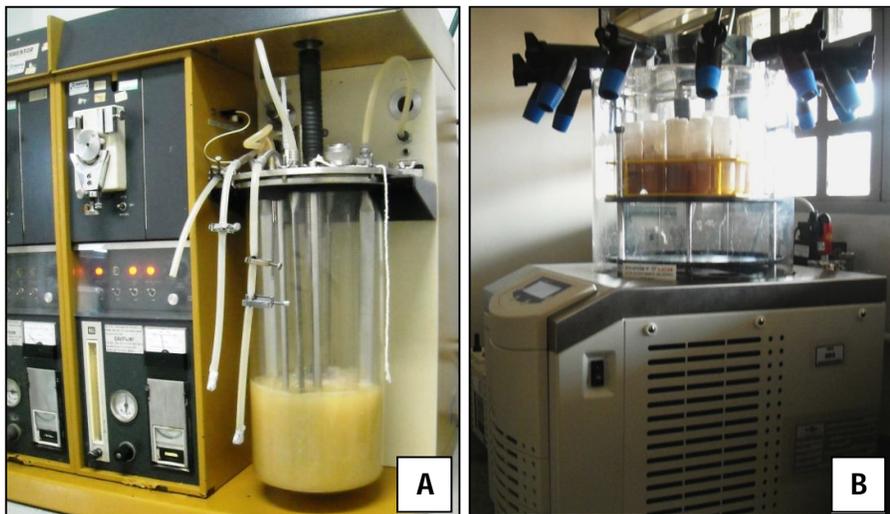


Figura 4 - Equipamentos usados no preparo das amostras. Fermentador em funcionamento com crescimento bacteriano (A); Liofilizador durante a secagem do material bacteriano concentrado (B).

2.4 Contagem de esporos

A qualidade da biomassa liofilizada utilizada nos ensaios foi avaliada a partir da quantificação de esporos das amostras. A quantificação foi feita através da determinação do número de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). A capela de fluxo laminar foi

deixada por 20 minutos sob exposição de UV. Foram utilizados tubos de ensaio autoclavados e ponteiros estéreis.

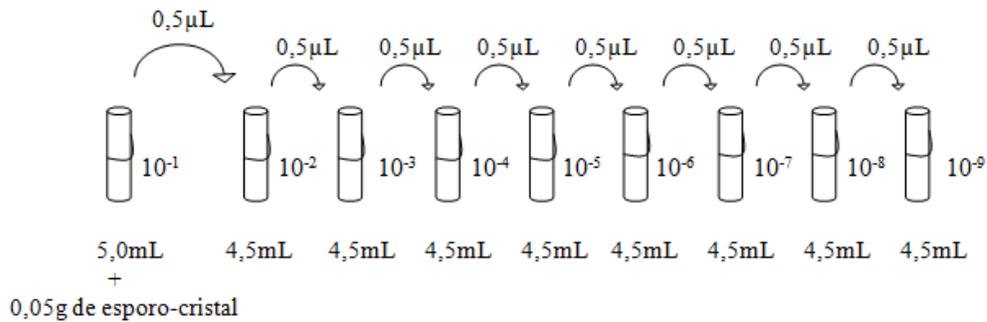


Figura 5 - Esquema representativo do procedimento das diluições em série.

Conforme ilustra a Figura 5, em 5 mL de água destilada autoclavada foram diluídos 0,005 g da biomassa liofilizada contendo esporo-cristal (diluição 10^{-1}). A diluição 10^{-1} foi homogeneizada em vórtex, e para a composição da diluição 10^{-2} , foram acrescentadas 4,5 mL de água destilada autoclavada e $0,5\mu\text{L}$ da diluição anterior e assim sucessivamente. Todas as diluições foram plaqueadas em triplicada em placas de Petri contendo meio Embrapa Ágar (MONNERAT *et al.*, 2007) utilizada a técnica da gota. Para cada replicata foram plaqueados $10\mu\text{L}$ da diluição correspondente com auxílio de uma pipeta. As placas foram vedadas com filme PVC, de forma que o meio de cultura estivesse voltado para cima, e foram incubadas em estufa a 28°C por aproximadamente 15 horas, para posterior contagem (Figura 6).

O procedimento foi realizado para as quatro estirpes de bactérias.

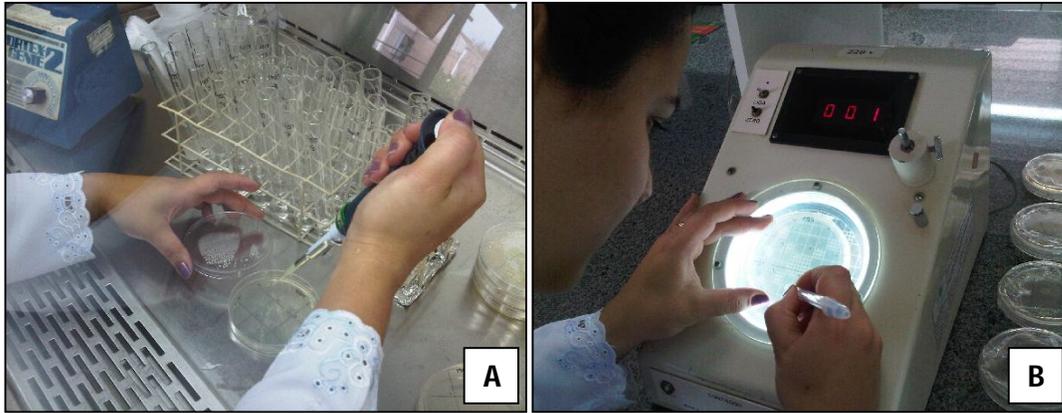


Figura 6 - Ilustração do procedimento para determinação da concentração de células bacterianas. Processo de diluição em série e plaqueamento utilizando a técnica da gota (A); leitura de placas após 15 horas de crescimento das colônias (B).

2.5 Ensaio de promoção de crescimento no estágio vegetativo de plantas do algodoeiro após inoculação por *B. thuringiensis*

Três cultivares de algodão foram inoculadas com as quatro estirpes de *B. thuringiensis*, utilizando-se dois métodos de inoculação, via semente e via planta. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura de $28 \pm 4^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 10\%$.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial $5 \times 3 \times 2$, com quatro estirpes de *B. thuringiensis* (S1905, S2122, S2124, S1450 (Btk) estirpe padrão HD-1), três cultivares de algodão (BRS 8H, BRS Aroeira, BRS 286), duas formas de inoculação das estirpes (via semente e via planta) e cinco repetições por tratamento. Em cada vaso (com capacidade para 4,5 litros, previamente lavados com hipoclorito de sódio 2,0%), foram semeadas seis sementes em substrato comercial PlantMax®, produto isento de pragas e microrganismos patogênicos, suplementado com a formulação (40-60-30) de N-P-K. As plantas foram desbastadas 10 dias após o semeio, deixando-se três plantas por vaso onde

foram avaliadas por um período de 40 dias. Para a manutenção da umidade, as regas foram mantidas conforme a necessidade verificada pelo aspecto visual do substrato.

2.5.1. Inoculação das estirpes de *B. thuringiensis* via sementes de

As sementes das cultivares de algodão BRS 8H, BRS Aroeira e BRS 286, foram inoculados com cada uma das estirpes S1905, S2122, S2124 e Btk (estirpe padrão), para verificar o potencial desse organismo em colonizar a semente e atuar de forma endofítica.

Primeiramente, foi preparada uma suspensão de cada uma das bactérias liofilizadas adicionadas em água destilada estéril. Cada uma destas suspensões continham a mesma concentração bacteriana (10^7 UFC/mL). As sementes foram imersas nestas suspensões e mantidas sob agitação em plataforma agitadora a 130 rpm por 20 minutos. Após este período, as sementes foram retiradas das suspensões e semeadas em vasos contendo substrato com profundidade uniforme e mantidos em casa de vegetação. As sementes foram previamente submetidas ao teste de emergência em areia lavada para observação do potencial germinativo.

2.5.2. Inoculação das estirpes de *B. thuringiensis* via plantas

Neste tratamento, as cultivares de algodão foram semeadas em vasos e mantidas em casa de vegetação. Porém, o método de inoculação biológico tomado foi posterior a emergência das plântulas. Foi utilizada uma única dose de 1 ml da bactéria liofilizada resuspendida em água destilada contendo a mesma concentração bacteriana (10^7 UFC/mL). Logo após, a suspensão de cada uma das estirpes foi inoculada no colo da planta próximo ao substrato no décimo primeiro dia após o semeio (Figura7) para avaliar a capacidade de colonização da planta e de promover o crescimento vegetal.

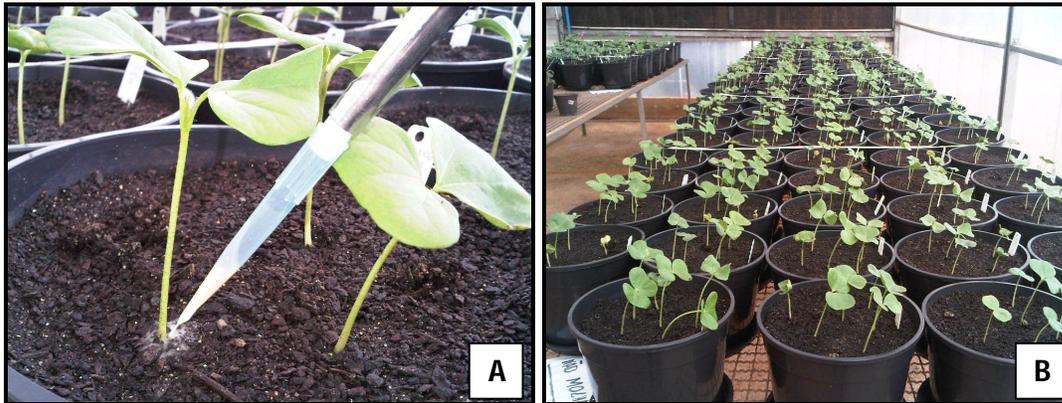


Figura 7 - Inoculação de 1 mL da suspensão bacteriana em plantas de algodão (A); experimento em casa de vegetação (B).

2.5.3 Avaliação do desempenho e desenvolvimento das plantas

A partir da emergência da primeira plântula foram realizadas contagens diárias do número de plântulas emergidas até o sexto dia para cálculo do índice de velocidade de emergência (IVE). A emergência das plântulas foi caracterizada pela emissão de seus cotilédones para a superfície do substrato para avaliar a influência das bactérias na germinação das sementes.

O cálculo do IVE foi feito segundo a metodologia proposta por MAGUIRE (1962):

$$IVE = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_n}{N_n}$$

onde:

G_1, G_2 e G_n = número de plântulas na primeira, na segunda e na última contagem

N_1, N_2 e N_n = número de dias de semeadura à primeira, segunda e última contagem

A capacidade das bactérias em induzir o crescimento foi medida pela capacidade de enraizamento e produção de fitomassa. A cada sete dias decorridos da inoculação na planta foi realizado um levantamento de dados como: altura de planta e número de folhas. A altura da parte aérea foi determinada medindo-se, com uma régua graduada em centímetros, a distância entre o coleto e o ápice da planta.

Ao término do experimento, as três plantas de cada vaso foram devidamente coletadas, lavadas em água corrente e imediatamente secas em papel absorvente. O comprimento das raízes foi medido com auxílio de régua também graduada em centímetros. Posteriormente, as plantas foram mantidas em estufa com circulação de ar a 60°C por aproximadamente 72 horas até a estabilização da massa. Em sequência foram pesadas utilizando-se balança analítica para a determinação da matéria seca.

Em síntese, as variáveis avaliados foram a velocidade de emergência, altura da parte aérea das plantas, número de folhas, comprimento da raiz e peso da matéria seca da parte aérea e do sistema radicular.

Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparados pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5% de probabilidade, ou quando os dados não cumpriam as premissas necessárias para este teste foi usada análise de variância não-paramétrica (Kruskal-Wallis) e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Dunn empregando-se o programa estatístico SigmaStat (KUO *et al.*, 1992).

2.6 Bioensaio com *Spodoptera frugiperda* em plantas

Neste trabalho, foram usadas lagartas criadas em laboratório com condições reguladas e temperatura de 28°C, fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de 60% (Figura 8). A alimentação foi baseada em dieta artificial composta de feijão, levedo de cerveja, germe de trigo, vitaminas e sais minerais (SCHMIDT *et al.*, 2001).

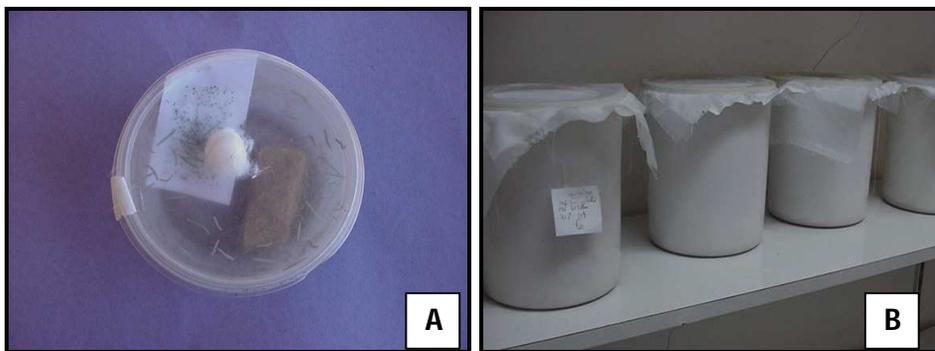


Figura 8 - Larvas se alimentando da dieta após a eclosão (A); gaiolas de adultos de *Spodoptera frugiperda* (B) (MONNERAT, 2003).

Para o bioensaio "in vivo" foram usadas plantas com trinta e sete dias, contados a partir da data de semeadura, inoculadas com *B. thuringiensis* via semente e via planta. Cada vaso, que corresponde a um tratamento, consistiu de um tipo de inoculação, com uma única estirpe e uma cultivar, perfazendo todos os tratamentos propostos (Figura 9-A). Cada um dos vasos possuía três plantas de algodão e em cada planta foram colocadas 10 lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda* (Figura 9-B). Portanto, cada unidade experimental estava composta por 3 plantas, onde cada tratamento tinha um número de 30 lagartas. Cuidados foram tomados no sentido de isolar a parte exposta do substrato com papel alumínio e cada planta foi envolvida por tecido em voal o que permitiu a circulação de ar e a individualização de cada planta com indivíduos de *S. frugiperda*. Esse procedimento permitiu o contato do inseto-praga direto com a planta e a possibilitou a contagem de lagartas e a determinação do percentual de mortalidade.

O bioensaio foi conduzido na sala de bioensaio com temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e condições de iluminação, umidade e fotoperíodo de 12 horas, adequados ao desenvolvimento de *S. frugiperda* (Figura 9-C).



Figura 9 - Bioensaio em plantas de algodão e *S. frugiperda*. Plantas na sala climatizada para ensaio de interação Bt/Planta/Praga (A); individualização das plantas e apresentação às lagartas (B); acondicionamento dos tratamentos por 48 horas para posterior leitura (C).

A leitura do bioensaio foi realizada após 48 horas da infestação, registrando-se o número de lagartas mortas e vivas. A seguir, as lagartas vivas foram colocadas individualmente em copos descartáveis contendo dieta artificial, permanecendo por 7 dias, contados a partir da data de início do ensaio, em câmara (Figura10). Decorrido este período foi realizada a segunda leitura verificar se as lagartas apresentavam sintomas de intoxicação.

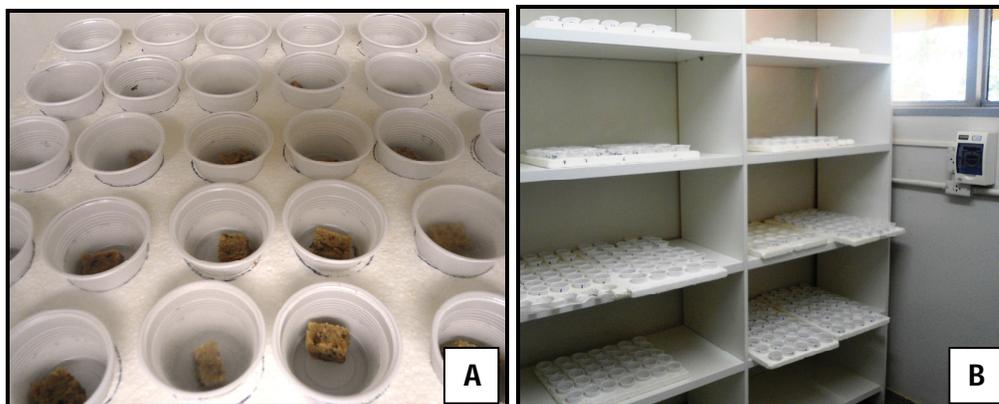


Figura 10 - Segundo momento do bioensaio no qual as lagartas foram colocadas em dieta artificial. Individualização das lagartas em copos plásticos após 48 horas de alimentação em plantas inoculadas com *B. thuringiensis* (A); acondicionamento em sala de bioensaio com controle de fotoperíodo (B).

2.7 Teor nutricional de plantas inoculadas com *B. thuringiensis*

Ao final do experimento em casa de vegetação, selecionou-se apenas uma cultivar e uma estirpe para estas análises, representadas por BRS 8H e S2122 considerando-se a uniformidade das plantas durante o ensaio. Amostras de plantas não inoculadas também foram preparadas como testemunha.

Para cada tratamento três plantas foram utilizadas na constituição três amostras ou repetição. A parte aérea das plantas foram previamente secas em estufa a 60°C por 72 horas quando apresentou peso constante. Em seguida, as folhas foram seccionadas do caule, trituradas e acondicionadas em tubos plásticos devidamente identificadas e encaminhadas para laboratório de análise foliar para obtenção dos teores de macro (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (B, Zn, Fe, Mn, Cu).

2.8 Autoradiografia de plantas de algodão colonizadas pelas estirpes de *B. thuringiensis* marcadas com Metionina ³⁵S

Com o objetivo de confirmar a capacidade de colonização endofítica, estirpes de *B. thuringiensis* foram marcadas com Metionina ³⁵S e inoculadas em algodão. Inicialmente, sementes de algodão foram desinfestadas superficialmente em etanol 70% por 5 minutos, e em hipoclorito de sódio 2% por 30 min. A seguir, as sementes foram submetidas a três lavagens com água destilada estéril e transferidas para papel filtro autoclavado para retirar o excesso de água. Após a desinfecção, as sementes foram semeadas em placas de Petri contendo meio MS solidificado com 0,7% de Ágar e pH 5,8 (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e deixadas para germinar por 2 dias no escuro. Após este período, as sementes germinadas foram transferidas para tubos cônicos de 50 mL contendo meio MS solidificado e mantidas por cerca de 15 dias em sala de cultura a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Dois dias antes de ser realizada a inoculação na planta, as estirpes bacterianas foram inoculadas separadamente em placas de Petri contendo meio Ágar Embrapa acrescido de Metionina ³⁵S a uma concentração de 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ e mantidas a temperatura ambiente por 48 horas. Em seguida, a massa bacteriana crescida sobre a superfície da placa foi raspada com pipeta Pasteur e misturada em 1 mL de tampão PBS. Este volume aplicado na base da planta de algodão próximo às raízes. Uma planta foi deixada como testemunha. Após sete dias, as plantas foram retiradas dos tubos, suas raízes foram limpas com papel absorvente e, assim, colocadas dentro de papel celofane para secagem em secador de gel a vácuo por aproximadamente 1 hora e 40 minutos a uma temperatura de 60°C . Depois de secas as plantas foram acondicionadas em cassetes de chumbo e, no escuro, expostas a um filme de autoradiografia onde permaneceram por um período de 30 dias. O filme foi imerso em solução reveladora, água e solução fixadora. Em cada uma destas soluções o filme permaneceu por 1 minuto para que ocorresse a visualização da radiomarcção.

2.9 Observação de *B. thuringiensis* em sementes de algodão inoculadas utilizando microscopia eletrônica de varredura

Para este ensaio foram utilizadas sementes da cultivar BRS 8H e as estirpes S1450, S1905, S2122 e S2124 de *B. thuringiensis*. Primeiramente foi preparada uma suspensão de cada uma das bactérias liofilizadas adicionadas em água destilada estéril e Silwet a 0,01% do volume de água contendo a mesma concentração bacteriana (10^7 UFC/mL). As sementes foram imersas em cada uma das suspensões e mantidas sob agitação em plataforma agitadora a 130 rpm por 20 minutos. Após este período, as sementes foram retiradas do líquido bacteriano e transferidas, separadamente, para tubos ependorfs de 2 mL. Estas amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio a 0,1M pH 7,0 e colocados em rotator orbital (4 rpm) por 24 hs.

Após esta etapa, as amostras foram submetidas a duas lavagens de 15 minutos em tampão cacodilato de sódio a 0,1M pH 7,2, seguidas de imersão em solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 2% por 2hs. As amostras pós-fixadas em OsO_4 foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M, por 3 vezes seguidas e por mais 2 vezes com água a cada 15 minutos.

Foi realizada a desidratação dos materiais em série etanólica crescente (10, duas vezes de 30, 50, 70, 90 e 100%) permanecendo por 2 horas em cada uma das concentrações, sempre utilizando um rotator orbital. Em seguida, as amostras foram secas pelo método do ponto crítico do CO_2 em aparelho Baltec CPD 030, recobertas com 25nm de ouro em aparelho MED 010 da Balzers e observadas ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962 (Figura 11).

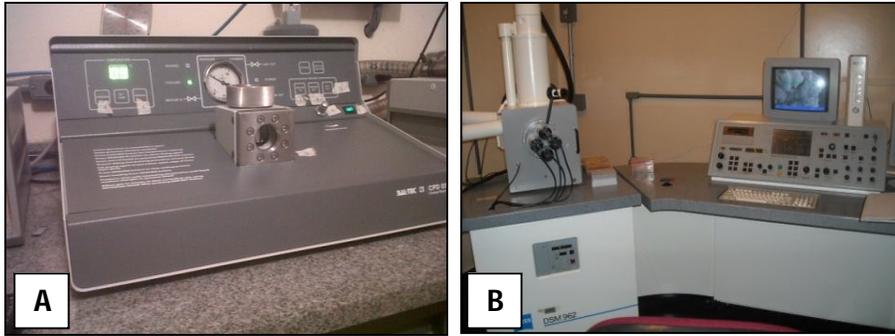


Figura 11 - Equipamentos utilizados para preparo e visualização das amostras. Equipamento para secagem das amostras pelo método de ponto crítico de CO₂ (A); Microscópio eletrônico de varredura (B).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio de promoção de crescimento no estágio vegetativo de desenvolvimento de plantas do algodoeiro após inoculação por *B. thuringiensis*

3.1.1 Avaliação do desempenho e desenvolvimento das plantas

3.1.1.1 Índice de velocidade de emergência (IVE)

A emergência das plântulas teve início aos quatro dias após o plantio. O cálculo do IVE foi feito segundo a metodologia proposta por MAGUIRE (1962) para todos os tratamentos que receberam inoculação na semente. Quando maior o índice atingido, mais rápida será a determinação do estande de plântulas.

Na Figura 12, nota-se que para a cultivar BRS 8H a estirpe S2122 respondeu de modo semelhante à inoculação com a bactéria, já a estirpe S2124 apresentou índice de 3,5 e menor que a testemunha (4,7), configurando um retardo pela inibição na velocidade de emergência (ANOVA: F = 4,495; P = 0,009).

Para a cultivar BRS Aroeira a estirpe S2122 obteve padrão de resposta diferente do que foi verificado para a cultivar BRS 8H. A S2122 obteve um índice de 2,1 contra 3,9 da testemunha, produzindo um efeito inibitório na emergência de plântulas e com diferença estatística significativa (ANOVA: $F = 3,501$; $P = 0,025$).

Para a cultivar BRS 286 a estirpe S2122 foi estatisticamente semelhante à testemunha que por vez foi superior às demais estirpes inoculadas (ANOVA: $F = 3,670$; $P = 0,021$).

A estirpe S2122 foi semelhante à testemunha na BRS 8H e BRS 286 não prejudicando a germinação, mas na BRS Aroeira provocou efeito inibitório mostrando que a estirpe obteve resposta genótipo-dependente com as cultivares.

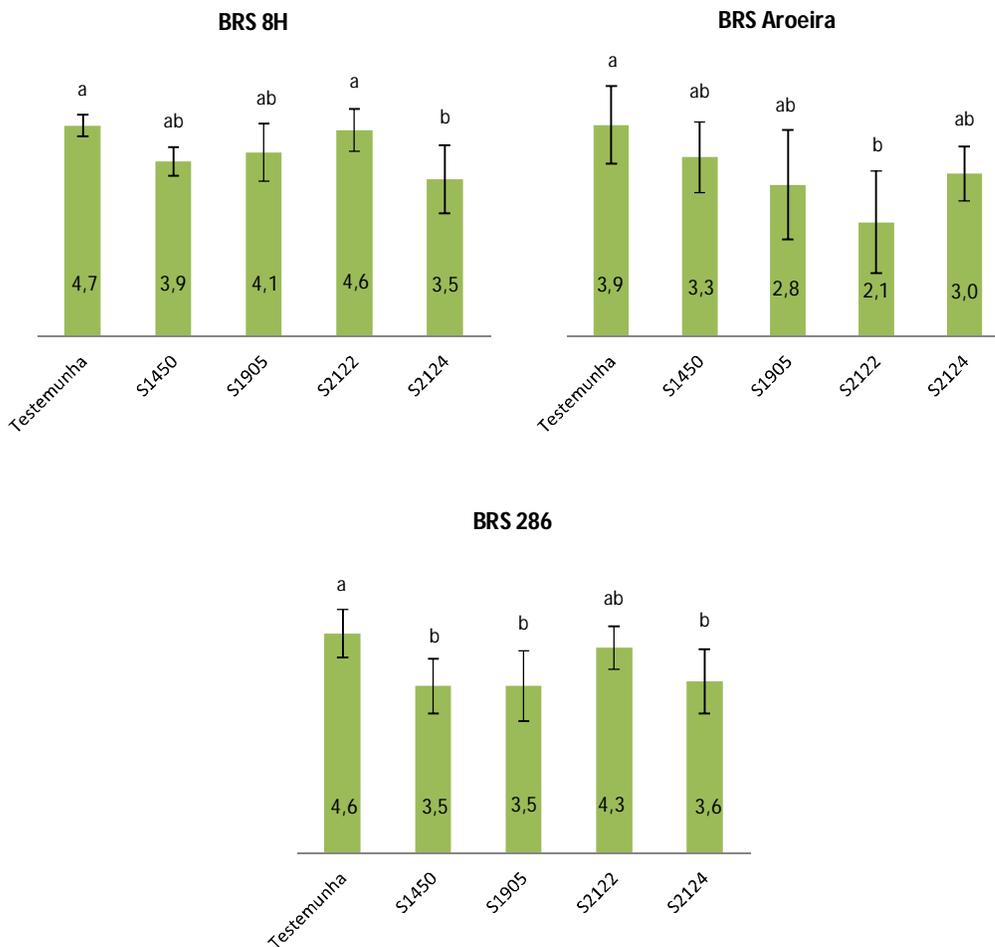


Figura 12 - Índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes tratadas com estirpes de *B. thuringiensis* nas cultivares de algodão BRS 8H, BRS Aroeira e BRS 286.

Para MARTINS *et al.* (1999), uma germinação rápida e uniforme das sementes, seguida por imediata emergência das plântulas são características altamente desejáveis, pois quanto mais tempo a plântula permanecer nos estádios iniciais de desenvolvimento e demorar a emergir no solo, mais vulnerável estará às condições adversas do meio.

3.1.1.2 Parte aérea

O padrão de crescimento da parte aérea das cultivares de algodão colonizadas com estirpes de *B. thuringiensis* é apresentado nas Figuras 13 a 15. As tabelas com as médias das avaliações semanais encontram-se em anexo. Conforme visto na análise anterior, a interação genótipo e estirpe também é confirmado nas diferentes fases de crescimento das plantas.

Para a cultivar BRS 8H com inoculação via semente (Figura 13-A), todos os tratamentos utilizando as estirpes de *B. thuringiensis*, ao treze dias após a emergência (DAE), foram superiores à testemunha com variações de 21,447 a 22,420 cm sobre 18,033 cm de média obtida para plantas não inoculadas (ANOVA: $F = 3,717$; $P = 0,020$). A partir dos 20 DAE, a estirpe S2122 se destacou perante as outras estirpes, mas melhor que a testemunha (ANOVA: $F = 4,803$; $P = 0,007$) e foi estatisticamente superior às S1450 e S1905 até o final do ensaio. A partir do 20º dia de emergência das plantas e até o final do ensaio, as estirpes S1450 e S1905 foram, respectivamente, 20,07% e 26,51% menores na parte aérea comparadas com a testemunha. Aos 34 dias após a emergência, não mais foi evidenciada diferença da S2122 com a testemunha, porém a S2122 não foi diferente da S2124.

Estes efeitos podem ser explicados pelo fato de que bactérias endofíticas podem estimular o crescimento de plantas em um estágio de desenvolvimento e inibir em outro (STURZ *et al.* 2000).

Portanto, verifica-se que a estirpe S2122 promoveu maior arranque no crescimento das plantas a partir dos 20 dias, porém a partir aos 27 dias, igualou-se à testemunha. Provavelmente uma única aplicação não tenha possibilitado uma maior permanência deste microrganismo até o final do ensaio.

No tratamento onde a inoculação das estirpes ocorreu no colo das plantas, nenhuma diferença estatística foi observada (Figura 13-B). O que é positivo quando se pensa no controle biológico, do contrário não poderia ser utilizada.

GOMES *et al.* (2003) demonstraram que duas bactérias, *B. thuringiensis* e *Bacillus pumilus*, isoladas de plantas de couve, aumentaram o crescimento de alface cultivada em casa de vegetação. SILVA (2004) observou que a altura de plantas de tomateiro foi afetada pela introdução de algumas bactérias endofíticas, sendo que *Acinetobacter johnsonii* e *Bacillus pumilus* promoveram a maior altura das plantas em 9,5% e 20,2%, respectivamente. Plântulas de abacaxizeiro propagadas *in vitro* tiveram seu crescimento induzido após inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas (BALDOTTO *et al.*, 2010).

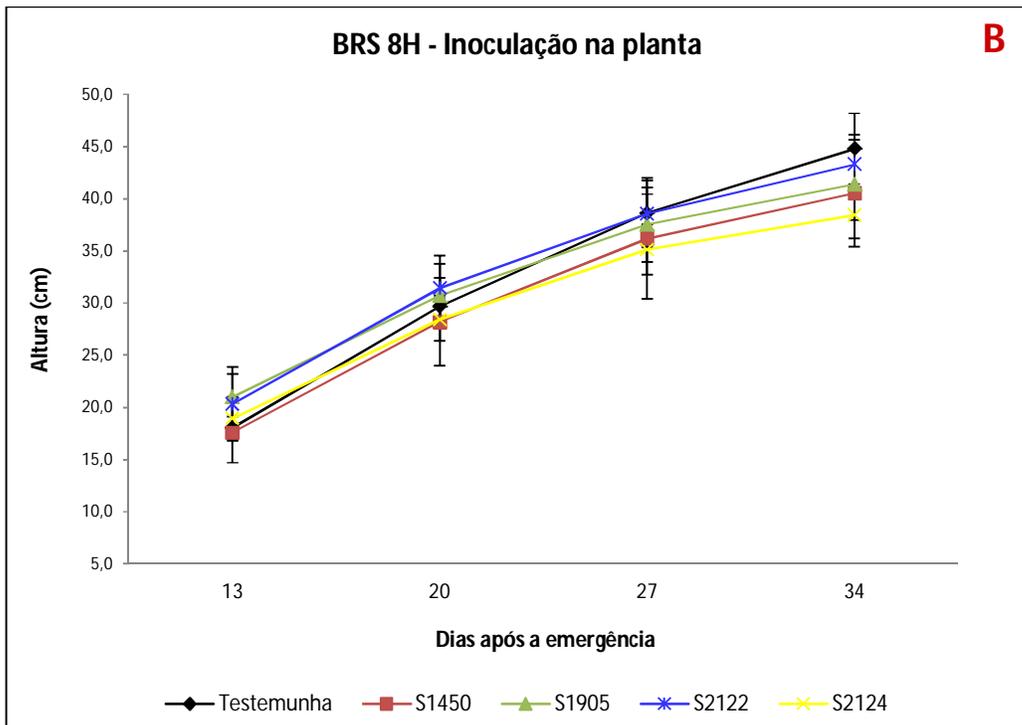
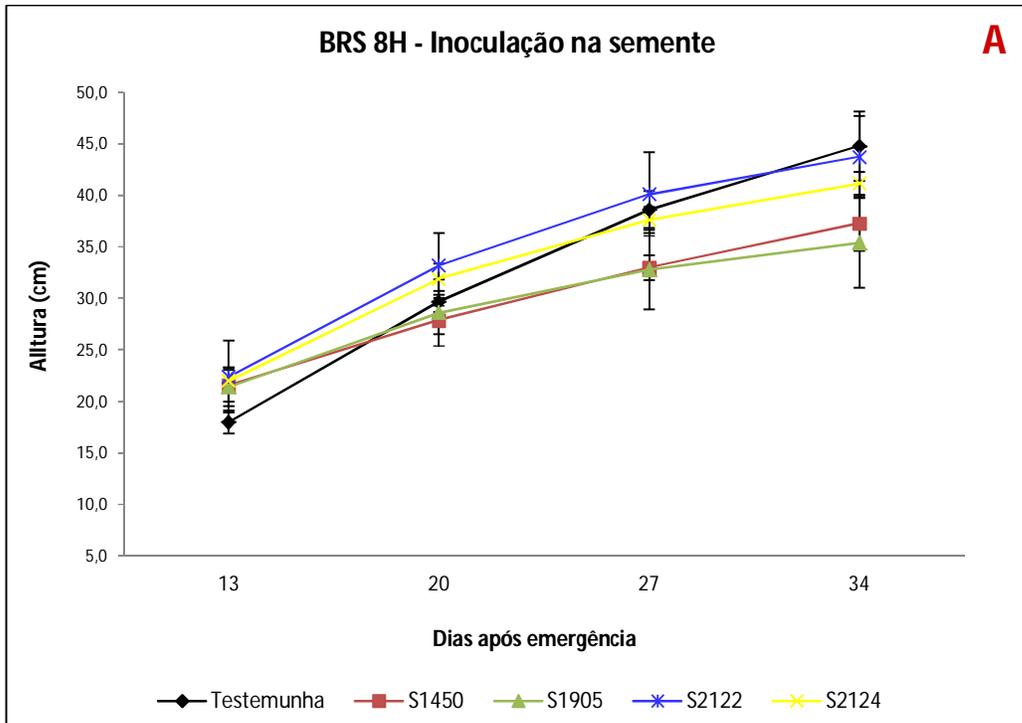


Figura 13 - Altura de plantas do algodoeiro da cultivar BRS 8H inoculadas com *B. thuringiensis* na semente e na planta ao longo de quatro semanas.

Para a cultivar BRS Aroeira com inoculação em semente (Figura 14-A), a estirpe S2122 apresentou efeito inibitório no crescimento das plantas com diferenças estatísticas detectadas aos 20 e 27 DAE quando comparados com a testemunha (ANOVA: $F = 3,042$; $P = 0,041$) e (ANOVA: $F = 4,081$; $P = 0,014$). Ao final do ensaio a parte aérea do tratamento utilizando esta estirpe foi 55,92% menor que a testemunha (Kruskal-Wallis: $H_4 = 9,570$; $P = 0,048$). PROBANZA (1996) demonstra o efeito negativo de *B. subtilis* no comprimento da parte aérea e raízes de pinus (*Pinus taeda* L.). SANTOS *et al.* (2005) observaram o efeito negativo de diferentes espécies de bactérias endofíticas e epifíticas sobre o desenvolvimento de unidades propagativas de helicônia (*Heliconia psittacorum* L.).

Com inoculação de *B. thuringiensis* na planta da BRS Aroeira (Figura 14-B) houve diferença estatística com uma inibição da estirpe S1450 comparada apenas com a S2122 no 27º dia após a emergência, com uma inibição de 20,25% em relação à testemunha (ANOVA: $F = 3,300$; $P = 0,031$).

Portanto, o efeito da estirpe S2122 na planta da cultivar Aroeira foi o oposto ao observado negativamente para inoculação na semente, mostrando que há diferença entre a interação de cultivares e estirpes. Segundo HARDOIM *et al.* (2008) e DAVITT *et al.* (2011) a relação da colonização do organismo endofítico e da planta hospedeira pode ser influenciada pelo genótipo e pelo estágio de crescimento.

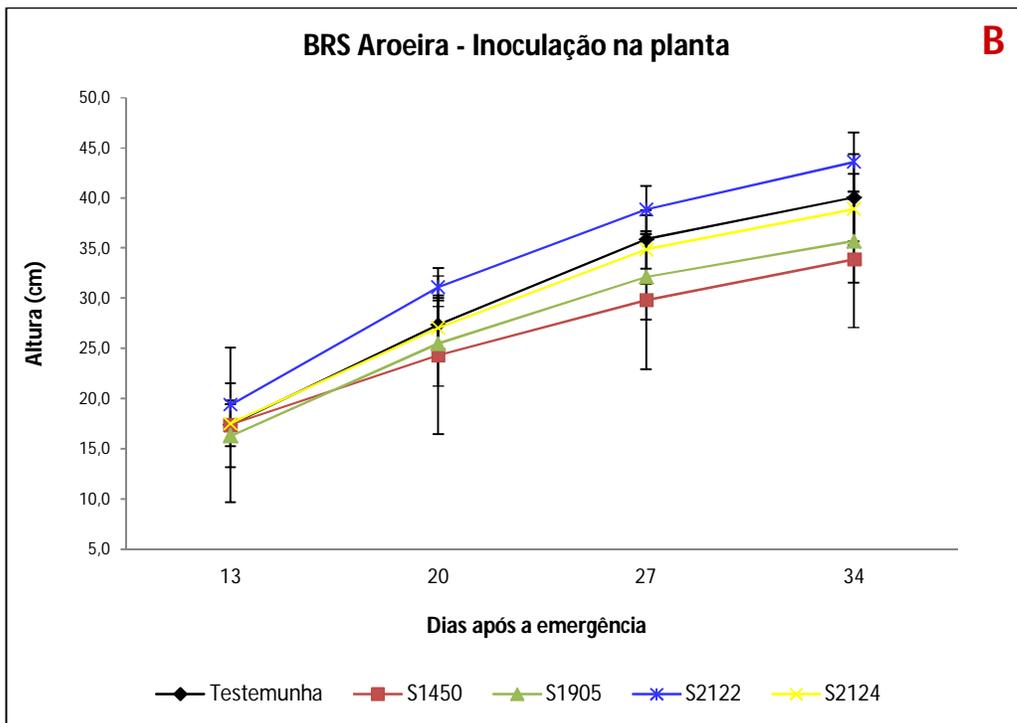
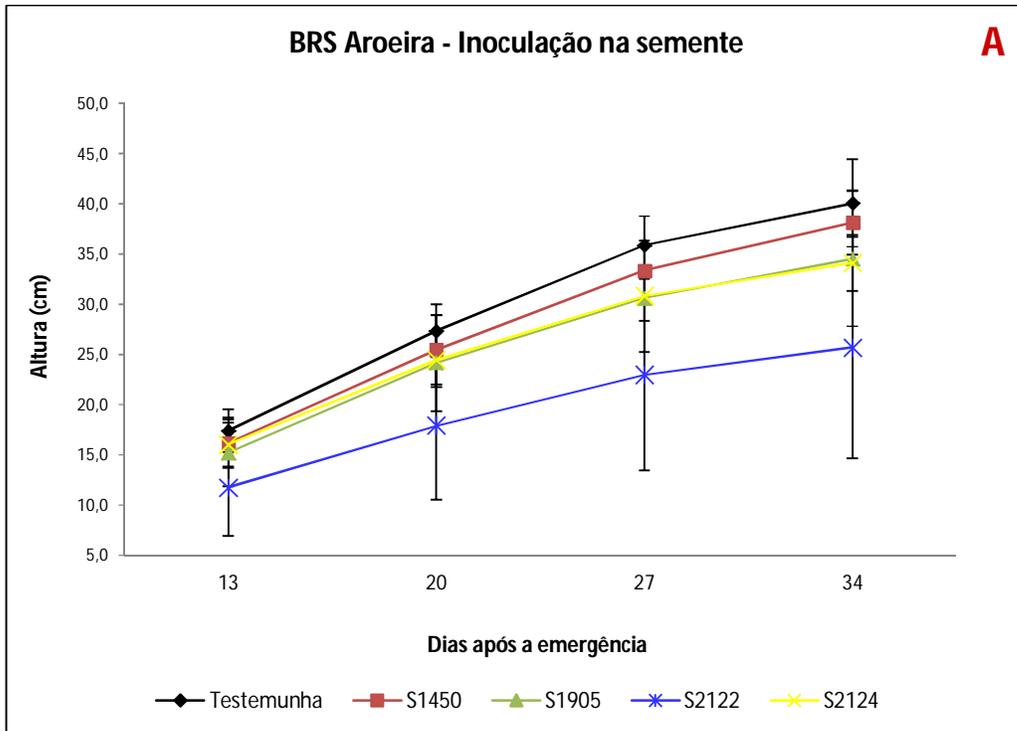


Figura 14 - Altura de plantas do algodoeiro da cultivar BRS Aroeira inoculadas com *B. thuringiensis* na semente e na planta ao longo de quatro semanas.

Para a cultivar BRS 286 não foi detectada nenhuma diferença estatística para nenhum dos métodos de inoculação (Figura 15).

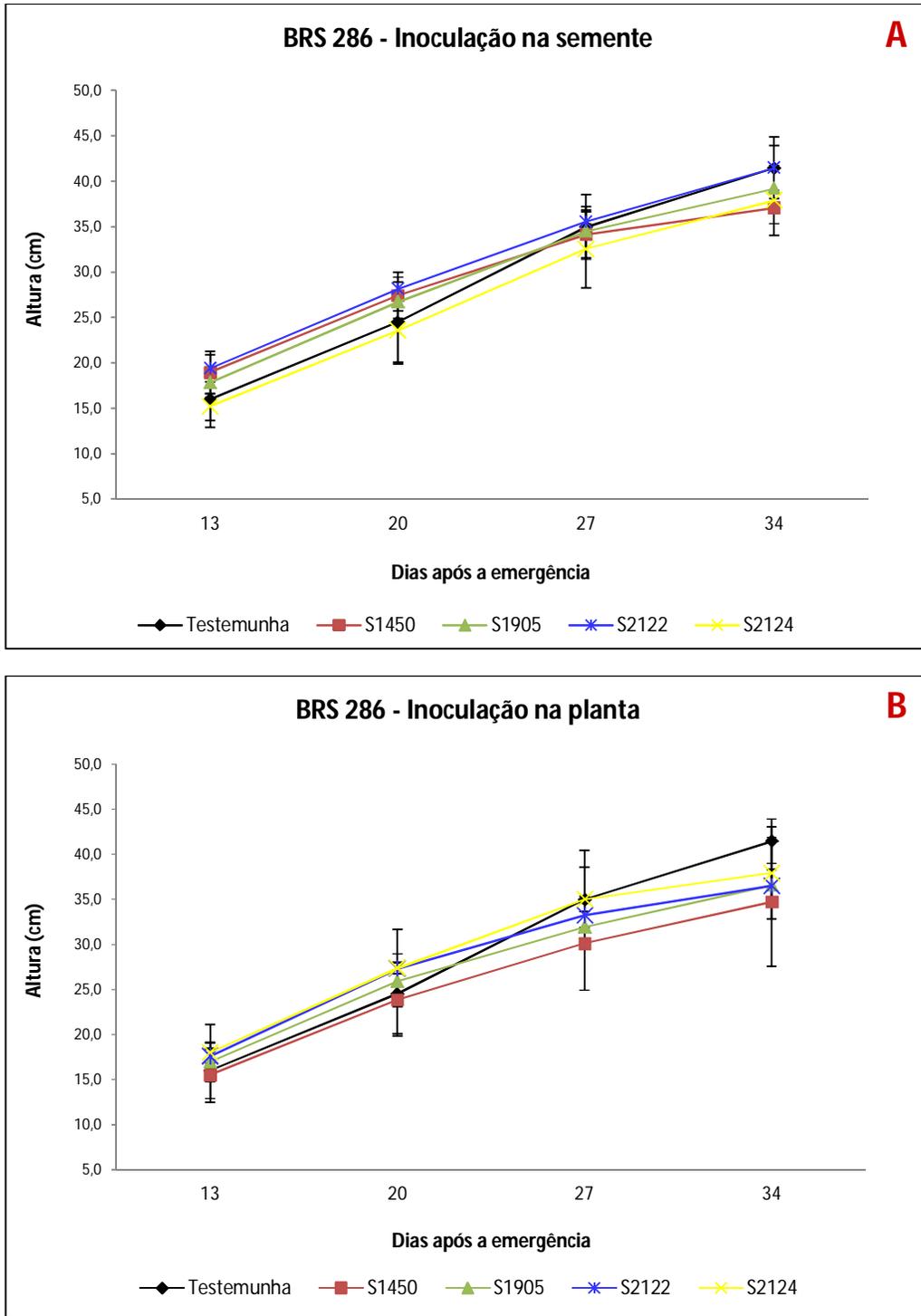


Figura 15 - Altura de plantas do algodoeiro da cultivar BRS 286 inoculadas com *B. thuringiensis* na semente e na planta ao longo de quatro semanas.

3.1.1.3 Número de folhas

O número de folhas para a cultivar BRS 8H, com inoculação de *B. thuringiensis* na semente estão representados na Figura 16-A. Foi possível inferir que aos 13 dias após a emergência (DAE), os tratamentos com as estirpes foram estatisticamente superiores à testemunha (ANOVA: $F = 4,154$; $P = 0,013$). Aos 20 DAE, a estirpe S2122 se destacou e promoveu em 23,68% de incremento do número de folhas comparado com a testemunha (ANOVA: $F = 3,125$; $P = 0,038$). Já aos 27 DAE, a estirpe S2122 foi estatisticamente superior a S1450 e S1905 e semelhante à S2124 e à testemunha (ANOVA: $F = 3,760$; $P = 0,019$). Não foi detectada diferença entre os tratamentos aos 34 DAE (Kruskal-Wallis: $H_4 = 15,596$; $P = 0,004$).

Na avaliação da inoculação nas plantas da cultivar BRS 8H, não houve diferenças significativas entre os tratamentos em nenhuma época de avaliação (Figura 16-B).

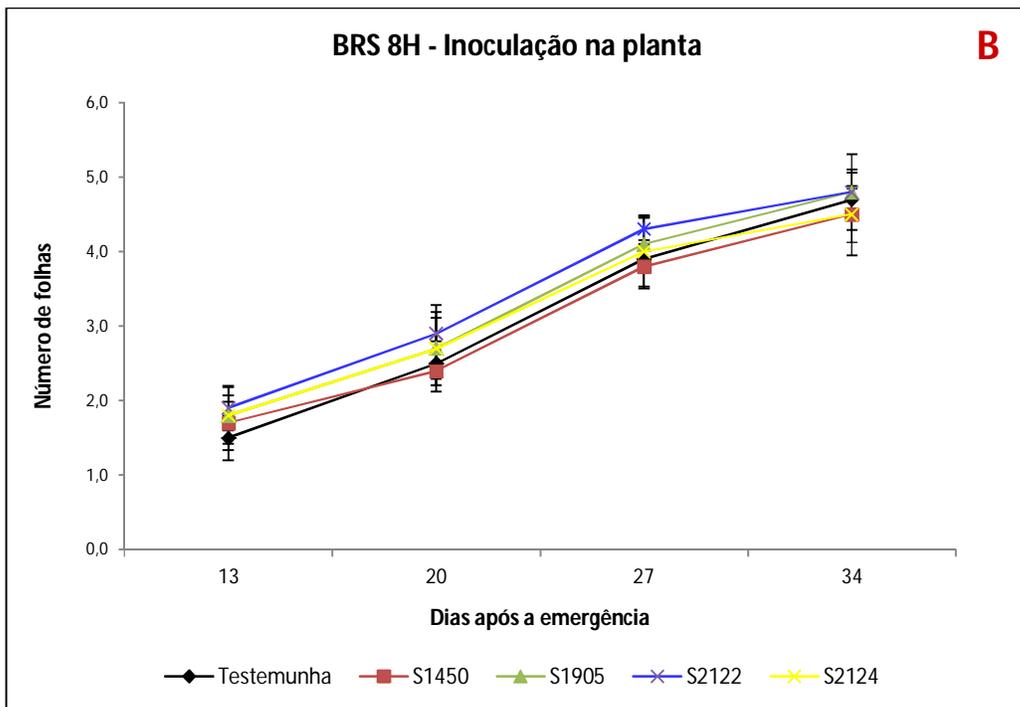
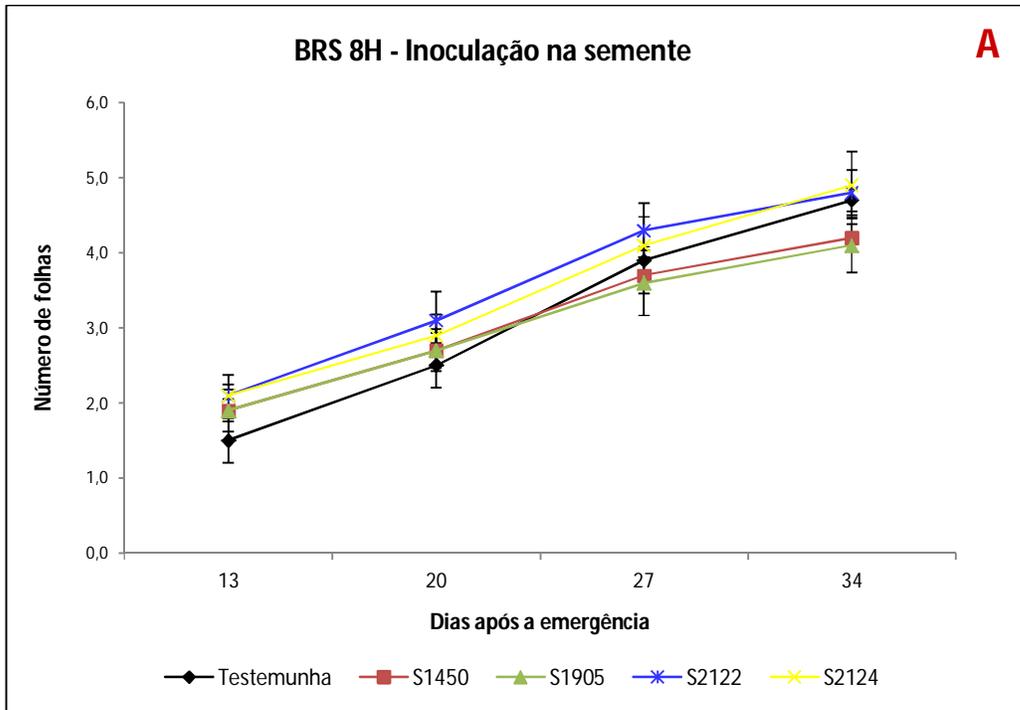


Figura 16 - Avaliação semanal do efeito de inoculação com as estirpes de *B. thuringiensis* (S1450, S1905, S2122, S2124) sobre o número de folhas da cultivar BRS 8H.

Para a cultivar BRS Aroeira inoculada na semente, houve diferença estatística na leitura realizada aos 34 dias após a emergência (DAE) (Figura 17-A). A interação com a estirpe S2122 reduziu em cerca de 55% o número de folhas quando comparado com a testemunha (Kruskal-Wallis: $H_4 = 12,022$; $P = 0,017$).

Para os tratamentos de inoculação das estirpes via planta, não foi possível detectar diferença estatística significativa em nenhuma das datas observadas durante todo o experimento (Figura 17).

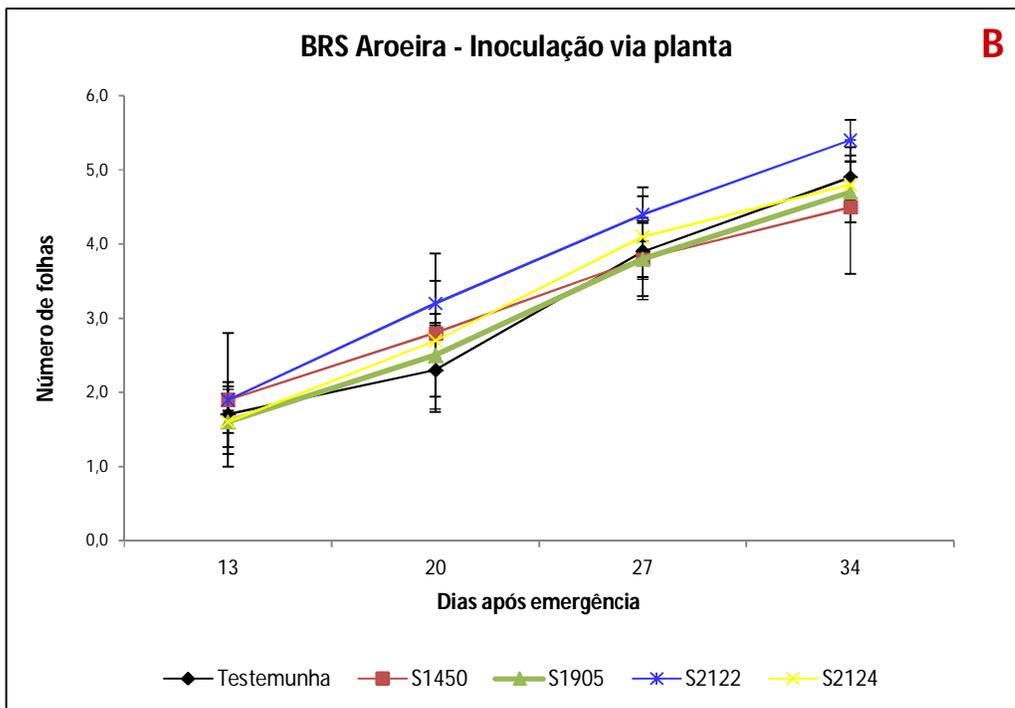
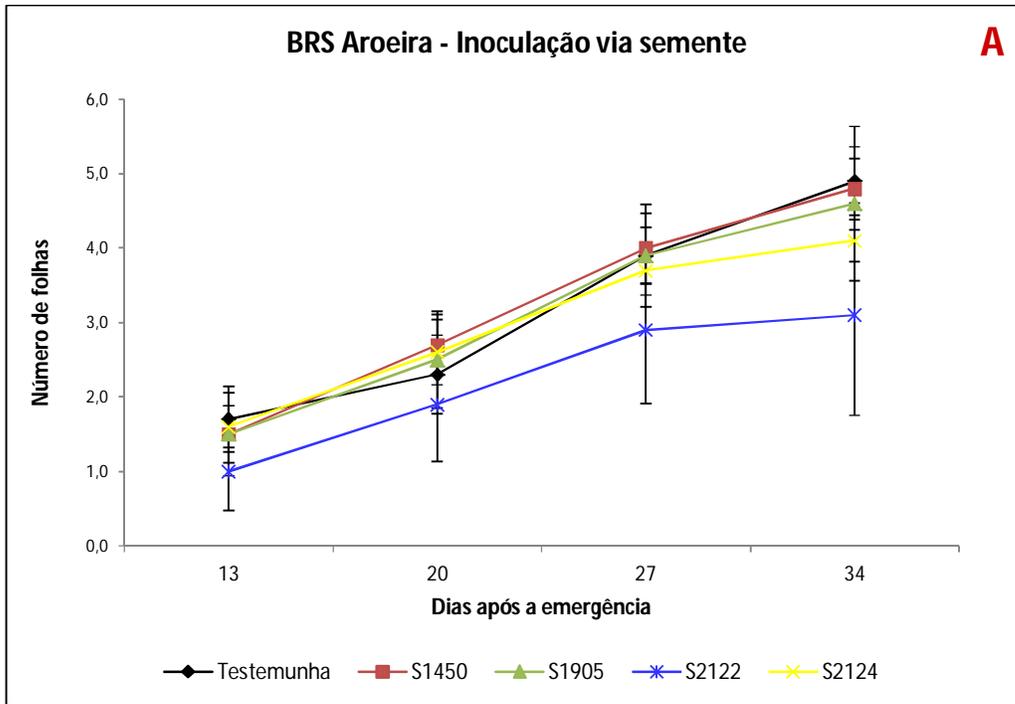


Figura 17 - Avaliação semanal do efeito de inoculação com as estirpes de *B. thuringiensis* (S1450, S1905, S2122, S2124) sobre o número de folhas da cultivar BRS AROEIRA.

O efeito da interação com as estirpes de *B. thuringiensis* e da cultivar BRS 286 foi considerado nulo para o parâmetro de número de folhas. Seja pela utilização do método via semente ou via planta, nenhuma diferença estatística foi evidenciada (Figuras 18).

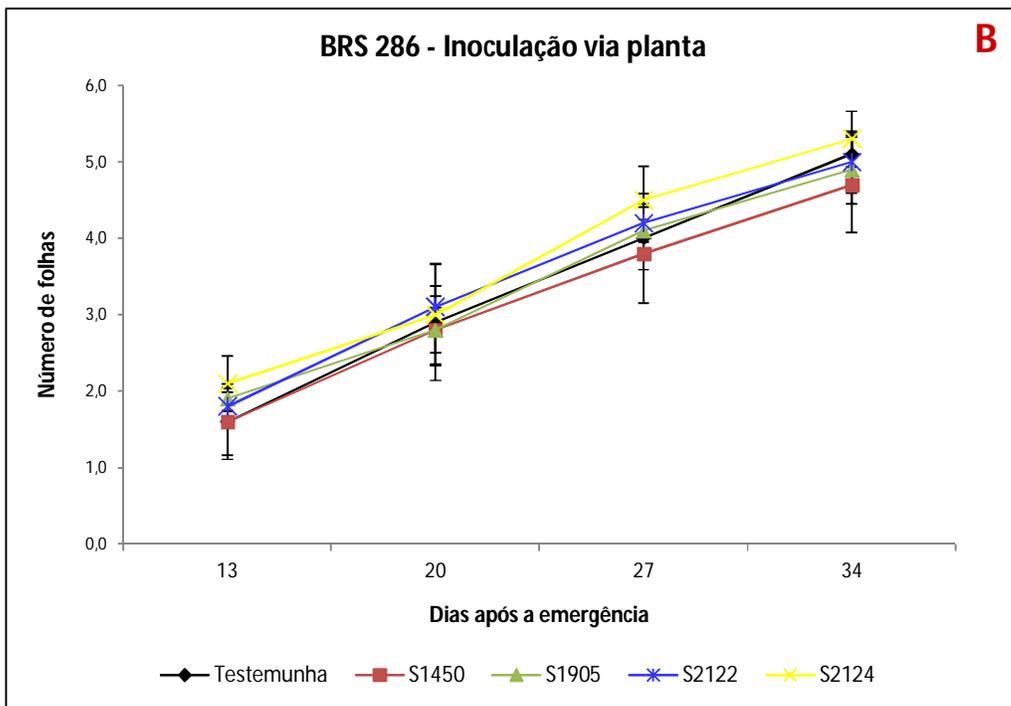
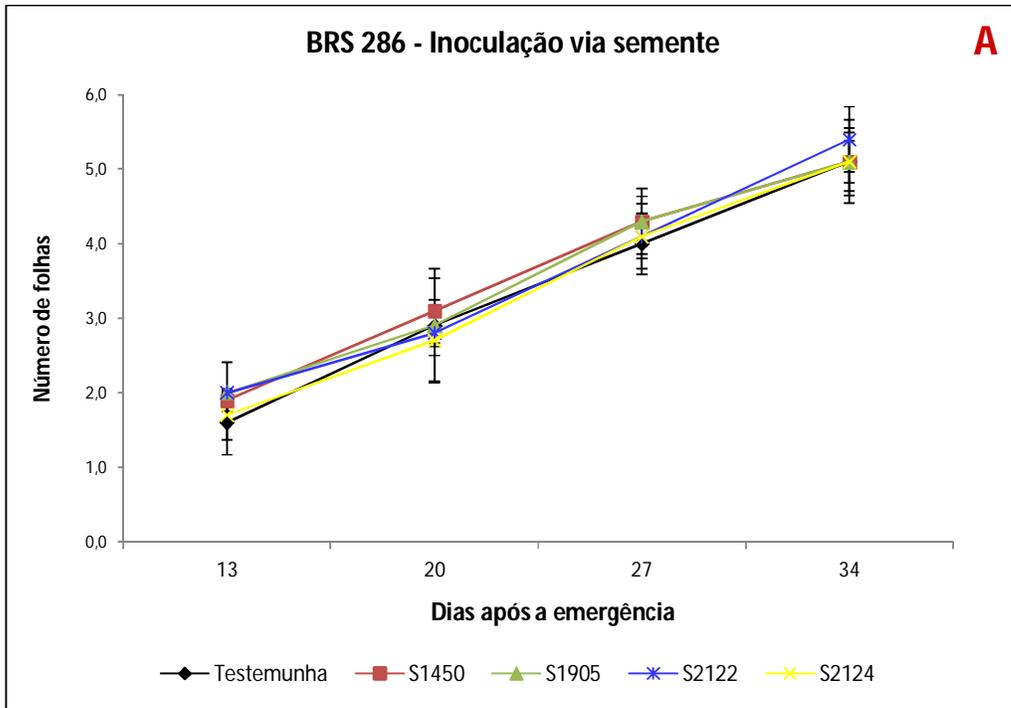


Figura 18 - Avaliação semanal do efeito de inoculação com as estirpes de *B. thuringiensis* (S1450, S1905, S2122, S2124) sobre o número de folhas da cultivar BRS 286.

3.1.1.4 Peso da Matéria Seca e Comprimento de raiz ao final do ensaio

Na Tabela 1 e 2 encontram-se as médias de matéria seca e comprimento da raiz obtidas na BRS 8H inoculadas com quatro estirpes, via semente e via planta.

Observa-se que a estirpe S2122 promoveu mais peso de matéria seca aérea e a parte radicular obteve um percentual 10% maior em comparação com a testemunha (ANOVA: F = 3,854; P = 0,018), embora não tenha diferido das demais para o comprimento da raiz (ANOVA: F = 1,295; P = 0,306) quando inoculada via semente.

HARTHMANN (2009) trabalhando com microbiolização de sementes com rizobactérias na produção de cebola observou alguns benefícios que foram proporcionados com este processo, como aumento do volume de raízes de plantas, havendo maior absorção de água e nutrientes pela planta, além do incremento na produção de bulbos.

Esta observação é importante na seleção da estirpe S2122 pois os tratamentos com as estirpes S1450 e S1905 inibiram a produção de matéria seca e ainda foram semelhantes à S2124.

Tabela 1 - Médias da matéria seca e comprimento da raiz da cultivar BRS 8H inoculadas com diferentes estirpes de *B. thuringiensis* via semente (média \pm desvio padrão).

Tratamento	Matéria seca			Comprimento da raiz (cm)
	parte aérea (g)	radicular (g)	total (g)	
Testemunha	2,194 \pm 0,312ab	1,504 \pm 0,370ab	3,698 \pm 0,655ab	29,140 \pm 8,869a
S1450	1,578 \pm 0,180b	0,998 \pm 0,219b	2,576 \pm 0,302b	28,100 \pm 10,365a
S1905	1,600 \pm 0,473b	0,994 \pm 0,400b	2,594 \pm 0,843b	30,000 \pm 12,357a
S2122	2,390 \pm 0,465a	1,680 \pm 0,430a	4,070 \pm 0,889a	39,747 \pm 6,428a
S2124	1,990 \pm 0,312ab	1,428 \pm 0,307ab	3,418 \pm 0,586ab	26,300 \pm 12,428a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas

No tratamento via planta, nenhuma diferença estatística foi verificada entre as variáveis analisadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias da matéria seca e comprimento da raiz da cultivar BRS 8H inoculadas com diferentes estirpes de *B. thuringiensis* via planta (média ± desvio padrão).

Tratamento	Matéria seca			Comprimento da raiz (cm)
	parte aérea (g)	radicular (g)	total (g)	
Testemunha	2,194 ± 0,312a	1,504 ± 0,370a	3,698 ± 0,655a	29,140 ± 8,869a
S1450	1,704 ± 0,615a	1,120 ± 0,511a	2,824 ± 1,045a	25,680 ± 8,281a
S1905	2,104 ± 0,242a	1,500 ± 0,329a	3,604 ± 0,560a	22,900 ± 7,083a
S2122	2,164 ± 0,396a	1,514 ± 0,330a	3,678 ± 0,666a	32,860 ± 8,384a
S2124	1,778 ± 0,312a	1,304 ± 0,402a	3,082 ± 0,673a	30,340 ± 3,681a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas

A massa seca total da cultivar BRS Aroeira inoculada com S2122 na semente (Tabela 3) foi reduzida em 196% em comparação com a testemunha (ANOVA: F = 4,481; P = 0,010), corroborando com os resultados obtidos no parâmetro de parte aérea para este mesmo tratamento. Resultados semelhantes foram encontrados por ASSUMPCÃO *et al.*, (2009) com plantas de soja inoculadas com os isolados de *Bacillus* spp. e de *Methylobacterium* spp. que apresentaram diminuição da massa da matéria fresca de raiz e massa da matéria seca total.

PEIXOTO NETO *et al.*, (2002) salientam que o estresse causado pela interferência no processo de colonização das sementes pelas bactérias podem afetar a emergência, a formação de fitomassa aérea e radicular. Determinadas condições ambientais podem fazer com que endofíticos se tornem patógenos, causando danos à planta, já que não existe um limite claro entre eles. BRESSAN (2003) relatou *Streptomyces* spp. para o controle de fungos em sementes de milho, porém seu uso diminuiu o desenvolvimento da parte aérea e das raízes.

Tabela 3 - Médias da matéria seca e comprimento da raiz da cultivar BRS Aroeira inoculadas com diferentes estirpes de *B. thuringiensis* via semente (média ± desvio padrão).

Tratamento	Matéria seca			Comprimento da raiz (cm)
	parte aérea (g)	radicular (g)	total (g)	
Testemunha	1,912 ± 0,132a	1,470 ± 0,510a	3,382 ± 0,621a	30,460 ± 6,179a
S1450	1,500 ± 0,250ab	1,092 ± 0,306ab	2,592 ± 0,530ab	25,780 ± 8,247a
S1905	1,296 ± 0,559ab	0,890 ± 0,522ab	2,186 ± 1,068b	27,380 ± 10,543a
S2122	0,924 ± 0,374b	0,496 ± 0,291b	1,420 ± 0,656b	27,600 ± 12,826a
S2124	1,266 ± 0,156ab	0,788 ± 0,153b	2,054 ± 0,287b	25,960 ± 11,254a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas

Em contraponto ao resultado anterior, na Tabela 4, uma sutil diferença foi vista na produção de matéria seca da parte aérea e total da BRS Aroeira quando a inoculação foi feita na planta com a estirpe S2122 (ANOVA: $F = 2,675$; $P = 0,062$). Ainda assim, a média dessas variáveis não diferiram da testemunha.

As estirpes de *B. thuringiensis* mostraram resultados adversos de promoção de crescimento quando utilizados no mesmo material vegetal. ASSUMPCÃO *et al.* (2009) trabalhando com *Pseudomonas* e *Enterobacter* observaram que isolados do mesmo gênero apresentaram resultados divergentes quando associados às plantas de soja. O primeiro apresentou efeito positivo no desenvolvimento da raiz, o segundo, um efeito negativo no mesmo tecido.

Tabela 4 - Médias da matéria seca e comprimento da raiz da cultivar BRS Aroeira inoculadas com diferentes estirpes de *B. thuringiensis* via planta (média ± desvio padrão).

Tratamento	Matéria seca			Comprimento da raiz (cm)
	parte aérea (g)	radicular (g)	total (g)	
Testemunha	1,912 ± 0,132ab	1,470 ± 0,510a	3,382 ± 0,621ab	30,460 ± 6,179a
S1450	1,380 ± 0,330b	0,834 ± 0,181a	2,214 ± 0,383b	25,680 ± 10,190a
S1905	1,526 ± 0,397ab	1,118 ± 0,513a	2,644 ± 0,729ab	27,520 ± 9,292a
S2122	2,198 ± 0,495a	1,818 ± 0,367a	4,016 ± 0,840a	32,020 ± 11,027a
S2124	1,892 ± 0,611ab	1,410 ± 0,778a	3,302 ± 1,371ab	32,760 ± 9,023a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas

Nas Tabelas 5 e 6 nota-se que não houve diferença estatística para matéria seca e comprimento de raízes da cultivar BRS 286 de algodão por nenhum método utilizado, evidenciando resultados neutros para inoculação destas estirpes de *B. thuringiensis* neste material.

Tabela 5 - Médias da matéria seca e comprimento da raiz da cultivar BRS 286 inoculadas com diferentes estirpes de *B. thuringiensis* via semente (média ± desvio padrão).

Tratamento	Matéria seca			Comprimento da raiz (cm)
	parte aérea (g)	radicular (g)	total (g)	
Testemunha	1,830 ± 0,261a	1,258 ± 0,411a	3,088 ± 0,611a	20,060 ± 8,819a
S1450	1,768 ± 0,514a	2,024 ± 0,632a	3,792 ± 0,989a	30,840 ± 10,638a
S1905	1,782 ± 0,250a	1,356 ± 0,187a	3,138 ± 0,374a	33,340 ± 9,624a
S2122	1,966 ± 0,194a	1,628 ± 0,586a	3,594 ± 0,729a	32,500 ± 7,021a
S2124	1,652 ± 0,484a	1,486 ± 0,599a	3,138 ± 1,050a	22,580 ± 8,591a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas

Tabela 6 - Médias da matéria seca e comprimento da raiz da cultivar BRS 286 inoculadas com diferentes estirpes de *B. thuringiensis* via planta (média ± desvio padrão).

Tratamento	Matéria seca			Comprimento da raiz (cm)
	parte aérea (g)	radicular (g)	total (g)	
Testemunha	1,830 ± 0,261a	1,258 ± 0,411a	3,088 ± 0,611a	20,060 ± 8,819a
S1450	1,214 ± 0,502a	1,194 ± 0,839a	2,408 ± 1,171a	23,640 ± 9,301a
S1905	1,516 ± 0,166a	1,108 ± 0,242a	2,624 ± 0,406a	26,040 ± 11,395a
S2122	1,544 ± 0,279a	1,186 ± 0,219a	2,730 ± 0,491a	25,980 ± 7,281a
S2124	1,808 ± 0,267a	1,612 ± 0,374a	3,420 ± 0,595a	26,620 ± 11,363a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas

Na literatura, alguns estudos com fungos endofíticos demonstram efeitos de competitividade no estabelecimento do microrganismo dentro da espécie hospedeira.

OLIVEIRA SILVA *et al.*, (2006) avaliaram o comportamento dos fungos em relação à capacidade de promover o crescimento de mudas de pinha. Alguns isolados promoveram o incremento da biomassa seca da parte aérea, enquanto que outros isolados apresentaram efeito deletério reduzindo a biomassa seca da raiz. KLOEPPER (1996) também verificou efeito deletério de rizobactérias associadas a plantas. As plantas tratadas com os isolados de fungos endofíticos não diferiram significativamente do controle em relação às variáveis de altura da parte aérea e número de folhas. Segundo esse autor, na interação entre os microrganismos endofíticos e a planta hospedeira podem ocorrer reações benéficas, neutras ou prejudiciais.

Neste trabalho, deve-se considerar que as estirpes inoculadas em sementes obtiveram resultados mais expressivos. Isso pode ser justificado devido ao fato que, durante o processo de germinação, há liberação de uma grande quantidade de metabólitos na forma de exsudatos e, desta forma, os organismos inoculados às sementes têm oportunidade de serem os primeiros a utilizar estes substratos aumentando suas chances de estabelecimento (STIRLING, 1991).

3.2 Bioensaio com *Spodoptera frugiperda* em plantas

Para o bioensaio "in vivo" foram usadas plantas com trinta e sete dias, contados a partir da data de semeadura, inoculadas com *B. thuringiensis* via semente e via planta.

Não houve mortalidade das lagartas que se alimentaram das plantas de algodão inoculadas por nenhum método utilizando, tanto via semente ou por planta. Esse resultado pode ser explicado pelo intervalo de tempo transcorrido entre a inoculação e a realização do bioensaio. Isto porque as estirpes de *B. thuringiensis* utilizadas não devem ser naturalmente endofíticas e portanto não estão adaptadas às condições internas das plantas. Ainda assim fazendo-se uma correlação com o substrato utilizado com situações naturais de cultivo em solos que além de representar um ecossistema complexo também apresentam variações nos níveis de pH, compostos inorgânicos e matéria orgânica que podem representar um fator limitante na colonização, estabelecimento e esporulação de microrganismos residentes (MELO & AZEVEDO, 1998).

Outra hipótese que possa explicar este resultado é devido ao uso de uma única dose da bactéria que pode não ter sido eficaz para beneficiar a permanência e a eficiência destes microrganismos na rizosfera e da continuidade de colonização na planta até o final do experimento.

3.3 Teor foliar de nutrientes das plantas inoculadas com *B. thuringiensis* via semente

Os teores dos elementos minerais obtidos nas análises, quando comparados com padrões considerados adequados à cultura, foram tidos como ótimos para condução das plantas (Tabelas 7, 8 e 9).

Foi encontrada diferença estatística significativa somente para os teores do elemento Zn (Tabela 9), folhas de plantas inoculadas apresentaram menores níveis de zinco comparadas às amostras de plantas não inoculadas (ANOVA: $F = 5,296$; $P = 0,047$).

O Zn é elemento essencial à síntese do triptofano, que é precursor do AIA (ácido indol acético) atuando no metabolismo da auxina, além de participar da síntese de carboidratos. É possível que a bactéria tenha se utilizado deste aminoácido disponível para síntese do fitohormônio (CERIGIOLI, 2005) que em concentrações favoráveis promoveu o crescimento das plantas. ARAUJO *et al.* (2005) verificaram que *B. subtilis* produziu AIA (ácido indol acético) e AIB (ácido indolbutírico) em resposta aos exsudatos de raiz de soja.

Por outro lado, em uma revisão realizada por VILAS-BÔAS *et al.* (2012) em que aborda a ação de fatores de virulência de *B. thuringiensis*, descreve a secreção por da metaloprotease zinco, encontrada em abundância na camada mais externa do esporo, capaz de hidrolisar com especificidade peptídeos antibacterianos induzidos durante o processo de infecção na hemolinfa de *Hyalophora cecropia* Linnaeus *in vitro* (EDLUND *et al.*, 1976; DALHAMMAR & STEINER, 1984). Sugerindo que esta metaloprotease zinco esteja primariamente envolvida nas etapas iniciais de infecção, permitindo que bactérias neutralizem o sistema imune do inseto hospedeiro (GUILLEMET *et al.*, 2010).

Tabela 7 - Teores de N, P, K de folhas da cultivar BRS 8H de algodão que receberam inóculo com a estirpe S2122 de *B.thuringiensis*.

Tratamento	Nitrogênio	Fósforo	Potássio
	----- (g Kg ⁻¹) -----		
Testemunha	50,500 ± 2,193a	3,933 ± 0,577a	33,533 ± 2,977a
S2122 planta	47,733 ± 4,443a	3,833 ± 0,379a	33,033 ± 3,355a
S2122 semente	46,600 ± 1,400a	3,467 ± 0,416a	32,200 ± 5,957a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas

Tabela 8 - Teores de Ca, Mg, S e B de folhas da cultivar BRS 8H de algodão que receberam inóculo com a estirpe S2122 de *B.thuringiensis*.

Tratamento	Cálcio	Magnésio	Enxofre	Boro
	----- (g Kg ⁻¹) -----			--- (mg kg ⁻¹) ---
Testemunha	20,467 ± 2,397a	8,067 ± 0,586a	21,100 ± 5,203a	91,600 ± 14,681a
S2122 planta	25,867 ± 2,386a	10,867 ± 0,702a	17,300 ± 1,931a	85,733 ± 9,487a
S2122 semente	24,233 ± 3,355a	9,933 ± 1,845a	16,400 ± 2,75a	76,867 ± 13,214a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas

Tabela 9 - Teores de Zn, Fe, Mn e Cu de folhas da cultivar BRS 8H de algodão que receberam inóculo com a estirpe S2122 de *B.thuringiensis*.

Tratamento	Zinco	Ferro	Manganês	Cobre
	----- (mg Kg ⁻¹) -----			
Testemunha	55,433 ± 3,262a	782,900 ± 157,079a	91,400 ± 59,276a	7,833 ± 0,351a
S2122 planta	44,633 ± 6,229b	643,833 ± 293,901a	206,300 ± 70,058a	7,400 ± 0,557a
S2122 semente	47,000 ± 2,307b	637,633 ± 128,866a	164,967 ± 60,323a	7,167 ± 1,365a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas

3.4 Autoradiografia de plantas de algodão colonizada por estirpes de *B. thuringiensis* marcadas com Metionina ³⁵S

Nos ensaios com radiomarcção, foi observada a colonização das estirpes de *B. thuringiensis* em todos os tecidos das plantas com predominância de colonização nas raízes. Mesmo colonizando sistematicamente a planta, as bactérias endofíticas apresentam preferência de colonização por certos tecidos (ANDREOTE *et al.*, 2004).

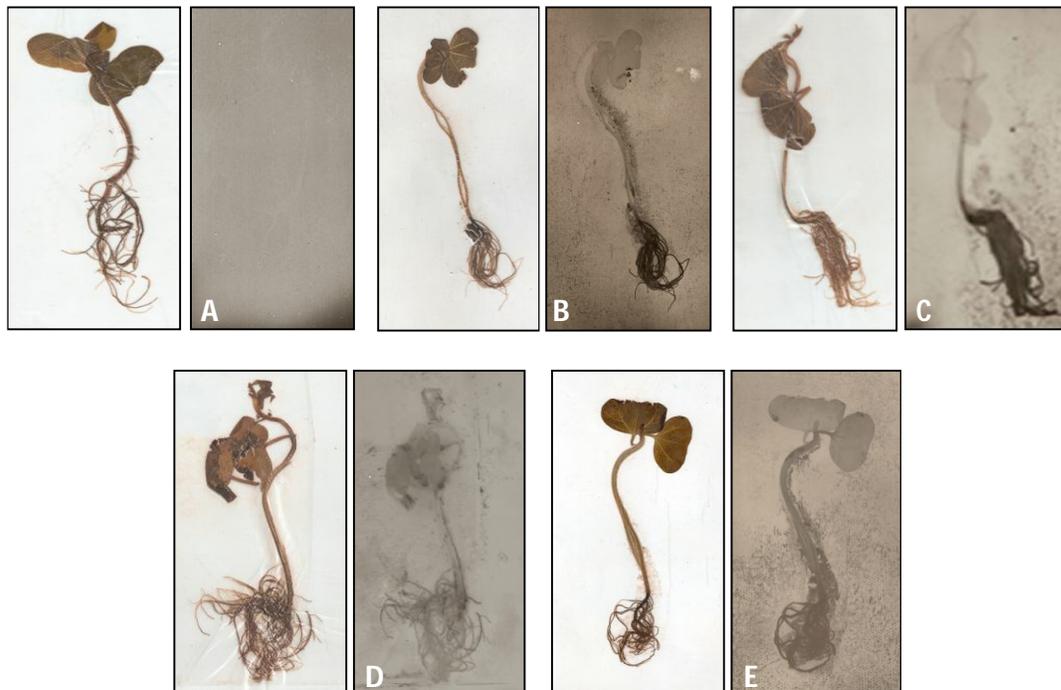


Figura 19 - Autoradiografia de plantas de algodão após 7 dias de exposição às estirpes de *B. thuringiensis* (A - controle negativo, B - S1450, C - S1905, D - 2122, E - S2124) mostrando a colonização de *B. thuringiensis* marcado com metionina ³⁵S nas raízes, hastes, folhas coltiledonares e primórdios foliares de plantas de algodão.

A instalação de um microrganismo endofítico no hospedeiro pode ocorrer de várias formas, algumas delas são por aberturas naturais (DÖBEREINER *et al.*, 1993), via raiz e sementes, chegando a diferentes tecidos e colonizando a planta de maneira sistêmica (HALLMANN *et al.*, 1997).

Nas raízes, a penetração pode ocorrer através de pontos de emergência das raízes primárias e também devido a abrasão com o meio de crescimento que promove a formação de feridas durante o processo de crescimento radicular (REIS & OLIVARES, 2006).

3.5 Observação de *B. thuringiensis* em sementes de algodão inoculadas utilizando microscopia eletrônica de varredura

Através da microscopia foi observada uma maior quantidade de esporos especialmente para as estirpes S2122 e S2124 apresentando, com elevada adesão da biomassa bacteriana em aberturas naturais e depressões formadas pelo tegumento das sementes (Figura 20-C e D). A semente inoculada com a estirpe S1905 apresentou menor presença de esporos (Figura 20-B) o que concorda com os resultados anteriores obtidos para as variáveis onde houve pouca expressividade desta estirpe na interação com o genótipo.

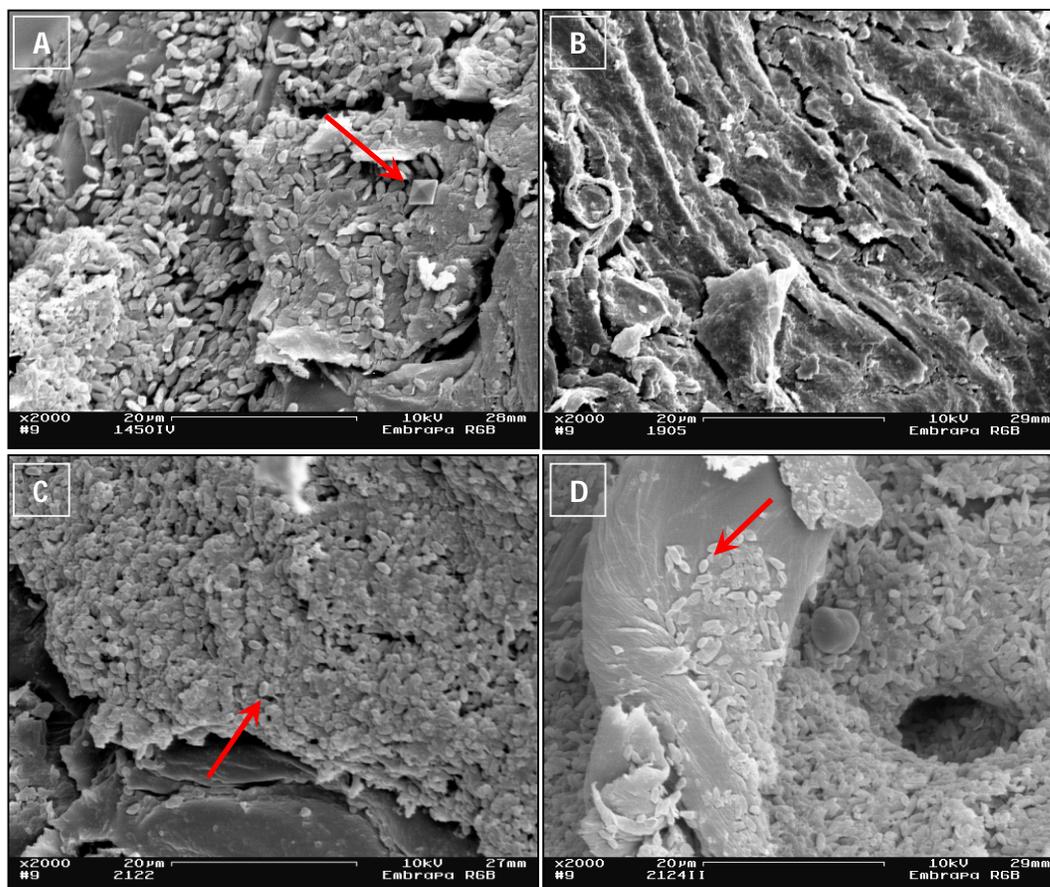


Figura 20 - Micrografia eletrônica de varredura mostrando *B. thuringiensis* (A - S1450; B - S1905; C - S2122; D - S2124) em sementes de algodão após inoculação com a bactéria indicando adesão de esporo e cristal.

Este ensaio corrobora com o de autoradiografia onde se comprova que as plantas de algodão foram colonizadas por Bt e os resultados de crescimento obtidos basearam-se nas condições em que os ensaios foram executados.

Com os ensaios que foram realizados de promoção de crescimento e de colonização é possível concluir que o melhor método para inoculação foi via sementes e que as estirpes de *B. thuringiensis* são capazes de colonizar plantas de algodão respondendo diferencialmente na interação com determinada cultivar.

MACHADO (2000) relata a instabilidade ou a diminuição do potencial de colonização do organismo inoculado à semente. Pois, tratando-se de um produto biológico, deve-se considerar que existem limitações como manutenção das características do agente biológico, instabilidade do antagonista.

Há de se considerar que as condições gerais de ambiente em que os endófitos atuam não estão bem elucidados visto que os estudos envolvendo endófitas, e *Bacillus* em especial, são ainda recentes. Em ensaio de colonização de bactérias em mudas de cafeeiro, SILVA *et al.* (2008) verificaram que a exposição às variações de temperatura e umidade, principalmente, podem ser mais um desafio para as bactérias endófitas colonizarem o filoplano e os tecidos vegetais.

Com o presente trabalho e a partir dos dados de avaliação da parte aérea, da matéria seca e do número de folhas, foi possível selecionar uma estirpe de *B. thuringiensis*, uma cultivar de algodão e um método de inoculação. Portanto, para estudos posteriores serão utilizados a estirpe S2122, a BRS 8H e a inoculação em sementes que em suas interações apresentaram pontos positivos no estabelecimento e no desenvolvimento da planta de algodão. Importante quando se busca conjugar a colonização endofítica à capacidade de provocar toxidez em insetos-praga da ordem Lepidoptera.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREOTE, F. D., GULLO, M. J. M., de SOUZA LIMA, A. O., JUNIOR, W. M., AZEVEDO, J. L., & ARAUJO, W. L. (2004). Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL-**, 42(3), 169-173.

ARAUJO, F. F.; HUNGRIA, M.; HENNING, A. A. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, n.8/9, p.1639-1645, 2005.

ASSUMPCÃO, L. C., LACAVA, P. T., DIAS, A. C. F., DE AZEVEDO, J. L., MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. *Pesq. agropec. bras., Brasília*, 2009, 44(5), 503-510.

BALDOTTO, L. E. B., BALDOTTO, M. A., OLIVARES, F. L., VIANA, A. P., BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 34. 2010.

BECKER, W. D.; HOPPER, N. W.; MCMICHAEL, B. L.; JIVIDEN, G. M. Seed applied plant growth regulators effects on cotton germination, emergence and growth. In: Proceedings of the Beltwide Cotton Conference, v. 1: 625-627. National Cotton Council, Memphis, TN, 1999.

BRESSAN, W. Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. **BioControl**, Amsterdam, v. 48, p. 233-240, 2003.

CERIGIOLI, M. M. Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, 2005.

DAVITT, A. J., CHEN, C.; RUDGERS, J. A. Understanding context-dependency in plant-microbes symbiosis: The influence of abiotic and biotic contexts on host fitness and the rate of symbiont transmission. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 137-145, 2011.

DÖBEREINER, J.; REIS, V. M.; PAULA, M. A.; OLIVARES, F. Endophytic diazotrophic in sugar cane, cereal and tuber plants. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, WF. (Ed) **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 671-676.

DALHAMMAR, G.; STEINER, H., 1984. Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. **European Journal of Biochemistry**, 139: 247–252.

EDLUND, T., SIDEN, I.; Boman, H.G., 1976. Evidence for two immune inhibitors from *Bacillus thuringiensis* interfering with the humoral defense system of saturniid pupae. *Infection and Immunity*, 14: 934–941.

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

GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; MESQUITA, J. C. P. 2003. Isolamento, seleção de bactérias e efeito da utilização de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, 21:699-703.

GUILLEMET, E., CADOT, C., TRAN, S.L., GUINEBRETIERE, M.H., LERECLUS, D.; RAMARAO, N. The InhA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. **Journal of Bacteriology**, 192: 286–294. 2010

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HARDOIN, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends Microbiology**, v. 16, p. 463-471, 2008.

HARTHMANN, O. E. Microbiolização de sementes com rizobactérias na produção de cebola. Curitiba, 2009, 117f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) do setor de ciências Agrárias - Universidade Federal do Paraná.

KLOEPPER, J.W. 1996. Host specificity in microbe-microbe interactions. **BioScience** 46: 406-409.

KUO, J.; FOX, E.; MACDONALD, S. SigmaStat: statistical software form working scientists. Users manual, Jandel ScientiWc, San Francisco, CA, 1992.

MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138p.

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

MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. & BOVI, M. L. (1999). Efeito da posição da semente no substrato e no crescimento inicial das plântulas de palmito-vermelho (*Euterpe espirotosantensis* Fernades – Palmae). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, 21(1):164-173.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. 1998. Ecologia Microbiana. EMBRAPA-CNPMA, Jaguariúna, 488p.

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

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. K. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497, 1962.

OLIVEIRA SILVA, R. L.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; Cavalcante, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta bot. bras**, 20(3), 649-655. 2006.

PEIXOTO NETO, P. A. S; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 62-77, 2002.

PRAÇA, L. B.; Gomes, A. C. M. M.; Cabral, G.; Martins, E.; Sujii, E. H.; Monnerat, R. G. Endophytic Colonization by Brazilian Strains of *Bacillus thuringiensis* on Cabbage Seedlings Grown *in Vitro*. *Bt Research* 2012, Vol.3, No.3, 11-19.

PROBANZA, A. The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 182, p. 59-66, 1

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L. Vias de Penetração e Infecção de Plantas por Bactérias. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 34p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 2006).

SANTOS, W. J. Identificação, biologia, amostragem e controle das pragas do algodoeiro. In: **Algodão: tecnologia e produção**. EMBRAPA-CPAO. Dourados. 296p. 2001.

SANTOS, W. J. Monitoramento e controle de pragas do algodoeiro. In: CIA, E.; FREIRE, E. C.; SANTOS, W. J. (Ed). *Cultura do algodoeiro*. Piracicaba: POTAFOS, 1999. p. 133-179.

SANTOS, M. H. L. C.; MARIANO, R. L. R.; CAMARA, T. R.; ANDRADE, A. G.; WILLADINO, L.; LIMA, G. P. P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, São Paulo, v. 32, p. 1-8, 2005.

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

SILVA, J. R. C. Bactérias endofíticas no controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e da pinta bacterianas do tomateiro. 2004. 160 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

SILVA, H. S. A.; TERRASAN, C. R. F.; TOZZI, J. P. L.; MELO, I. S.; BETTIOL, W. Bactérias endófitas do cafeeiro e a indução de enzimas relacionadas com o controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*). *Tropical Plant Pathology*, vol. 33, 1, 049-054, 2008.

STIRLING, G. R. Mass production and release of biological control agents. In: Stirling, G. R. Biological control of plant parasitic nematodes - Progress, problems and prospects. Red Wood Press. Mekshom. 1991. pp. 125-165.

STURZ, A. V. & NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology* 15: 153-190. 2000.

CAPÍTULO II

INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE ALGODÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE *Bacillus thuringiensis* E AVALIAÇÃO DA AÇÃO E COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E BIOCONTROLE

RESUMO

Bacillus thuringiensis (Bt) é utilizado na cultura do algodoeiro como produto formulado usado no biocontrole de insetos desfolhadores e na doação de genes para transformação de plantas resistentes, porém a literatura dispõe de pouca informação envolvendo estudo da eficiência de Bt com atuação endofítica. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de colonização da estirpe S2122 de Bt, utilizando três diferentes concentrações, inoculadas na semente, na capacidade de promoção de crescimento de plantas de algodão da cultivar BRS 8H e de biocontrole sobre *S. frugiperda*. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado composto por três concentrações de Bt (10^6 , 10^7 , 10^8 UFC/mL) e 16 repetições por tratamento em condições de casa de vegetação por 30 dias. Índice de velocidade de emergência (IVE), identificação do estágio fenológico, características de crescimento e de massa seca aérea e radicular foram os parâmetros avaliados. Em laboratório, amostras de raiz, caule e de folhas plantas de cada um dos tratamentos foram preparadas a cada semana para visualização por microscopia eletrônica de varredura. Foi possível inferir a partir dos resultados, que a concentração 10^8 UFC/mL induziu o desenvolvimento vegetativo das plantas e foi positivo na produção de fitomassa segundo os critérios de identificação do estágio vegetativo, do número de folhas e da matéria seca da parte aérea. As lagartas que se alimentaram de folhas dos tratamentos com Bt ficaram menores que a testemunha e exibiram sintomas de intoxicação.

Palavras-chave: Bt, *Spodoptera frugiperda*, promoção de crescimento, sementes

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (Bt) is used in the cotton crop as a formulated product for the biocontrol of defoliating insects and in the donation of genes to transform resistant plants. However, the literature provides little information on studies of Bt efficiency with endophytic action. The present work aimed to evaluate the colonization of Bt strain S2122, using three different concentrations, inoculated into the seeds, to establish its capacity to promote the growth of cotton plants of cultivar BRS 8H and for biocontrol of *S. frugiperda*. The experimental design used was completely randomized, composed of three concentrations of Bt (10^6 , 10^7 , 10^8 UFC/mL) and 16 repetitions per treatment, in greenhouse conditions for 30 days. The emergence speed index (ESI), identification of phenological stage, characteristics of growth and of aerial and root dry mass were the parameters evaluated. In the laboratory, samples of root, stalk and leaves from each of the treatments were prepared each week for visualization under scanning electron microscope. It could be inferred from the results that a concentration of 10^8 UFC/mL induced the vegetative development of plants and was positive in the production of plant mass, according to the criteria for identification of the vegetative stage, the number of leaves and the dry matter of the aerial part. The larvae that fed on treatments with Bt were smaller than in the control and showed symptoms of intoxication.

Key-words: Bt, *Spodoptera frugiperda*, growth promotion, seeds

1. INTRODUÇÃO

À medida em que há expansão da agricultura, o uso de agroquímicos cresce, causando efeitos negativos como impactos ambientais e a resistência de patógenos (GERHARDSON, 2002). Devido a problemas decorrentes desse uso de agroquímicos, métodos alternativos não poluentes têm ganhado atenção, em especial o controle microbiano de pragas, que apesar de eficiente e seguro, não deve ser utilizado como única forma de controle (ALVES *et al.*, 1998).

A cultura do algodão tem posição de destaque na agricultura brasileira, por sua produção, pela elevada tecnificação e pela qualificação das pessoas envolvidas no processo de produção agrícola. Ultimamente, tem-se intensificado o investimento em pesquisas e em metodologias alternativas com enfoque no uso de microrganismos endofíticos. Esses microrganismos habitam o interior das plantas e são encontrados em folhas, ramos, raízes e sementes, sem causar doenças às plantas e sem produzir estruturas externas visíveis (AZEVEDO *et al.*, 2000). Um crescente interesse nos estudos sobre a ocorrência, o potencial de colonização e a utilização de bactérias endofíticas para promoção de crescimento e controle biológico de doenças de plantas são evidenciados (HALLMANN *et al.*, 1997; SHIOMI *et al.*, 2008).

As pesquisas indicam que, pelo fato de endofíticos ocuparem os espaços internos nas plantas, eles tornam-se menos sujeitos à competição por nutrientes que normalmente ocorre na rizosfera, além de ter maior eficiência do que as bactérias colonizadoras da rizosfera, o estímulo ao crescimento, absorção de água e na supressão de microrganismos deletérios, em razão de se encontrarem no interior do sistema radicular (SANTOS *et al.*, 2005).

Há limitações de informações abordando *B. thuringiensis* como endofítico e o estudo da sua população efetiva no estímulo ao crescimento de plantas e no controle biológico de insetos-praga. Visando atender essa demanda, realizou-se o presente trabalho teve como

objetivo investigar diferentes concentrações de uma estirpe de *B. thuringiensis* na promoção de crescimento e no controle biológico de *S. frugiperda*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Bactérias Entomopatogênicas e de Microscopia Eletrônica e em casa de vegetação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Brasília-DF, utilizando-se a estirpe S2122 de *Bacillus thuringiensis* e a cultivar BRS 8H de algodão.

A estirpe bacteriana foi cultivada em meio Embrapa (MONNERAT *et al.*, 2007) a 28°C, por 48 horas a 400 rpm. Após este período, foi visualizada em microscópio óptico de contraste de fases com aumento de 1000X para observação de esporos e cristais, seguida por centrifugações a 9.500 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e obtido um *pellet* concentrado o qual foi liofilizado e armazenado a -20°C. A quantificação deste material foi feita através da determinação do número de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 4 tratamentos (três concentrações de *B. thuringiensis*: 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC/mL, mais a testemunha), o método de inoculação via semente, a cultivar de algodão BRS 8H e dezesseis repetições por tratamento. O ensaio foi instalado em casa de vegetação onde que foram colocados vasos (com capacidade para 4,5 litros, previamente lavados com hipoclorito de sódio 2,0%) contendo o substrato comercial PlantMax® e a suplementação (40-60-30) de N-P-K. Foram mantidas as regas conforme observação verificada pelo aspecto visual do substrato.

As plantas foram desbastadas no 18º dia após ter sido realizado o semeio, deixando três plantas por vaso onde foram avaliadas por um período de 30 dias após a emergência das plântulas.

As variáveis registradas foram índice de velocidade de emergência (IVE), altura das plantas, número de folhas, produção de matéria seca e comprimento da raiz. Em complemento aos estudos, foram preparadas amostras de plantas para visualização através de microscopia eletrônica de varredura.

2.1 Ensaio de promoção de crescimento após inoculação de *B. thuringiensis* em sementes de algodão

2.1.1 Inoculação de diferentes concentrações da estirpe S2122 de *B. thuringiensis* em sementes da cultivar BRS 8H

As suspensões foram preparadas nas concentrações 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC/mL da estirpe S2122 de *B. thuringiensis* liofilizada e adicionadas em água destilada estéril. As sementes da cultivar BRS 8H foram imersas nestas suspensões e mantidas sob agitação em plataforma agitadora a 130 rpm por 20 minutos. Após este período, as sementes foram retiradas das suspensões e semeadas na quantidade de seis sementes por vaso com profundidade uniforme e mantidos em casa de vegetação.

2.1.2 Avaliação do desempenho e desenvolvimento das plantas

A partir da emergência da primeira plântula, foram realizadas contagens do número de plântulas até o quinto dia para cálculo do índice de velocidade de emergência (IVE). A

emergência das plântulas foi caracterizada pela emissão de seus cotilédones para a superfície do substrato. O cálculo do IVE foi feito segundo a metodologia proposta por MAGUIRE (1962).

Foram realizadas avaliações semanais do comprimento radicular e do estágio vegetativo, iniciadas ao 6º e ao 9º dias após o semeio, respectivamente. A cada semana, também foram feitos levantamentos de dados como altura de planta e número de folhas, iniciados aos 14 dias após a emergência. A altura da parte aérea foi determinada medindo-se, com uma régua graduada em centímetros, a distância entre o coleto e o ápice da planta.

A determinação dos estádios vegetativos do algodão foi feita segundo a escala de MARUR & RUANO (2001). A identificação da fase vegetativa compreende:

V0 - vai da emergência da plântula até o momento em que a nervura principal da primeira folha verdadeira alcança 2,5 cm de comprimento (Figura 21).

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

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

V3-Vn - segue-se o mesmo critério.

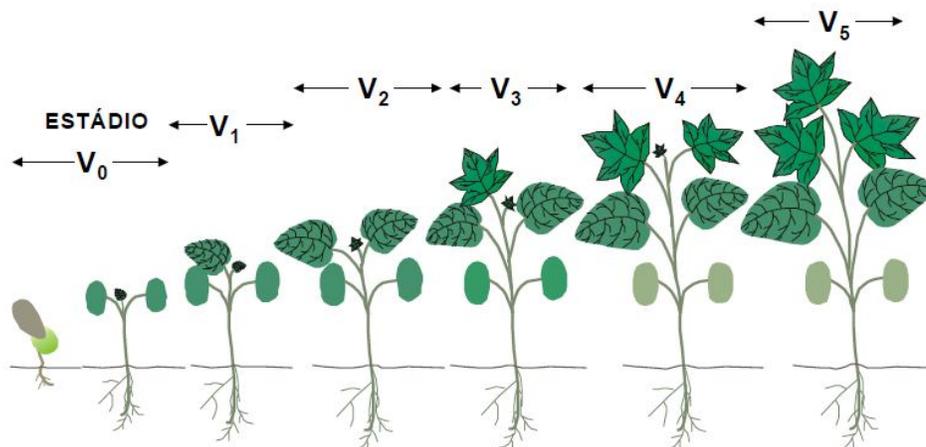


Figura 21 - Estádios vegetativos do algodoeiro, segundo escala de MARUR & RUANO (2001) (Desenho original de Maria G. Y. Sonomura). Na **fase V**, o ponto de mudança é determinado pelo comprimento da folha: 2,5 cm

Ao término do experimento, 30 dias após o início da emergência, as plantas de cada vaso foram devidamente lavadas e secas em papel absorvente para registro do comprimento das raízes, medido com auxílio de régua também graduada em centímetros. Posteriormente, foram mantidas em estufa com circulação de ar a 60°C por aproximadamente 72 horas, até a estabilização da massa, para coleta de dados da matéria seca.

Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparados pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5% de probabilidade, ou quando os dados não cumpriam as premissas necessárias para este teste foi usada análise de variância não-paramétrica (Kruskal-Wallis) e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Dunn empregando-se o programa estatístico SigmaStat (KUO *et al.*, 1992).

2.2 Bioensaio "in vitro" com *S. frugiperda* utilizando folhas de plantas de algodão

Um bioensaio foi realizado a cada semana para verificar a capacidade de biocontrole das plantas que receberam *B. thuringiensis* em suas sementes, com objetivo de conhecer a capacidade inseticida dessas plantas de acordo com a evolução do seu crescimento.

Aos seis dias após o semeio, foi realizado o primeiro bioensaio, folhas jovens foram ofertadas a larvas de *S. frugiperda*. Para cada tratamento foram dispostas placas de Petri, em triplicata, forradas com papel toalha e contendo folhas de algodão. Em capela de fluxo laminar (previamente esterelizada por 20 minutos sob exposição de UV) foram adicionadas, a cada placa, cinco lagartas neonatas de para se alimentarem por um período de 48 a 72 horas em sala climatizada a temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas (Figura 22). Após este período, foi realizada a primeira leitura para verificação de lagartas vivas e mortas. As larvas encontradas vivas foram transferidas para dieta artificial onde permaneceram por sete

dias, contados a partir da data de início do ensaio, em sala de acondicionamento de bioensaios para observar se algum efeito negativo seria verificado no desenvolvimento da *S. frugiperda*.

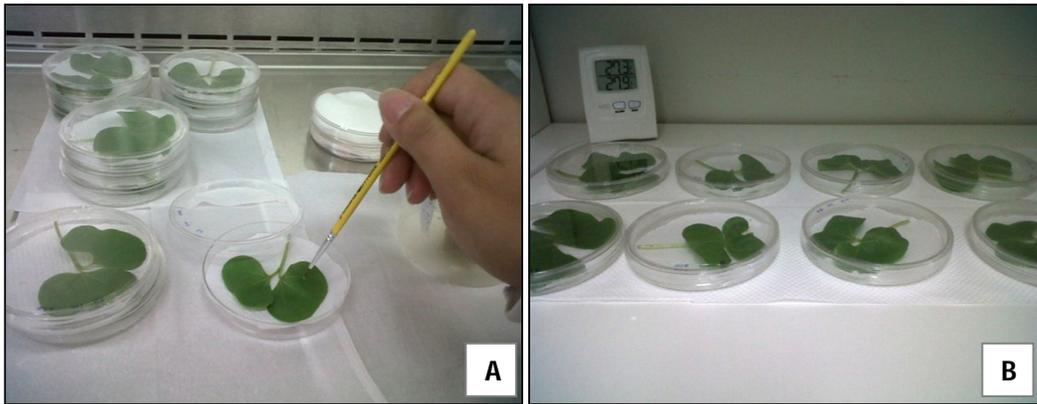


Figura 22 - Bioensaio "in vitro" com larvas de *S. frugiperda* usando folhas de plantas algodão que receberam *B. thuringiensis* na semente. Apresentação das lagartas às folhas cotiledonares (A); acondicionamento das placas em sala climatizada (B).

A partir do segundo bioensaio e por ocasião da aparência de enfraquecimento e sinais de intoxicação, as lagartas vivas ao final dos 7 dias, foram mantidas em dieta artificial para que pudesse ser observado se estes indivíduos chegariam até a fase de pupa.

2.3 Detecção de *B. thuringiensis* nas estruturas das plantas do algodão por microscopia eletrônica de varredura

Foram utilizadas plantas cultivadas em casa de vegetação colonizadas com *B. thuringiensis* via semente. As amostras foram preparadas semanalmente para detecção da colonização da bactéria para os tratamentos.

Aos 9 dias após a data de semeio e a cada 7 dias, foram preparadas amostras contendo cortes de plantas para análise em microscópio eletrônico de varredura. Inicialmente, a capela

de fluxo laminar foi deixada por 20 minutos sob exposição de UV e as plantas foram lavadas em água corrente e secas em papel toalha. Para cada tratamento foram feitas três amostras coletadas de raiz, haste e de folhas, com diferentes cortes e exposição do tecido vegetal. Imediatamente, as amostras foram colocadas em tubos de polipropileno de 2,0 mL e fixadas com glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 por 24 horas sob agitação em rotator orbital a 4 rpm. Após esta etapa, as amostras foram submetidas a três lavagens de 15 minutos em tampão cacodilato 0,1 M e pH 7,0, seguidas de imersão em solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 2% e tampão cacodilato 0,1 M por 1 hora. As amostras pós-fixadas em OsO_4 foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M, por 3 vezes seguidas e por mais 2 vezes com água a cada 10 minutos, logo após, submetidas a desidratação em série etanólica crescente de 10, 30, 50, 70, 90, e 100% permanecendo por 20 minutos em cada uma das concentrações. As amostras foram lavadas duas vezes em etanol 90% e três vezes em etanol 100% com intervalos de 20 minutos de imersão nestas concentrações. Em seguida, as amostras foram secas pelo método do ponto crítico do CO_2 em aparelho Baltec CPD 030, recobertas com 25nm de ouro em aparelho MED 010 da Balzers e observadas ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio de promoção de crescimento após inoculação de *B. thuringiensis* em sementes de algodão

3.1.1 Índice de Velocidade de Emergência (IVE)

A emergência das plântulas teve início aos cinco dias após o plantio. A Figura 23

mostra que os tratamentos utilizados não interferiram no processo germinativo, indicando que a elevada concentração de *B. thuringiensis* não surte efeito deletério na emergência do algodão (ANOVA: F= 1,395; P=0,253).

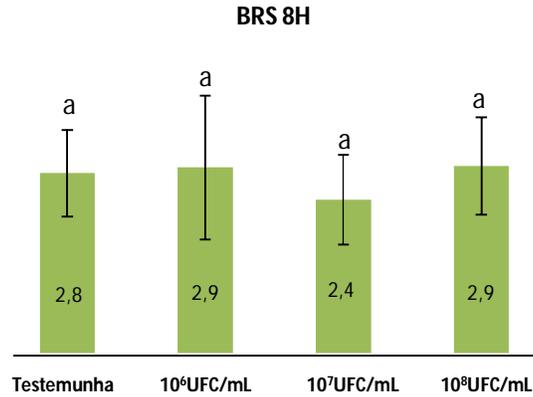


Figura 23 - Índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes da cultivar BRS 8H inoculadas com as concentrações 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC/mL da estirpe S2122 de *B. thuringiensis*.

3.1.2 Avaliação semanal utilizando escala de identificação dos estádios de desenvolvimento do algodoeiro

Iniciou-se ao 14° dia após a emergência e realizados semanalmente. Foi feita a leitura do total de 36 plantas por tratamento.

Na data do levantamento, foi determinado o estágio vegetativo em que se encontrava cada planta obedecendo uma escala de identificação proposta por MARUR & RUANO (2001). Em seguida, foi calculada a porcentagem de plantas no estágio mais avançado para a cultura para cada um dos tratamentos.

Aos 9 dias após emergência (DAE) pode-se observar na Figura 24-A que todos os tratamentos foram iguais à testemunha. Aos 14 DAE, 25% das plantas do tratamento utilizando a concentração 10^8 UCF/mL já atingiam o estágio V2, enquanto os demais

tratamentos apontavam para percentagens menores inclusive a testemunha (Figura 24-B). Este resultado de indução se repetiu para concentração 10^8 UCF/mL em leituras realizadas posteriormente: aos 21 DAE com 28,1% (Figura 24-C) e 27 DAE com 21,9% (Figura 24-D) onde este tratamento já estavam no estágio V5.

O estágio V5 é uma etapa de transição da fase vegetativa para a fase de formação de botões florais, portanto estas plantas alcançariam primeiro a fase reprodutiva da cultura.

Segundo MARUR & RUANO (2001), a Escala do Algodão permite a comparação de trabalhos de pesquisa realizados em diferentes localidades. Além da padronização na identificação de estádios de desenvolvimento de lavouras de algodoeiro facilitando a orientação e a tomada de decisão no manejo.

Neste trabalho, foram comparadas somente plantas de uma mesma cultivar e os tratamentos conduzidos igualmente. O parâmetro por escala de desenvolvimento mostrou-se com bom potencial para ser adicionado a outros critérios de avaliações de promoção de crescimento.

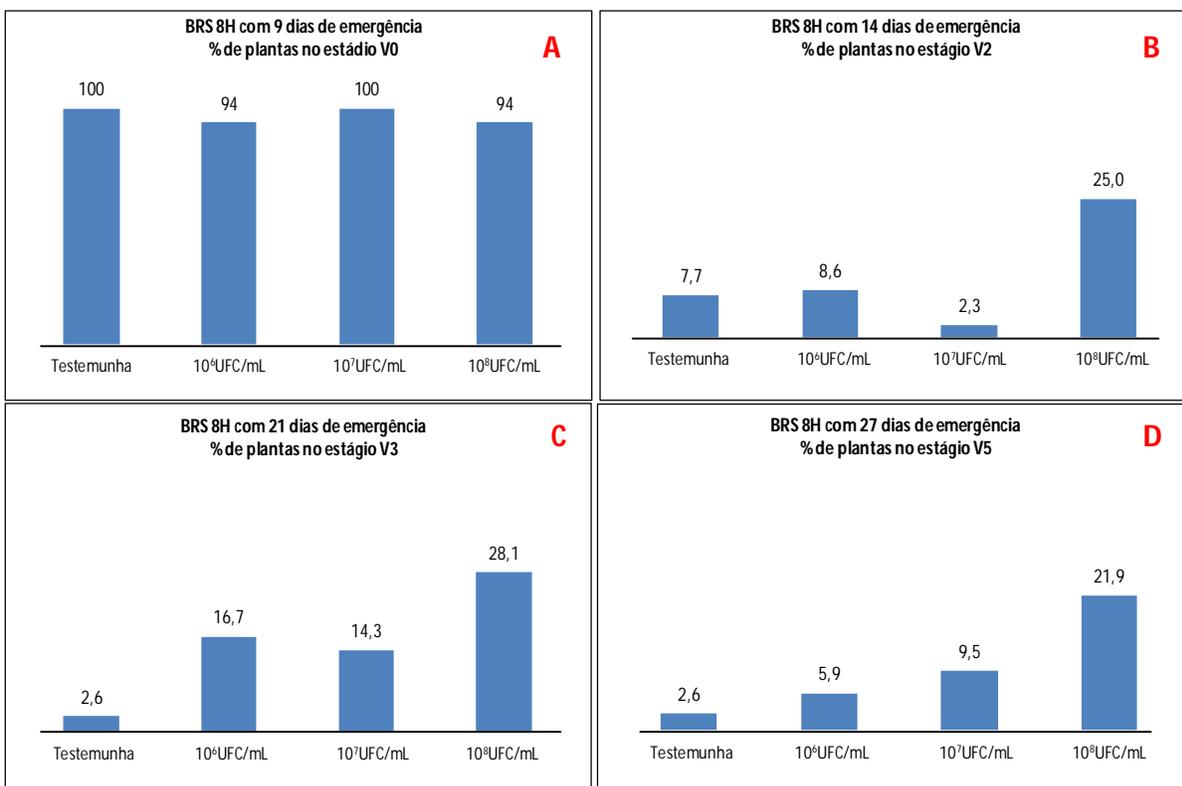


Figura 24 - Leitura semanal da percentagem de plantas em estágio fenológico mais avançado obedecendo a escala de MARUR & RUANO (2001) para os tratamentos (10⁶, 10⁷ e 10⁸ UFC/mL). Avaliações realizadas aos 9, 14, 21 e 27 dias após a emergência de plântulas.

3.1.3 Parte aérea

Com relação ao crescimento, na primeira avaliação aos quatorze dias após a emergência, os tratamentos com 10⁶ e 10⁸ UFC/mL foram superiores em 14,91 e 10,96% respectivamente comparados à testemunha (ANOVA: F = 4,698; P = 0,006). Aos 21 dias, os tratamentos 10⁶ e 10⁸ UFC/mL foram superiores à 10⁷ UFC/mL e semelhantes à testemunha (ANOVA: F = 5,489; P = 0,003).

Aos vinte e sete dias, as diferentes concentrações de *B. thuringiensis* não surtiram efeito na altura das plantas, embora, as concentrações de 10⁶ e 10⁸ UFC/mL permitiram um maior impulso no crescimento inicial das plantas (Figura 25). Um rápido estabelecimento com a

uniformização de plantas é desejável porque que reflete positivamente no manejo durante todo o ciclo da cultura.

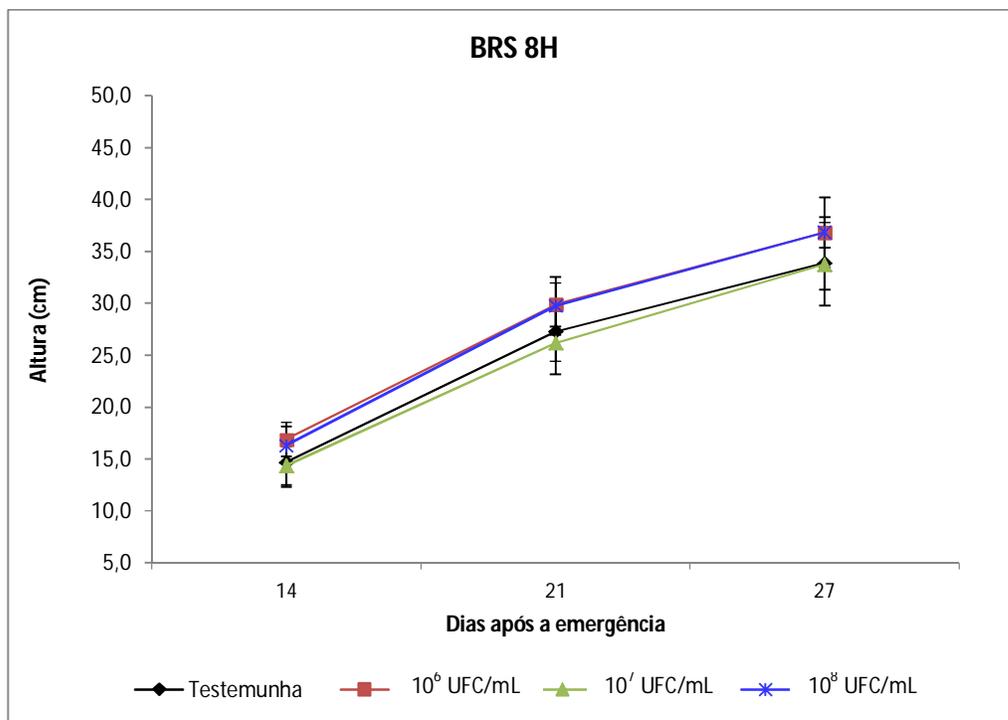


Figura 25 - Altura da parte aérea de plantas do algodoeiro da cultivar BRS 8H inoculadas com *B. thuringiensis* ao longo de três semanas.

3.1.4 Número de folhas

Os resultados de número de folhas avaliados a cada semana colocou o tratamento que utilizou a concentração 10⁸ UFC/mL em evidência durante todo o experimento (Figura 26).

Aos 21 dias o tratamento 10⁸ UFC/mL foi estatisticamente superior à testemunha em 23% (ANOVA: F = 5,334; P = 0,003).

Percebe-se, maior contribuição da estirpe S2122 de maior concentração, que permitiu um aumento médio de 13% sendo superior estatisticamente à testemunha ao final do ensaio (ANOVA: F = 4,499; P = 0,008).

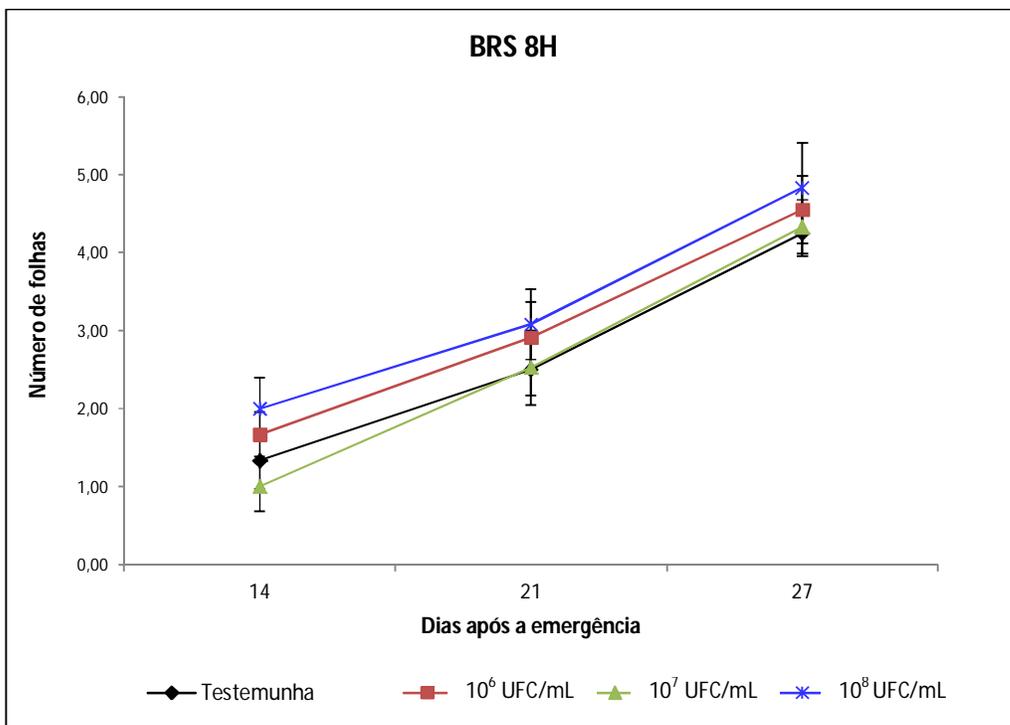


Figura 26 - Efeito de inoculação com as concentrações 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC/mL da estirpe S2122 de *B. thuringiensis* sobre o número de folhas da cultivar BRS 8H de algodão com avaliações semanais.

3.1.5 Avaliações semanais do comprimento de raízes

Com relação ao comprimento de raízes, a Tabela 11 mostra que não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos nos levantamentos semanais, embora nas Figuras 28 e 29 seja evidenciado um maior alongamento das hastes e da estrutura radicular para o tratamento com concentração 10^8 UFC/mL aos 8 e 22 dias após a emergência (DAE). Os resultados sem a evidência estatística para os tratamentos podem ser justificados pelo baixo número de repetições utilizados. Houve dificuldade de serem colocadas um maior número de plantas na casa de vegetação.

Tabela 11 - Efeito da inoculação de diferentes concentrações da estirpe S2122 de *B. thuringiensis* sobre o comprimento de raízes de plantas de algodão com avaliações semanais (média \pm desvio padrão).

Tratamento	Comprimento de raiz (cm)			
	Dias após emergência (DAE)			
	2	8	15	22
Testemunha	5,433 \pm 0,814a	8,267 \pm 2,205a	9,667 \pm 0,764a	13,167 \pm 1,274a
10 ⁶	4,833 \pm 0,764a	5,933 \pm 1,701a	7,967 \pm 1,762a	12,167 \pm 1,041a
10 ⁷	5,033 \pm 0,929a	7,433 \pm 1,677a	8,467 \pm 2,201a	12,267 \pm 1,301a
10 ⁸	5,333 \pm 1,012a	8,600 \pm 1,442a	9,933 \pm 1,102a	11,833 \pm 1,457a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas

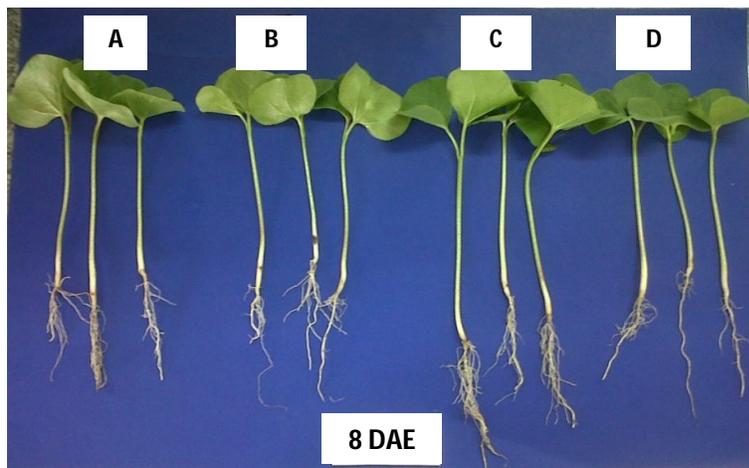


Figura 27 - Comparativo de plântulas de algodão que foram inoculadas com *B. thuringiensis* na semente com oito dias após emergência (DAE). Tratamentos: A- 10⁶, B- 10⁷, C- 10⁸ UFC/mL, D- testemunha. A imagem ilustra maior alongamento do hipocótilo para o tratamento C.



Figura 28 - Comparativo de plantas de algodão que foram inoculadas com *B. thuringiensis* na semente aos vinte e dois dias após emergência (DAE). Tratamentos: A- testemunha, B- 10^8 UFC/mL. Maior alongamento de raízes observado no tratamento B.

3.1.6 Produção de matéria seca e comprimento radicular

As médias obtidas para produção do peso da matéria seca aérea, radicular e total, além do comprimento das raízes são apresentadas na Tabela 12.

Verificou-se que a concentração 10^8 UFC/mL obteve de aumento da matéria seca foliar e total em 14% e 19%, respectivamente (ANOVA: $F = 3,278$; $P = 0,33$) e (ANOVA: $F = 3,786$; $P = 0,020$). Não houve, contudo, diferenças estatísticas entre produção de matéria seca da raiz e comprimento radicular. Esse resultado é importante porque denota ausência de competição da bactéria utilizada como endofítica mesmo em alta concentração do microrganismo e também da promoção de um maior número de folhas que proporciona aumento da capacidade fotossintética da planta.

Tabela 12 - Média de produção de matéria seca e comprimento radicular da cultivar BRS 8H inoculadas com diferentes concentrações da estirpe S2122 de *B. thuringiensis* (média \pm desvio padrão). Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas.

Tratamento	30 dias após a emergência (DAE)				
	Concentração (UFC/mL)	Matéria seca (g)			Comprimento da raiz (cm)
		parte aérea	radicular	total	
Testemunha	3,016 \pm 0,335ab	1,633 \pm 0,393a	4,649 \pm 0,688ab	30,900 \pm 5,701a	
10 ⁶	3,087 \pm 0,517ab	1,680 \pm 0,294a	4,767 \pm 0,701ab	29,433 \pm 10,043a	
10 ⁷	2,630 \pm 0,583b	1,504 \pm 0,463a	4,134 \pm 1,010b	28,800 \pm 5,599a	
10 ⁸	3,437 \pm 0,694a	1,944 \pm 0,391a	5,381 \pm 0,709a	35,433 \pm 5,480a	

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas

3.2 Bioensaio "in vitro" com *S. frugiperda* utilizando folhas de plantas de algodão

Não houve mortalidade para os bioensaios realizados. Aos 8 DAE, a Figura 29, mostra que as larvas de *S. frugiperda* raspam com maior intensidade a área foliar da testemunha, que não recebeu inóculo com *B. thuringiensis*, em comparação à folha oriunda de semente inoculada na qual se observa pouca ou nenhuma raspagem. Possivelmente houve alguma condição de não preferência destas larvas ao material vegetal com da bactéria.

Dos bioensaio realizado do 6° ao 18° DAE, as lagartas expostas à folhas de plantas que receberam Bt apresentaram sintomas indicativos de intoxicação, apresentando baixa mobilidade, uma coloração mais opaca e de consistência mole. Este fator foi importante na indicação que a dose ingerida pôde ser sub-letal à larvas de *S. frugiperda* - não provocando a morte, porém debilitando o inseto. Todavia, as lagartas mantidas para observação em dieta artificial foram capazes de chegar à fase de pupa. Este estudo demanda que novos estudos

sejam realizados a fim de se chegar em formas de aplicação desta bactéria que viabilizem a expressão tóxica da proteína de modo eficaz no controle do inseto-praga.

Os resultados do bioensaio realizado aos 30 DAE não foi verificada mortalidade das lagartas de *S. frugiperda* que se alimentaram das folhas de algodão. Possivelmente pelo fato desta bactéria não ser naturalmente endofítica e necessitar de outros métodos que favoreçam sua permanência e competitividade na rizosfera e consiga permanecer e se multiplicar por um maior período de tempo no interior dos tecidos vegetais do hospedeiro.

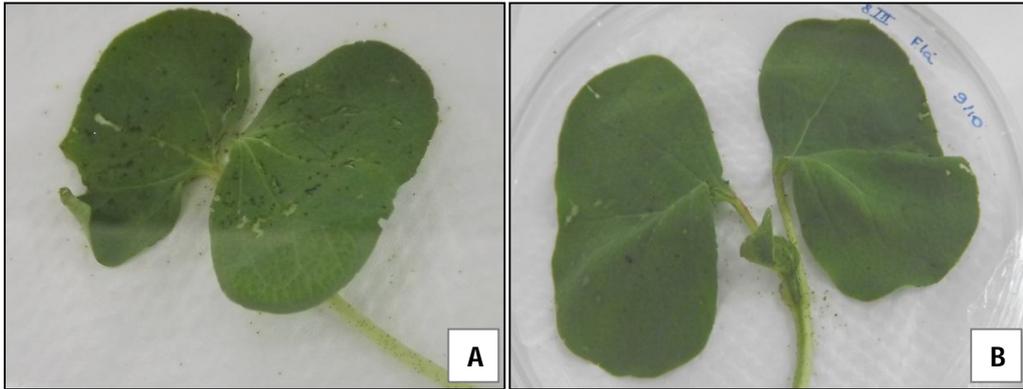


Figura 29 - Folhas cotiledonares de algodoeiro com 8 dias de emergência que foram oferecidas à lagartas neonatas de *S. frugiperda* para alimentação por 48 horas; Testemunha sem inoculação (A); Tratamento com inoculação da estirpe S2122 de *B. thuringiensis* a 10^8 UFC/mL mostrando pouca raspagem de área foliar (B).

3.3 Detecção de *B. thuringiensis* nas estruturas das plantas do algodão por microscopia

Foi possível detectar esporos e características morfológicas típicas da estirpe S2122 de *B. thuringiensis* nas partes da planta de algodão inoculadas. A superfície de folha de planta não inoculada é ilustrada na Figura 30-A. Na Figura 30-B é mostrado o feixe vascular de raiz com a presença de cristais esféricos aos 18 dias após a emergência da planta (DAE). A Figura 30-C mostra um aglomerado contendo cristais com formato bipiramidal, esférico e cubóide no

interior do caule de planta coletada logo após a emergência. Em folha, um cristal bipiramidal foi visualizado no interior do estômato de amostra coletada aos 18 DAE (Figura 30-D).

Foi verificada uma maior população da bactéria no sistema vascular de raízes e densidades menores dentro dos tecidos aéreos. Esse ensaio permitiu comprovar a penetração de *B. thurigiensis* nos diferentes tecidos de plantas de algodão colonizado via semente.

Esta observação também foi reportada por LAMB *et al.* (1996) onde houve colonização do sistema vascular pela bactéria *Pseudomonas aureofaciens* em estudos com milho, trigo e brócolis. Em trabalho de PRAÇA *et al.* (2012) também foi relatada a colonização endofítica de *B. thurigiensis* em diferentes partes de plantas de repolho.

A metodologia utilizada foi apropriada garantindo a preservação celular e gerando amostras de boa qualidade para observação das estruturas da bactéria.

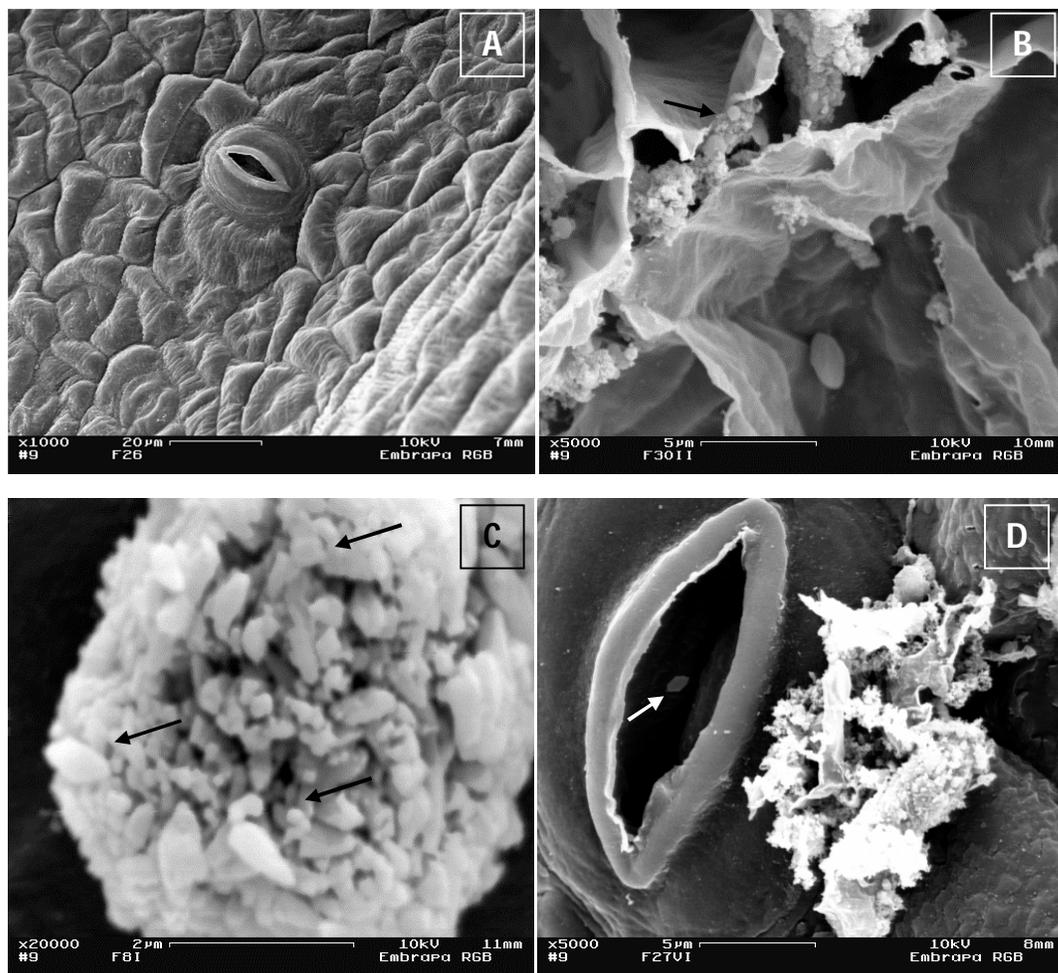


Figura 30 - Micrografia eletrônica de varredura mostrando a colonização da estirpe S2122 de *B. thuringiensis* em diferentes partes da planta de algodoeiro. A - folha de planta que não recebeu o inóculo com a bactéria aos 18 DAE em que não se observa nenhuma massa bacteriana; B - presença de esporos e cristais esféricos no xilema da raiz aos 18 dias após a emergência; C - aglomerado contendo cristais bipiramidais, cristais esféricos e cristais cuboides no interior do caule de plantas logo após a emergência; D - estômato de folha expondo um cristal bipiramidal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. B.; MOINO JR, A.; ALMEIDA, J. E. M. Desenvolvimento, potencial de uso e comercialização de produtos microbianos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 40, p. 1143-1163

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; MACHERONI Jr, W. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA - Meio Ambiente, 2000. cap. 3, p. 57-93.

GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 20, p. 338-343, 2002.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

KUO, J.; FOX, E.; MACDONALD, S. SigmaStat: statistical software form working scientists. Users manual, Jandel ScientiWc, San Francisco, CA, 1992.

LAMB, T. G.; TONKYN, D. W.; KLUEPFEL, D. A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Canadian journal of microbiology**, v. 42, n. 11, p. 1112-1120, 1996.

MARUR, C. J.; RUANO, O. A reference system for determination of developmental stages of upland cotton. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.5, n. 2, p.313-317, 2001.

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

PRAÇA, L. B.; Gomes, A. C. M. M.; Cabral, G.; Martins, E.; Sujii, E. H.; Monnerat, R. G. Endophytic Colonization by Brazilian Strains of *Bacillus thuringiensis* on Cabbage Seedlings Grown *in Vitro*. *Bt Research* 2012, Vol.3, No.3, 11-19.

SANTOS, M. H. L. C.; MARIANO, R. L. R.; CAMARA, T. R.; ANDRADE, A. G.;

WILLADINO, L.; LIMA, G. P. P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, São Paulo, v. 32, p. 1-8, 2005.

SHIOMI, H. F.; MELO, I. S.; MINHONI, M. T. A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagônica a fitopatógenos. *Scientia Agraria*, Curitiba, v. 9, n. 4, p. 535-538, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados gerados pelo presente trabalho possibilitaram a seleção de um método de inoculação, de uma estirpe de *B. thuringiensis* mais apta na promoção de crescimento e de uma cultivar de algodão mais passível a ser colonizada em estágio vegetativo.

A estirpe S2122 inoculada na semente da cultivar BRS 8H mostrou-se promissora, visto que se destacou sobre as demais estirpes, com diferenças de interação positivas na parte aérea, no número de folhas e da matéria seca em comparação com a testemunha. Ao final do ensaio, com 40 dias, este tratamento foi semelhante à testemunha e o efeito promotor de crescimento não foi mais observado.

Em concordância com este resultado, no bioensaio realizado ao final deste mesmo período, não foi verificada mortalidade das larvas de *S. frugiperda* que se alimentaram destas plantas. Provavelmente explicado pela baixa população do *B. thuringiensis* na planta que pode ter sido influenciada por uma única inoculação utilizada neste ensaio que não beneficiou a multiplicação e a permanência deste microrganismo durante todo o ensaio.

Quando ao ensaio de radiomarcagem, ficou evidente que as estirpes de *B. thuringiensis* colonizam efetivamente as plantas de algodão.

Em outro experimento com concentrações da estirpe S2122, os resultados apontaram para a concentração 10^8 UFC/mL como indutora do desenvolvimento vegetativo de plantas com efeitos positivos na produção de fitomassa. Plantas mais robustas e vigorosas implicam em um rápido estabelecimento da lavoura e podem vir a impactar diretamente na produtividade. Uma maior produção de fitomassa também é fator interessante no que concerne ao controle de plantas daninhas, uma vez que promove um rápido fechamento das ruas de plantio. As lagartas que se alimentaram de folhas dos tratamentos com *B. thuringiensis* exibiram sintomas de intoxicação até o 18º dia após a germinação das plantas.

Um fator importante no uso do *B. thuringiensis* de forma endofítica é a capacidade de reduzir algumas desvantagens como a sensibilidade aos raios ultravioletas e a perda por lavagem de chuvas. Podem proporcionar benefícios como um estabelecimento mais rápido da cultura, a capacidade de induzir o crescimento de plantas, além de poder vir a ser eficiente no controle de insetos-praga e ser utilizado como ferramenta no manejo integrado de pragas.

Um ponto que possa otimizar o emprego do endófito na agricultura, pode estar na forma de como dispensá-lo para a planta, sem dispensar a necessidade de aprofundar o conhecimento de processos interativos entre os microrganismos endofíticos e a planta hospedeira no sentido de elucidar o ambiente geral que o endófito encontra para se movimentar nos tecidos vegetais.

Portanto, estudos futuros devem ser realizados no sentido de se implementar o uso do *B. thuringiensis* lançando mão de abordagens tecnológicas como formulações de liberação lenta ou aplicações subsequentes que possam impactar positivamente na colonização e multiplicação da bactéria e conseqüentemente em uma maior permanência na planta de algodão possibilitando a expressão da proteína tóxica nas folhas em quantidades tóxicas ao inseto que provoque biocontrole de lepidópteros-praga.

ANEXOS

Capítulo I

Anexo A. Avaliação semanal do efeito da inoculação via semente na cultivar BRS 8H com as estirpes de *B. thuringiensis* sobre os parâmetros altura e números de folhas das plantas de algodão (média \pm desvio padrão).

Tratamento	Parte aérea (cm)	Número de folhas
1ª leitura - 13 DAE		
Testemunha	18,033 \pm 1,099b	1,533 \pm 0,298b
S1450	21,600 \pm 1,641a	1,933 \pm 0,149a
S1905	21,447 \pm 1,867a	1,933 \pm 0,279a
S2122	22,420 \pm 3,480a	2,067 \pm 0,279a
S2124	21,953 \pm 1,046a	2,067 \pm 0,149a
2ª leitura - 20 DAE		
Testemunha	29,687 \pm 1,032ab	2,533 \pm 0,298b
S1450	27,867 \pm 1,361b	2,667 \pm 0,236ab
S1905	28,613 \pm 3,244b	2,733 \pm 0,279ab
S2122	33,173 \pm 3,173a	3,133 \pm 0,380a
S2124	31,860 \pm 1,509ab	2,933 \pm 0,279ab
3ª leitura - 27 DAE		
Testemunha	38,627 \pm 1,793a	3,867 \pm 0,183ab
S1450	33,027 \pm 1,227b	3,667 \pm 0,236b
S1905	32,753 \pm 3,865b	3,600 \pm 0,435b
S2122	40,140 \pm 4,068a	4,267 \pm 0,365a
S2124	37,560 \pm 1,226a	4,133 \pm 0,380ab
4ª leitura - 34 DAE		
Testemunha	44,787 \pm 3,375a	4,733 \pm 0,149a
S1450	37,300 \pm 2,683b	4,200 \pm 0,183a
S1905	35,400 \pm 4,393b	4,067 \pm 0,365a
S2122	43,733 \pm 4,016a	4,800 \pm 0,298a
S2124	41,160 \pm 1,088ab	4,867 \pm 0,447a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas.

Anexo B. Avaliação semanal do efeito da inoculação via planta da cultivar BRS 8H com as estirpes de *B. thuringiensis* sobre os parâmetros altura e números de folhas das plantas de algodão (média \pm desvio padrão).

Tratamento	Parte aérea	Número de folhas
	(cm)	
1ª leitura - 13 DAE		
Testemunha	18,033 \pm 1,099a	1,533 \pm 0,298a
S1450	17,593 \pm 2,876a	1,733 \pm 0,365a
S1905	20,993 \pm 2,878a	1,800 \pm 0,183a
S2122	20,333 \pm 2,883a	1,867 \pm 0,298a
S2124	18,933 \pm 2,094a	1,800 \pm 0,380a
2ª leitura - 20 DAE		
Testemunha	29,687 \pm 1,032a	2,533 \pm 0,298a
S1450	28,200 \pm 4,232a	2,400 \pm 0,279a
S1905	30,720 \pm 2,994a	2,667 \pm 0,408a
S2122	31,447 \pm 3,117a	2,867 \pm 0,380a
S2124	28,427 \pm 2,041a	2,733 \pm 0,494a
3ª leitura - 27 DAE		
Testemunha	38,627 \pm 1,793a	3,867 \pm 0,183a
S1450	36,200 \pm 5,776a	3,800 \pm 0,298a
S1905	37,533 \pm 3,561a	4,133 \pm 0,380a
S2122	38,560 \pm 3,205a	4,267 \pm 0,149a
S2124	35,120 \pm 2,422a	4,000 \pm 0,471a
4ª leitura - 34 DAE		
Testemunha	44,787 \pm 3,375a	4,733 \pm 0,149a
S1450	40,540 \pm 5,113a	4,467 \pm 0,380a
S1905	41,373 \pm 3,395a	4,800 \pm 0,506a
S2122	43,307 \pm 2,811a	4,800 \pm 0,298a
S2124	38,420 \pm 2,222a	4,467 \pm 0,558a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas

Anexo C. Avaliação semanal do efeito da inoculação via semente da cultivar BRS AROEIRA com as estirpes de *B. thuringiensis* sobre os parâmetros altura e números de folhas das plantas de algodão (média \pm desvio padrão).

Tratamento	Parte aérea	Número de folhas
	(cm)	
1ª leitura - 13 DAE		
Testemunha	17,420 \pm 2,091a	1,733 \pm 0,435a
S1450	16,187 \pm 2,500a	1,467 \pm 0,380a
S1905	15,200 \pm 3,325a	1,467 \pm 0,558a
S2122	11,760 \pm 4,848a	1,000 \pm 0,527a
S2124	16,033 \pm 2,222a	1,600 \pm 0,279a
2ª leitura - 20 DAE		
Testemunha	27,353 \pm 2,657a	2,333 \pm 0,527a
S1450	25,487 \pm 3,457ab	2,667 \pm 0,408a
S1905	24,167 \pm 4,783ab	2,533 \pm 0,650a
S2122	17,927 \pm 7,379b	1,867 \pm 0,767a
S2124	24,473 \pm 2,730ab	2,600 \pm 0,435a
3ª leitura - 27 DAE		
Testemunha	35,867 \pm 2,919a	3,867 \pm 0,380a
S1450	33,347 \pm 2,968a	4,000 \pm 0,471a
S1905	30,607 \pm 5,367ab	3,867 \pm 0,691a
S2122	22,973 \pm 9,533b	2,867 \pm 0,989a
S2124	30,833 \pm 2,462ab	3,667 \pm 0,333a
4ª leitura - 34 DAE		
Testemunha	40,040 \pm 4,340a	4,867 \pm 0,298a
S1450	38,140 \pm 3,164a	4,800 \pm 0,558ab
S1905	34,520 \pm 6,725a	4,600 \pm 1,038ab
S2122	25,680 \pm 11,014a	3,133 \pm 1,346b
S2124	34,120 \pm 2,800a	4,067 \pm 0,279ab

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas

Anexo D. Avaliação semanal do efeito da inoculação via planta da cultivar BRS AROEIRA com as estirpes de *B. thuringiensis* sobre os parâmetros altura e números de folhas das plantas de algodão (média \pm desvio padrão).

Tratamento	Parte aérea	Número de folhas
	(cm)	
1ª leitura - 13 DAE		
Testemunha	17,420 \pm 2,091a	1,733 \pm 0,435a
S1450	17,413 \pm 7,669a	1,867 \pm 0,901a
S1905	16,321 \pm 3,148a	1,600 \pm 0,149a
S2122	19,400 \pm 2,142a	1,867 \pm 0,183a
S2124	17,547 \pm 2,312a	1,600 \pm 0,435a
2ª leitura - 20 DAE		
Testemunha	27,353 \pm 2,657a	2,333 \pm 0,527a
S1450	24,360 \pm 7,875a	2,800 \pm 1,070a
S1905	25,527 \pm 4,273a	2,533 \pm 0,558a
S2122	31,107 \pm 1,919a	3,200 \pm 0,298a
S2124	27,053 \pm 3,274a	2,667 \pm 0,236a
3ª leitura - 27 DAE		
Testemunha	35,867 \pm 2,919ab	3,867 \pm 0,380a
S1450	29,827 \pm 6,873b	3,800 \pm 0,506a
S1905	32,140 \pm 4,245ab	3,800 \pm 0,552a
S2122	38,853 \pm 2,373a	4,400 \pm 0,365a
S2124	34,873 \pm 3,445ab	4,067 \pm 0,548a
4ª leitura - 34 DAE		
Testemunha	40,040 \pm 4,340a	4,867 \pm 0,298a
S1450	33,887 \pm 6,750a	4,467 \pm 0,901a
S1905	35,707 \pm 4,152a	4,667 \pm 0,408a
S2122	43,580 \pm 2,974a	5,400 \pm 0,279a
S2124	38,873 \pm 3,519a	4,800 \pm 0,506a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas

Anexo E. Avaliação semanal do efeito da inoculação via da cultivar BRS 286 com as estirpes de *B. thuringiensis* sobre os parâmetros altura e números de folhas das plantas de algodão (média \pm desvio padrão).

Tratamento	Parte aérea	Número de folhas
	(cm)	
1ª leitura - 13 DAE		
Testemunha	15,973 \pm 3,078a	1,600 \pm 0,435a
S1450	18,940 \pm 2,318a	1,933 \pm 0,149a
S1905	17,833 \pm 1,656a	2,000 \pm 0,408a
S2122	19,387 \pm 1,494a	2,000 \pm 0,000a
S2124	15,387 \pm 1,494a	1,667 \pm 0,333a
2ª leitura - 21 DAE		
Testemunha	24,507 \pm 4,420a	2,933 \pm 0,760a
S1450	27,433 \pm 2,545a	3,067 \pm 0,435a
S1905	26,740 \pm 1,008a	2,933 \pm 0,279a
S2122	28,167 \pm 1,295a	2,800 \pm 0,298a
S2124	23,587 \pm 3,682a	2,733 \pm 0,548a
3ª leitura - 27 DAE		
Testemunha	34,987 \pm 3,596a	4,000 \pm 0,408a
S1450	34,140 \pm 2,525a	4,267 \pm 0,435a
S1905	34,500 \pm 0,831a	4,333 \pm 0,333a
S2122	35,540 \pm 1,669a	4,133 \pm 0,298a
S2124	32,560 \pm 4,305a	4,067 \pm 0,435a
4ª leitura - 34 DAE		
Testemunha	41,460 \pm 2,472a	5,067 \pm 0,279a
S1450	37,053 \pm 1,721a	5,133 \pm 0,558a
S1905	39,200 \pm 2,443a	5,140 \pm 0,392a
S2122	41,493 \pm 3,405a	5,400 \pm 0,435a
S2124	37,900 \pm 3,853a	5,133 \pm 0,447a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas

Anexo F. Avaliação semanal do efeito da inoculação via planta da cultivar BRS 286 com as estirpes de *B. thuringiensis* sobre os parâmetros altura e números de folhas das plantas de algodão (média \pm desvio padrão).

Tratamento	Parte aérea	Número de folhas
	(cm)	
1ª leitura - 13 DAE		
Testemunha	15,973 \pm 3,078a	1,600 \pm 0,435a
S1450	15,480 \pm 3,007a	1,600 \pm 0,494a
S1905	16,953 \pm 2,200a	1,933 \pm 0,149a
S2122	17,567 \pm 0,763a	1,800 \pm 0,183a
S2124	17,993 \pm 3,132a	2,067 \pm 0,365a
2ª leitura - 20 DAE		
Testemunha	24,507 \pm 4,420a	2,933 \pm 0,760a
S1450	23,840 \pm 4,066a	2,800 \pm 0,447a
S1905	25,880 \pm 2,156a	2,800 \pm 0,298a
S2122	27,307 \pm 0,604a	3,067 \pm 0,279a
S2124	27,360 \pm 4,275a	3,000 \pm 0,667a
3ª leitura - 27 DAE		
Testemunha	34,987 \pm 3,596a	4,000 \pm 0,408a
S1450	30,100 \pm 5,202a	3,800 \pm 0,650a
S1905	31,933 \pm 1,700a	4,067 \pm 0,149a
S2122	33,247 \pm 1,385a	4,200 \pm 0,380a
S2124	35,013 \pm 5,416a	4,467 \pm 0,447a
4ª leitura - 34 DAE		
Testemunha	41,460 \pm 2,472a	5,067 \pm 0,279a
S1450	34,707 \pm 7,153a	4,667 \pm 0,624a
S1905	36,567 \pm 1,758a	4,867 \pm 0,447a
S2122	36,473 \pm 1,866a	5,000 \pm 0,408a
S2124	37,933 \pm 5,137a	5,267 \pm 0,365a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas

Capítulo II

Anexo G. Avaliação semanal do efeito da inoculação via semente na cultivar BRS 8H com diferentes concentrações da estirpe S2122 de *B. thuringiensis* sobre os parâmetros altura e números de folhas das plantas de algodão (média \pm desvio padrão).

Tratamento	Parte aérea	Número de folhas
UFC/mL	(cm)	
1ª leitura - 14 DAE		
Testemunha	14,697 \pm 2,407b	1,333 \pm 0,361ab
10 ⁶	16,889 \pm 1,622a	1,667 \pm 0,284ab
10 ⁷	14,372 \pm 1,884b	1,000 \pm 0,322b
10 ⁸	16,308 \pm 1,814a	2,000 \pm 0,398a
2ª leitura - 21 DAE		
Testemunha	27,289 \pm 2,854ab	2,500 \pm 0,333b
10 ⁶	29,858 \pm 2,106a	2,917 \pm 0,452ab
10 ⁷	26,172 \pm 3,017b	2,528 \pm 0,481b
10 ⁸	29,750 \pm 2,774a	3,083 \pm 0,452a
3ª leitura - 27 DAE		
Testemunha	33,869 \pm 2,567a	4,250 \pm 0,289b
10 ⁶	36,819 \pm 3,353a	4,556 \pm 0,434ab
10 ⁷	33,772 \pm 3,989a	4,333 \pm 0,348b
10 ⁸	36,842 \pm 1,462a	4,833 \pm 0,577a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas