

INTERAÇÕES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* E O CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

Neiva Knaak

Bióloga (UNISINOS) e Mestre e Doutoranda em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre (UNISINOS).

Aline Olíbani de Azambuja

Bióloga (UNISINOS) e Mestre em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre (UNISINOS).

Andresa Patrícia Regert Lucho

Engenheira Agrônoma (UFRGS) e Mestre em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre (UNISINOS).

Diouneia Lisiane Berlitz

Bióloga (UNISINOS) e Mestre em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre (UNISINOS).

Lidia Mariana Fiuza

Engenheira Agrônoma (UPF), Mestre em Fitotecnia – Fitossanidade (UFRGS), Doutora em Ciências Agrônomicas (ENSAM-Montpellier) e Pós-Doutora em biotecnologia Vegetal (CIRAD-Montpellier).

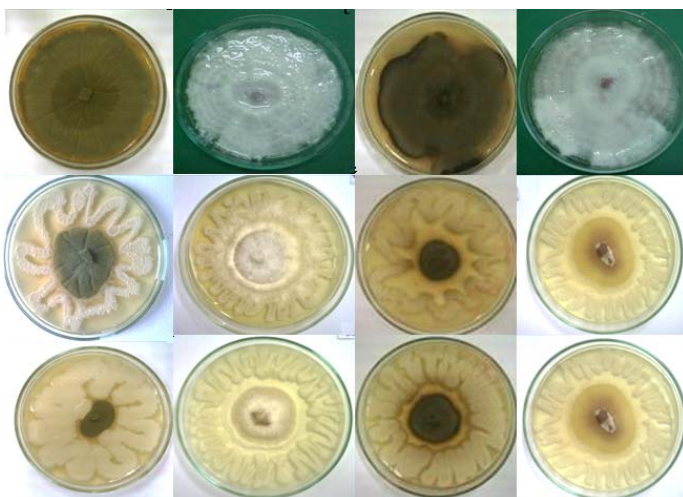
Os tratamentos fitossanitários constituem uma rotina nos cultivos agrícolas, os quais visam o controle de plantas daninhas, insetos e fitopatógenos. Como agentes do manejo integrado das culturas, os pesquisadores têm priorizado a aplicação de inimigos naturais (parasitóides e predadores), extratos vegetais e microrganismos. Nesse contexto, dados referentes às interações desses agentes de controle são apresentados, com ênfase nas bactérias entomopatogênicas da espécie *B. thuringiensis*. Considerando o controle biológico de fitopatógenos, a doença não é só a interação entre patógeno e hospedeiro, mas o resultado da interação entre patógeno, hospedeiro e uma série de microrganismos não patogênicos que também repousam no sítio de infecção. Esses agentes não patogênicos podem limitar ou aumentar a atividade do pa-

1.1 Interações de métodos de controle de insetos

O interesse por obter produtos agrícolas em sistemas sustentáveis estimula o estudo e o uso de estratégias do Manejo Integrado de Pragas (MIP) e do Manejo Ecológico de Pragas (MEP). Sendo assim, extratos vegetais apropriadamente selecionados e em concentrações adequadas podem ser usados em associação com entomopatógenos obtendo-se efeitos aditivos ou sinérgicos no controle (Saito & Luchini, 1998).

Segundo os autores, o efeito estressor desses extratos sobre a praga pode determinar uma ação mais rápida do entomopatógeno e/ou um maior índice de mortalidade. Assim essa associação pode ser positiva ou benéfica quando o inseto-alvo tem mecanismos comportamentais de defesa contra entomopatógenos, quando as condições ambientais não são favoráveis ou as quantidades de inóculo necessárias são elevadas.

Nesse sentido, Lucho (2004) estudou a interação entre *B. thuringiensis aizawai* e extrato de folhas de *Melia azedarach* (cinamomo) para o controle de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, em laboratório. Na pesquisa foram avaliados quatro tratamentos: extrato de folhas de *M. azedarach*; *B. thuringiensis aizawai*; mistura de *B. thuringiensis aizawai* e extrato de *M. azedarach*; controle (água destilada) sendo a mortalidade das lagartas observada diariamente, até o sétimo dia após aplicação dos tratamentos (DAT). O uso de *B. thuringiensis*, isoladamente ou em associação com o extrato de *M. azedarach* mostrou-se letal no 1º DAT. Nas lagartas submetidas somente ao extrato, a mortalidade iniciou aos 2 DAT e ao final do bioensaio, a mortalidade acumulada foi maior na associação do biopesticida e do inseticida botânico. Os percentuais de mortalidade de *S. frugiperda* observados aos 7 DAT foram de 55, 70 e 90% para os tratamentos com extrato, *B. thuringiensis aizawai* e a associação de *B. thuringiensis aizawai* com extrato de *M. aze-*



tógeno, ou a resistência do hospedeiro. O sucesso do biocontrole depende das propriedades antagonistas e dos mecanismos de ação do hiperparasita. Desse modo, nesse trabalho são apresentadas várias pesquisas que relatam o efeito antagonístico de *B. thuringiensis* aos fungos fitopatogênicos.

Tabela 1. Aplicações simultâneas de entomopatógenos e extratos vegetais no controle de pragas de grãos armazenados (adaptada de Sabbour, 2003)

Plantas	Insetos	Redução da CL_{50} (%)	
		<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. bassiana</i>
Folhas de <i>T. distichum</i>	<i>Plodia interpunctata</i>	71	45
	<i>Ephesia cautella</i>	63	35
	<i>Ephesia kuehniella</i>	69	20
Óleo volátil de <i>T. distichum</i>	<i>Plodia interpunctata</i>	67	43
	<i>Ephesia cautella</i>	63	43
	<i>Ephesia kuehniella</i>	74	34
Óleo volátil de <i>B. carterri</i>	<i>Plodia interpunctata</i>	67	30
	<i>Ephesia cautella</i>	72	46
	<i>Ephesia kuehniella</i>	79	38

darach, respectivamente. Assim, foi observado um efeito sinérgico dos ingredientes ativos de *B. thuringiensis aizawai* e extrato de *M. azedarach* contra *S. frugiperda*, pois o resultado da associação foi superior ao uso dos bioinseticidas isoladamente.

Apesar disso, a interação de métodos de controle nem sempre apresenta o efeito desejado sobre o inseto. Isso foi demonstrado por Berlitz (2006) que utilizou *B. thuringiensis* simultaneamente com o cinamomo, *M. azedarach*. As concentrações utilizadas nesse trabalho não demonstraram eficiência, pois a mortalidade do lepidóptero *S. frugiperda* foi de, apenas 6% e para larvas do coleóptero *Oryzophagus oryzae* foi de 11%. Esse fato pode estar associado a um possível efeito inibitório da bactéria sobre o extrato vegetal ou vice-versa.

Em relação ao uso simultâneo de bioinseticidas, Sabbour (2003) realizou ensaios com extrato das folhas e óleo volátil de *Taxodium distichum* (L. Rich) e *Boswellia carterri*, em combinação com a bactéria *B. thuringiensis* e o fungo *Beauveria bassiana* (Vuillemin, 1912), em pragas de produtos armazenados. Em seus resultados a combinação dos entomopatógenos com as plantas, reduziu significativamente o valor da Concentração Letal Média (CL_{50}), conforme mostra a Tabela 1.

De acordo com Novan, (1992) a utilização de extratos vegetais reduz a alimentação do inseto através de seus aleloquímicos, o que otimiza a atividade inseticida do microrganismo, resultando em um maior índice de mortalidade.

Já os autores Zhang et al. (2000) utilizaram *B. thuringiensis kurstaki* em diferentes concentrações e suplementado com tripsina de soja mostrando uma inibição no crescimento larval de *H. armigera* ($P < 0,05$). Em ensaios *in vitro* e *in vivo*, os autores comentam que a degradação das toxinas de *B. thuringiensis* pode ser inibida pela tripsina da soja. Os dados sugerem que o tempo de retenção das toxinas no intestino médio das larvas foi estendido, ocorrendo também um sinérgico entre os cristais inseticidas da bactéria e os inibidores de tripsina da soja.

No caso do uso interativo de *B. thuringiensis* com nematóides entomopatogênicos, Koppenhöfer e Kaya (1997) utiliza-

ram *B. thuringiensis japonensis* e nematóides em larvas de *Cyclocephala hirta* e *C. pasadenae* (Coleoptera: Scarabaeidae) mostrando que essa interação apresentou maior mortalidade que os tratamentos individuais, viabilizando assim o uso integrado desses organismos.

B. thuringiensis também pode ser utilizado em combinação com outros microrganismos para o controle de insetos-praga. Nesse sentido, Broderick et al. (2000), identificaram um aumento de 35% da mortalidade do lepidóptero *Lymantria dispar* (L.) quando usado *B. thuringiensis* e zitermicina A de *B. cereus*, sendo que a zitermicina é responsável pelo efeito sinérgico dos microrganismos. Primeiramente porque essa substância acumula-se em grandes quantidades nas culturas de *B. cereus*, segundo porque quando utilizada individualmente não causa efeito sobre o inseto, somente em combinação com *B. thuringiensis*, aumentando a mortalidade de *L. dispar*.

Os resultados de Wraight & Ramos (2005) também demonstram sinérgico de 35,2; 33,8; e 21,1% quando utilizado simultaneamente um produto comercial a base de *B. thuringiensis* e do fungo *B. bassiana* em *Leptinotarsa decemlineata*. Esses autores revelam que a interação pode ter sido ocasionada pela intoxicação causada pelo entomopatógeno, inibindo a alimentação do inseto, ocasionando uma situação de estresse, e efeitos fisiológicos, o que facilitou a penetração do fungo no inseto. Efeitos semelhantes também foram observados por Ma et al. (2008), quando utilizada a proteína Cry 1Ac de *B. thuringiensis* com *B. bassiana*. Esses autores observaram efeitos deletérios na mortalidade das larvas de *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae), além de diminuição na formação de pupas e na emergência dos insetos adultos.

Os autores Brousseau et al., (1998) também encontraram efeitos sinérgicos quando avaliada a combinação de *B. thuringiensis kurstaki* com destruxinas do fungo *M. anisopliae* para combater larvas de *Choristoneura fumiferana* (Clemens, 1865) (Lepidoptera: Tortricidae).

Outra forma de controle integrado foi avaliada por Petry et al. (2004) utilizando

B. thuringiensis e controle mecânico de espécies de *Simulium*, revelando 88,83% de índice reducional médio de larvas dos mosquitos. Já Andrade & Modolo (1991) testaram *B. thuringiensis israelensis* em mistura com o pesticida temephos contra *A. aegypti* causando 91 e 98% de mortalidade corrigida, diminuindo o tempo letal médio. O modo de ação das proteínas de *B. thuringiensis israelensis* foi avaliada por Gómez et al. (2007) demonstrando que a presença da proteína Cyt1Aa aumenta a capacidade de ligação, na membrana intestinal do inseto, da proteína Cry11A. Isso porque a proteína Cyt depois de solubilizada expõe regiões específicas na membrana, promovendo a ligação da proteína Cry e aumentando assim, sua atividade inseticida.

Essas informações indicam que se torna cada vez mais importante as pesquisas nessa área, uma vez que a aplicação de inseticidas químicos resulta em grandes impactos nos agroecossistemas, pois atingem não somente os inimigos naturais dos insetos, mas também contaminam o solo e os lençóis de água subterrâneos.

1.2 Interações tri-tróficas

Para um melhor entendimento dos agroecossistemas, é importante estudar as relações existentes entre as espécies e suas teias alimentares, que constituem um complexo de interações tróficas onde há interesse em interações tri-tróficas visando a utilização de patógenos, parasitóides e predadores, juntamente com a planta hospedeira/inseticida. Essas relações podem ser devidamente utilizadas nas práticas de manejo de insetos-praga, uma vez que se torna importante a preservação de inimigos naturais dos insetos, que são também os controladores das populações da praga.

As interações tri-tróficas podem ser resultantes de dois efeitos: efeito direto da planta sobre a biologia e o comportamento do inimigo natural, devido às substâncias químicas ou caracteres morfológicos da planta; ou efeito da planta sobre a praga alterando seu comportamento, desenvolvimento, tamanho, o que afeta também seu inimigo natural. Essas interações são mais complexas quando há mais de uma espécie de inimigo natural envolvida. Nesse tipo de interação,

as plantas são importantes “meios de comunicação”, pois ao serem atacadas por um herbívoro, liberam substâncias voláteis pelas folhas, as quais orientam as fêmeas dos parasitóides a encontrarem as lagartas e depositar seus ovos. Sendo assim, os odores têm papel fundamental na organização dos indivíduos nos agroecossistemas (Vendramin, 2002; Vilela & Palini, 2002).

As interações tri-tróficas podem ser exemplificadas nas culturas da soja e do milho. A cultura é atacada pela lagarta-da-soja, *A. gemmatilis* que é combatida através da aplicação de vírus, o *Baculovirus anticarsia*, e predada por *Geocoris* sp. No caso do milho, as lagartas de *S. frugiperda* podem ser parasitadas por *Trichogramma* sp. e controladas através do entomopatógeno *B. thuringiensis*.

De acordo com Ferry et al. (2004), os insetos são causadores de perdas mundiais entre 10 e 20% da produção agrícola. Com isso as pesquisas na área biotecnológica estudam diferentes formas de induzir a resistência de uma planta a seu predador. Apesar disso as técnicas convencionais de controle químico ainda são largamente utilizadas, sendo que o controle biológico encontra algumas resistências, principalmente devido aos elevados custos aos produtores agrícolas.

Agrawal (2000) relata que as plantas podem ser atrativas ou benéficas a alguns inimigos naturais de herbívoros, mas também podem ser tóxicas ou prejudiciais a esses. Assim, as interações tri-tróficas podem identificar esses mecanismos de modo a poder manipulá-los, o que irá ampliar o controle e reduzir o uso de inseticidas.

Os autores Ferry et al. (2004) identificaram diferentes estratégias de defesa das plantas a seus predadores. Dentre essas, pode-se citar mecanismos de defesa endógenos e moleculares, sinalização das plantas e a produção de substâncias voláteis. Em resposta, os insetos também desenvolveram estratégias de defesa a esses compostos, principalmente através da produção de proteinases e de mecanismos especiais de desintoxicação utilizando, por exemplo, citocromo P450, monooxigenases e glutatione S-transferases.

Entretanto, a complexidade química das plantas pode manipular seus fenótipos e, conseqüentemente de seus inimigos naturais (Wittstock e Gerhenzon, 2002). Venzon et al. (2001) relatam que, quando inseto uma quantidade de inimigos naturais ou removendo-se determinadas espécies de um agroecossistema, uma grande quantidade de interações indiretas pode ser esperada. Essas interações podem ser positivas ou negativas ao controle biológico, devendo-se dar importância aos níveis de interações entre as espécies.

As interações tri-tróficas também podem ser exemplificadas através do trabalho de Dequech et al. (2005) que avaliaram lagartas de *S. frugiperda* parasitadas por *Camptoplex flavicincta* e infectadas por *B. thu-*

ringiensis aizawai. Em seus resultados o uso conjunto dos componentes biológicos citados, aumentou a mortalidade do inseto-praga e diminuiu seu consumo de alimento.

Resultados semelhantes foram encontrados por Moraes et al. (2004) que identificaram a influência de silício em plantas de trigo, no pulgão-verde (*Schizaphis graminum*) e seus inimigos naturais. Os dados desses autores mostram que a aplicação de silício na cultura aumentou a resistência das plantas de trigo diminuindo a preferência alimentar do pulgão-verde, não afetando seus inimigos naturais.

Através desses trabalhos nota-se a importância de novas pesquisas visando identificar relações tri-tróficas benéficas e eficientes que podem ser utilizadas junto às práticas de Manejo Integrado de Pragas.

1.3 Compatibilidade de produtos fitossanitários com *Bacillus* entomopatogênicos

O controle biológico ocorre naturalmente no ambiente através da ação de inimigos naturais, mantendo em níveis relativamente baixos as populações de inúmeras pragas (Lacey et al. 2001). As bactérias *Bacillus thuringiensis* e *B. sphaericus* são entomopatógenos que desempenham o papel de agentes de controle microbiano de pragas de importância agrícola e vetores de agentes etiológicos de doenças humanas (De Maagd et al., 2003). Diante disso, a utilização e conservação desses microrganismos, dentro de agroecossistemas, é uma das estratégias utilizadas no Manejo Integrado de Pragas, já que são encontradas naturalmente nesses ambientes. Assim, torna-se importante conhecer a ação dos produtos fitossanitários, determinando a sua seletividade e compatibilidade sobre os entomopatógenos, com o objetivo de minimizar os impactos tanto no ambiente quanto na microbiota residente (Batista-Filho et al., 2001).

A excessiva aplicação de defensivos agrícolas vem ocasionando uma série de desequilíbrios ambientais, especialmente nas populações de entomopatógenos, verificadas através da inibição do crescimento, esporulação, mutações genéticas, redução da toxicidade a determinada praga, influenciando diretamente no estabelecimento e sobrevivência (Alves et al., 1998). No entanto, a ação dos agroquímicos sobre os microrganismos pode variar em função da espécie e linhagem do microrganismo, como também da formulação química e dosagens dos produtos (Batista-Filho et al., 2001). Contudo, alguns produtos apresentam seletividade aos entomopatógenos, podendo potencializar o seu efeito e contribuir para o controle do inseto-alvo (Benz, 1971; Chen et al., 1974). Assim, a associação de inseticidas químicos e biológicos contribuem para minimizar os efeitos negativos sobre os agroecossistemas (Chen

et al., 1974; Batista-Filho et al., 2001).

Grande parte das reações dos pesticidas, atualmente utilizadas no controle de pragas, é desconhecida devido à carência de informações a respeito da compatibilidade desses produtos sobre entomopatógenos (Morris, 1977). Para *B. thuringiensis*, majoritariamente os trabalhos realizados sobre interação são provenientes da década de 70, como reflexo da demasiada aplicação de inseticidas sintéticos orgânicos como hidrocarbonetos clorinados, organofosforados, metilcarbamatos e piretróides (Casida e Quistad, 1998). Para *B. sphaericus*, quase a totalidade dos trabalhos se referem à toxicidade às larvas de dípteros, ressaltando a importância de estudos que visam à proteção desse inimigo natural, através da compatibilidade com os pesticidas químicos.

Ainda na década de 70, Doughert et al. (1971) obtiveram respostas variadas na sensibilidade de *B. thuringiensis thuringiensis* em função dos diversos solventes utilizados para os mesmos pesticidas. A presença de emulsificantes e outros aditivos concentrados, utilizados nas preparações, podem gerar problemas de compatibilidade com entomopatógenos devendo ser considerado na elaboração de novas formulações comerciais (Morris, 1977). O mesmo autor testou a compatibilidade de 27 pesticidas sobre a germinação e replicação de *B. thuringiensis kurstaki*, concluindo que o grupo dos carbamatos foram os mais compatíveis, as piretrinas altamente bacteriostáticas e os produtos acefato, tricolorfon, metomil, carbaril, mexacarato e PH 60-40 (derivado da uréia) podem ser utilizados em conjunto com a bactéria.

Os trabalhos mais atuais nessa linha de pesquisa avaliaram o efeito de diferentes concentrações de defensivos agrícolas sobre microrganismos entomopatogênicos. Especialmente para *B. thuringiensis*, os dados mostram que tiامتoxam, carbosulfan, diafentiurom, imidacloprid, acefato, utilizados nas concentrações máximas, não apresentaram diferença significativa nas unidades formadoras da colônia - UFC (Batista-Filho et al., 2001; Batista-Filho et al., 2003; Almeida et al., 2003). Por outro lado, essas pesquisas revelam que endosulfan, monocrotofós, deltametrina e ciproconazole + tiامتoxam inibiram a formação das colônias. Já, na concentração mínima, o diafentiurom foi sinérgico e o tiامتoxam e ciproconazole + tiامتoxam não afetaram *B. thuringiensis*. Utilizando ambas as concentrações, o endosulfan, deltametrina e profenofós + lufenuron inibiram as colônias da bactéria e tiامتoxam + cipermetrina foram compatíveis.

Há poucas pesquisas que avaliam a compatibilidade de bactérias entomopatogênicas com os pesticidas mais utilizados em diversas culturas, como por exemplo, o arroz irrigado. No caso, Azambuja (2006) testou seis produtos fitossanitários, comumente utilizados na orizicultura irrigada, sobre as bactérias *B. thuringiensis* e *B. sphaericus*, em condições laboratoriais e observou que os herbicidas glifosato e propanil foram significativa-

mente antagônicos ao desenvolvimento de *B. thuringiensis*, e os mesmos produtos, incluindo o fungicida azoxistrobina, reduziram o crescimento de *B. sphaericus*, afetando esse microrganismo com mais intensidade. Entretanto, relatou uma provável compatibilidade dos herbicidas quincloraque e pirazosulfuron-etil e o inseticida fipronil para ambos entomopatógenos naturais do solo, propondo a sua utilização em Programas de MIP.

Complementando os dados anteriores, Batista-Filho et al. (2001) verificaram que o inseticida fipronil apresentou um efeito sinérgico aumentando a UFC de *B. thuringiensis* (Dipel®) quando utilizado na concentração mínima, mas não teve influência quando utilizado na concentração máxima. Entretanto, Rohr (2005) mostrou que azoxistrobina, quincloraque e fipronil não apresentaram interações significativas sobre os bioinseticida de *B. thuringiensis kurstaki* (Dipel®) e *B. thuringiensis aizawai* (Xentari®).

Os dados dos ensaios realizados *in vitro* expõem ao máximo os microrganismos a ação dos produtos fitossanitários, podendo diferir das condições de campo, onde outros fatores interferem, diminuindo a intensidade das reações. Nesse sentido, Alves et al. (1998) salientam que a seletividade de um produto testado *in vitro* pode ser confirmado em campo, mas o antagonismo apresentado em laboratório nem sempre pode ser verificado no campo.

Os dados referentes às interações entre entomopatógenos e pesticidas em condições de campo são ainda mais reduzidos (Alves et al., 1998). Nesse enfoque, Azambuja (2006), em laboratório, concluiu que os agroquímicos: fipronil, azoxistrobina, quincloraque, glifosato, propanil e pirazosulfuron-etil não interferiram na abundância de *B. thuringiensis* nem de *B. sphaericus*. Ressaltando esse padrão, Batista-Filho et al. (2001) estudaram a compatibilidade do tiametoxam e *B. thuringiensis* (Dipel®), aplicados em lavouras de feijão, revelando que o inseticida não interferiu no potencial de inóculo do entomopatógeno, assim como *in vitro*, recomendando a utilização do produto em conjunto com a bactéria. Conforme foi verificado, no ambiente natural, os diversos fatores bióticos e abióticos atuam minimizando os possíveis impactos sobre os *Bacillus* spp. da ação direta dos produtos fitossanitários (Alves et al., 1998).

Em outro trabalho, Das et al. (2003) verificaram a influência de dois inseticidas em diversos microrganismos presentes nos solos de cultivo de arroz. Esses autores mencionam que forato e carborufam estimularam o crescimento das populações de bactérias e as proporções de *Bacillus* sp. No entanto, o efeito sinérgico de carborufam foi mais pronunciado. Esse fato está relacionado à capacidade de alguns microrganismos desse gênero utilizarem o inseticida e degradarem seus produtos para o seu próprio desenvolvimento no solo.

Como já mencionado, na literatura a respeito de interações de microrganismos ento-

mopatógenos e agroquímicos, em condições de campo, é muito restrita e quase a totalidade dos trabalhos realizados dessa natureza se referem aos fungos entomopatógenos avaliados *in vitro*. A falta de padronização na realização dos testes é um dos problemas desse tipo de estudo que, em muitos casos, não permite uma comparação efetiva entre os produtos (Alves et al., 1998).

Diante disso, os microrganismos entomopatógenos que habitam naturalmente os agroecossistemas devem ser preservados através de técnicas culturais e principalmente na utilização de pesticidas compatíveis não comprometendo o MIP (Almeida et al., 2003).

1.4 Controle microbiano de Fitopatógenos

1.4.1 Fungos Fitopatogênicos:

Os fungos constituem um grupo de organismos que se caracteriza por nunca apresentarem tecido verdadeiro, por serem eucarióticos e aclorofilados. A maioria das espécies fúngicas é saprofítica, mas algumas desenvolveram a capacidade de parasitar plantas, causando a morte ou um retardamento do desenvolvimento do hospedeiro. Devido aos sistemas intensivos de produção agrícola, o índice e a prevalência de doenças têm aumentado significativamente, podendo, em alguns casos, causar perda total da produção. Esse aumento de doenças em áreas agrícolas se deve principalmente ao desequilíbrio entre as diferentes populações microbianas do solo, do rizoplane, do fitoplane e endofíticas que interagem com plantas, permitindo o estabelecimento e o desenvolvimento dos fungos patogênicos (Esposito & Azevedo, 2004).

Os autores relatam que para o fungo patogênico colonizar a planta hospedeira, inicialmente ele precisa quebrar o seu sistema de defesa. Para isso, produz enzimas hidrolíticas (cutinases, celulases, ligninases e outras) que quebram a cutícula e a parede da celular hospedeira; toxinas que reduzem ou inibem completamente a atividade das células da planta a ser parasitada e/ou produzem substâncias específicas de plantas (hormônios) que quebram o equilíbrio fisiológico da célula vegetal, causando distúrbios no crescimento e na diferenciação das células da planta (Esposito e Azevedo, 2004).

Em geral, os fungos patogênicos apresentam três estágios de colonização da planta hospedeira. Esses estágios são caracterizados pela germinação do esporo na superfície dos tecidos da planta hospedeira, pelo reconhecimento da superfície, pela formação de apressório e pela penetração nos tecidos vegetais. Estando no interior da planta, o fungo pode colonizar os espaços intercelulares e/ou intracelulares de forma parasítica e, posteriormente, produzir estruturas reprodutivas que permitam a

sua disseminação (Esposito e Azevedo, 2004).

1.4.2 Efeitos de *B. thuringiensis* em fitopatógenos:

Alguns microrganismos, como bactérias, fungos e actinomicetos, produzem metabólitos capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos. Estas substâncias são diferentes na sua estrutura e distribuição, se restringindo aos poucos compostos e estando presentes em apenas alguns microrganismos (Kennedy, 1999). Os produtos do metabolismo secundário microbiano são alvos de pesquisas cada vez mais intensas na busca de substâncias bioativas, para atuação em diversas áreas como a agricultura, veterinária e farmácia (Woodruff, 1980).

Grande parte dos microrganismos envolvidos no controle biológico atua através de antibiose, onde ocorre a interação entre organismos, um metabólito produzido por um deles tem um efeito prejudicial sobre o outro. A produção de metabólitos pode resultar na completa lise e dissolução da estrutura celular e independe do contato físico entre os microrganismos (Bettiol & Ghini, 1995), dessa forma, a busca por microrganismos antagônicos a fungos fitopatogênicos tem aumentado (Benitez et al., 2004). Diversas espécies de *Bacillus* são citadas como produtoras de antibióticos, podendo secretar metabólitos comercialmente importantes, como enzimas aminolíticas e enzimas proteolíticas (Bettiol & Ghini, 1995).

Bettiol (1988), em trabalho de seleção de microrganismo antagônico a *Pyricularia oryzae*, verificou que *B. subtilis* foi o mais eficiente em inibir o crescimento micelial do patógeno, e constatando também que o antagonista apresenta boas características para uso como agente de controle biológico, pois, além de rápido desenvolvimento, tanto em meio de cultura como na natureza, produzem endósporo e antibióticos, crescem em larga faixa de temperatura e adaptam-se a várias condições ambientais.

O processo para que ocorra o antagonismo exige a degradação da parede celular fúngica por hidrolases secretada por microrganismos. Como quitina e beta-1,3-glucana são os principais componentes estruturais da parede celular fúngica, quitinases e glucanases podem ser importantes no controle biológico desses microrganismos (Kulminskaya et al., 2001). Knaak et al. (2007) testaram as cepas e proteínas Cry1Ab e Cry1Ac sintetizadas por *Bacillus thuringiensis thuringiensis* 407 (pH 408) e *B. thuringiensis kurstaki* HD-73, respectivamente, sobre os fungos fitopatogênicos *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *F. solani*. Verificaram que as cepas *B. thuringiensis*, que sintetizam as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac, reduziram o crescimento micelial dos fungos *R. solani*, *P. grisea*, *F. oxysporum* e *F. solani* durante o período avaliado, quando comparado aos controles. As duas cepas inibiram o crescimento dos fitopatógenos testados até sete dias após a incubação, onde houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os trata-

mentos bacterianos e os grupos controle. Na avaliação da ação das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac, sobre *R. solani*, *P. grisea*, *F. oxysporum* e *F. solani*, não foi observada a formação do halo de inibição de crescimento.

Nos resultados obtidos para germinação dos conídios também não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre o controle e os tratamentos com as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac sobre os fungos citados anteriormente. Batista-Junior et al. (2002) testaram duas cepas: *B. thuringiensis kurstaki* HD1, produtor do cristal com atividade inseticida e *B. thuringiensis* 407, mutante não produtor do cristal protéico, contra os fitopatógenos *F. solani*, *F. oxysporum* e *Colletotrichum* sp., concluindo que a ausência dos genes produtores do cristal protéico não interferiram no poder de degradação do micélio pelos isolados de *B. thuringiensis* estudados.

O efeito inibitório das cepas de *B. thuringiensis* nas estirpes dos fungos fitopatogênicos pode estar relacionado com a produção de enzimas que podem ter ação contra a parede celular fúngica, já que algumas bactérias antagonistas de fungos fitopatogênicos produzem quitinases (Asaka e Shoda, 1996; Mavingui e Heulin, 1994). Nesse contexto, Barboza-Corona et al. (1999) selecionaram e caracterizaram enzimas (quitinases) de *B. thuringiensis* nativos do México, concluindo que a ação sinérgica entre quitinases e proteínas Cry podem ser aplicadas no controle biológico de fitopatógenos.

Diferentes tipos de fungos e bactérias produzem uma grande variedade de enzimas degradantes (Mauch et al., 1988). Sendo assim, *B. thuringiensis* é uma bactéria que secreta quitinases em meios de cultura quando cultivada em meio com sais e quitina (Barboza-Corona et al., 2003). Alguns estudos sugerem que as quitinases de *B. thuringiensis* possuem potencial biotecnológico contra fungos fitopatogênicos (Escudero-Abarca et al., 2001; Reyes-Ramírez et al., 2004).

La Vega et al. (2006) testaram a enzima quitinase, purificada de *B. thuringiensis aizawai*, a qual produz 66 kDa quitinase extracelular, nos fungos *Fusarium* sp. e *S. rolfsii*. Os fitopatógenos foram incubados com a enzima purificada por 120h, demonstrando que os valores de inibição do crescimento de *S. rolfsii* e *Fusarium* sp. foram superiores e estatisticamente diferentes do controle (11 e 24%, respectivamente). Os mesmos autores não encontraram diferenças significativas no crescimento com a enzima purificada, em comparação com o extrato bruto enzimático. Melent'ev et al. (2001) testaram o extrato bruto e purificado de quitinase de *Bacillus* sp. e descobriram que a enzima purificada perdeu a sua capacidade de inibir o crescimento de *Fusarium oxysporum* e *Helminthosporium sativum*. No entanto, há relatos de que algumas cepas bacterianas apresentam uma relação direta entre as suas habilidades para

reprimir o crescimento de fungos fitopatogênicos e para produzir quitinases (Inbar e Chet, 1991).

Resmuska e Pria (2007) avaliaram o efeito dos agentes antagonistas *B. thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento micelial, sobre os fungos fitopatogênicos: *Sclerotium rolfsii*, *Diaporthe phaseolorum*, *Pythium aphanidermatum*, *Monilinia fructicola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*. Verificaram que a bactéria *B. thuringiensis* mostrou-se eficiente no controle de *M. fructicola*, *S. sclerotiorum*, *F. solani* e *S. rolfsii*, impedindo que o fungo *S. sclerotiorum* formasse escleródios. O fungo *Trichoderma* sp., exerceu efeito no crescimento micelial do fungo *S. rolfsii*. *B. thuringiensis* mostrou-se mais eficiente que *Trichoderma* sp. no controle biológico dos fitopatógenos *D. phaseolorum*, *P. aphanidermatum*, *M. fructicola*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *F. solani*.

1.5 Referências

Agrawal, A.A. 2000. Mecanismos, ecológicos e consequências e agrícolas das interações tri-tróficas. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 329-335.

Almeida, J.E.M.; Batista-Filho, A.; Lamas, C.; Leite, L.G.; Trama, M.; Sana, A.H. 2003. Avaliação da compatibilidade de defensivos agrícolas na conservação de microrganismos entomopatogênicos no manejo de pragas do cafeeiro. *Arquivos do Instituto Biológico*, 70: 79-84.

Alves, S.B.; Moino, A.J.; Almeida, J.E.M. 1998. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (ed.), *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, FEALQ, p.217-238.

Andrade, C.F.S.; Modolo, M. 1991. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in integrated control. *Revista de Saúde Pública* 25(3): 184-187.

Azambuja, A. O. 2006. Ecologia de *Bacillus* spp. em solos orizícolas e o impacto dos tratamentos fitossanitários. Dissertação: Mestrado. Universidade do Vale do Rio dos Sinos - São Leopoldo, RS. 66p.

Asaka, O.; Shoda, M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:4081-4085.

Barboza-Corona, J.E.; Contreras, J.C.; Velásquez-Robledo, R.; Bautista-Justo, M.; Gómez-Ramírez, M.; Cruz-Camarillo, R.; Ibarra, J.E. 1999. Selection of chitinolytic strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters*, 21:1125-1129.

Barboza-Corona, J.E.; Nieto-Mazzocco, E.; Velásquez-Robledo, R.; Salcedo Hernandez, R.; Bautista, M.; Jimenez, B.; e Ibarra, J.E. 2003. Cloning, sequencing, and expression of the chitinase gene chiA74 from *Bacillus thu-*

ringiensis. *Applied Environmental Microbiology*, 69:1023-1029.

Batista Junior, C.B.; Albino, U.B.; Martinez, A.M.; Saridakis, D.P.; Matsumoto, L.S.; Avanzi, M.A.; Andrade, G. 2002. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos. *Pesq. Agropec. Bras.*, 37:1189-1194.

Benitez, T.; Rincon, A.M.; Limon, M.C.; e cõdon, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiologia* 7:249-260.

Bettiol, W. Seleção de microrganismos antagonísticos a *Poryzae* para o controle da Brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). Piracicaba, 1988. 140 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-Universidade de São Paulo.

Bettiol, W.; Ghini, R. Controle Biológico. In: Bergamin, A. F.; Kimati, H.; Amorin, L. Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.717-728.

Batista-Filho, A.; Almeida, J.E.M.; Lamas, C. 2001. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology*, 30: 437-447.

Batista-Filho, A.; Ramiro, Z.A.; Almeida, J.E.M.; Leite, L.G.; Cintra, C.R.R.; Lamas, C. 2001. Manejo integrado de pragas em soja: impactos de inseticidas sobre inimigos naturais. *Arquivos do Instituto Biológico*, 70: 61-67.

Benz, G. 1971. Synergism of microorganisms and chemical insecticides. In: Burgess, H.D. and Hussey, N.W. (eds.), *Microbial Control of Insects and Mites*. New York, Academic Press, p. 327-355.

Berlitz, D.L. 2006. Toxicologia de *Bacillus thuringiensis* e *Melia azedarach* em organismos associados a orizicultura. Dissertação: Mestrado. Universidade do Vale do Rio dos Sinos – São Leopoldo, RS. 83p.

Broderick, N.A.; Goodman, R.M.; Raffa, K.F.; Handelsman, J. 2000. Synergy between zwittermicin A and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Biological Control* 29(1): 101-107.

Brousseau, C.; Charpentier, G.; Bellocik, S. 1998. Effects of *Bacillus thuringiensis* and destruxins (*Metarbizium anisopliae* micotoxins) combinations on spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 72: 262-268.

Casida, J.E.; Quistad, G.B. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annual Review Entomology*, 43: 1-16p.

Chen, K.S.; Funke, B.R.; Schulz, J.T.; Carlson, R.B.; Proshold, F.I. 1974. Effect of certain organophosphate and carbamate insecticides on *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 67: 471-473.

Das, A.C.; Chakravarty, A.; Sukul, P. and

- Mukherjee, D. 2003. Influence and persistence of phorate and carbofuran insecticides on microorganisms in rice field. *Chemosphere*, 53: 1033-1037.
- Dequech, S.T.B.; Silva, R.F.P.; Fiuza, L.M. 2005. Interação entre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) e *Bacillus thuringiensis aizawai*, em laboratório. *Biological Control* 34 (6) 937-944.
- De Maagd, R.A.; Bravo, A.; Berry, C.; Crickmore, N.; Schnepf, H.E. 2003. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review Genetic*, 37: 409-433.
- Dougherty, E.M., Reichelderfer, C.F. and Faust, R.M. 1970. Sensitivity of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* to various insecticides and herbicides. *Journal Invertebrate Pathology*, 17: 292-293.
- Escudero-Abarca, B.I., González-Cu, G., Reyes, A., de la Cruz, I., Aguilar-Uscanga, M.G., Cuneo, M.G., e Ramírez, M. 2001. Biocontrol of phytopathogenic fungi in bean seeds by microbial chitinase. In *Chitin enzymology*. Edited by R.A.A. Muzzarelli. Atec, Ancona, Itália. pp. 133-140.
- Esposito, E. e Azevedo, J.L. 2004. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. IN: *Ecologia: Habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias*. Maccheroni Jr., W.; Araújo, W.L. e Lima, A.O.S. Caxias do Sul: Educ. 510p.
- Ferry, N.; Edwards, M.G.; Gatehouse, J.A.; Gatehouse, A.M.R. 2004. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Current Opinios in Biotechnology* 15: 155-161.
- Gómez, I.; López, L.P.; Garay, C.M.; Fernandez, L.E.; Pérez, C.; Sánchez, J.; Soberón, M.; Bravo, A. 2007. Role a receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* 28: 169-173.
- Inbar, J., e Chet, I. 1991. Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil-borne plant pathogens by this bacterium. *Soil Biol. Biochem.* 23:973-978.
- Kennedy, A.C. 1999. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 74:65-76.
- Knaak, N., Rohr, A.A. e Fiuza, L.M. 2007. In vitro effect of *Bacillus thuringiensis* strains and cry proteins in phytopathogenic fungi of paddy rice-field. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:1-7.
- Kulminskaya, A.A., Thomsen, K.K., Shabalin, K.A., Sidorenko, I.A., Eneyskaya, E.V., Savel'ev, A.N., and Neustroev, K.N. 2001. Isolation, enzymatic properties, and mode of action of an exo-1,3-beta-glucanase from *T. viride*. *European Journal of Biochemistry*, 268:6123-6131.
- Koppenhofer, A.M. & Kaya, H.K. 1997. Additiv and synergistic interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab grub control. *Biological Control* 8: 131-137
- La Vega, L.M., Barboza-Corona, J.E., Aguilar-Uscanga, M.G. e Ramirez-Lepe, M. 2006. Purification and characterization of na exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi. *Canadian Journal of Microbiology*. 52:651-657.
- Lacey, L.A.; Frutos, R.; Kaya, H.K.; Vail, P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biocontrol*, 21: 230-248.
- Lucho, A.P.R. 2004. Manejo de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em arroz irrigado. Dissertação: Mestrado. Universidade do Vale do Rio dos Sinos – São Leopoldo, RS. 73p.
- Ma, X. M.; Liu, X.X.; Ning, X.; Zhang, B.; Han, F.; Guan, X.M.; Tan, Y.F.; Zhang, Q.W. 2008. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxina Cry 1Ac and *Beauveria bassiana* on Asiatic corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *Journal Invertebrate Pathology* 99: 123-128.
- Mauch, R, Mauch-Mani, B., and Boller, T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue IH. Inhibition of fungal growth by combination of chitinase and beta-1,3-glucanase. *Plant Physiology*, 88:936-942.
- Mavingui, P., Heulin, T. 1994. *In vitro* chitinase and antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. *Soil Biology e Biochemistry*, 26:801-803.
- Melent'ev, A.I., Aktuganov, G.E., and Galimzyanova, N.F. 2001. The role of chitinase in the antifungal activity of *Bacillus* sp. 739. *Microbiology* 70: 548-552.
- Moraes, J.C.; Goussain, M.M.; Basagli, M.A.B.; Carvalho, G.A.; Ecole, C.C.; Sampaio, M.V. 2004. Silicon influence on the tritrophic interaction: wheat plants, the greenbug *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphidae), and its natural enemies *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) and *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Aphidiidae). *Neotropical Entomology* 33(5): 619-624.
- Morris, O.N. 1977. Compatibility of 27 chemical insecticides with *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Canadian Entomology* 109: 855-864.
- Novan, A. 1992. Interaction among herbivores microbial insecticides and crop plants. *Phytoparasitica* 20 (Edição suplementar).
- Petry, F.; Lozovei, A. L.; Ferraz, M. E.; Neto, L. G. S. 2004. Controle integrado de espécies de *Simulium* (Diptera, Simuliidae) por *Bacillus thuringiensis* e manejos mecânicos no riacho e nos vertedouros de tanques de piscicultura, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 48 (1): 127-132.
- Reyes-Ramírez, A., Escudero-Abarca, B.I., Aguilar-Uscanga, G., Hayward-Jones, P.M., and Barboza-Corona, J.E. 2004. Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinases and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. *Journal Food Science* 69:131-134.
- Remuska, A. C. e Pria, M. D. 2007. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. *UEPG Ciências Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.*, 13 (3): 31-36.
- Rohr, A.A. 2005. Interação de entomopatógenos com produtos fitossanitários utilizados na cultura do arroz irrigado. São Leopoldo, RS. Trabalho de conclusão de curso. Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS, 15p.
- Sabbour, M.M. 2003. Combined effects of some microbial control agents mixed with botanical extracts on some stored product insects. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 6(1):51-56.
- Saito, M.L. & Lucchini, F. 1998. Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA. 46p.
- Vendramim, J.D. 2002. O controle biológico e a resistência de plantas. In: *Controle Biológico no Brasil*. Ed. Manole: São Paulo. p. 511-528.
- Venzon, M.; Pallini, A.; Janssen, A. 2001. Interactions mediated by predators in arthropod food webs. *Neotropical Entomology* 30(1): 1-9.
- Vilela, E.F.; Pallini, A. 2002. Uso de semioquímicos no controle biológico de pragas. In: *Controle Biológico no Brasil*. Ed. Manole: São Paulo. p. 529-542.
- Woodruff, H.B. 1980. Natural products from microorganisms. *Science*, 208:1225-1229.
- Wraight, S.P.; Ramos, M.E. 2005. Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* tenebrionis based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 90: 139-150.
- Wittstock, U.; Gershenzon, J. 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 1-7.
- Zhang, J.; Wang, C.; Qin, J. 2000. The interactions between soybean trypsin inhibitor and δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera* larva. *Journal of Invertebrate Pathology* 75: 259-266.

