

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

**Desenvolvimento de sistemas de aquisição de *Bacillus thuringiensis* por
Diaphorina citri Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) para estudos de
patogenicidade**

Juliana Balbinotte

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2012**

Juliana Balbinotte
Bacharel em Ciências Biológicas

Desenvolvimento de sistemas de aquisição de *Bacillus thuringiensis* por *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) para estudos de patogenicidade

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010

Orientador:
Prof. Dr. **JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

Piracicaba
2012

RESUMO

Desenvolvimento de sistemas de aquisição de *Bacillus thuringiensis* por *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) para estudos de patogenicidade

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria entomopatogênica utilizada como biopesticida contra insetos, principalmente Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, e na produção de organismos geneticamente modificados. Com a descoberta da capacidade de Bt se movimentar sistemicamente em plantas, potencialmente atingindo insetos sugadores, surge uma nova possibilidade para o controle de *Diaphorina citri* Kuwayama, que transmite bactérias associadas ao *Huanglongbing*, uma séria doença da citricultura. O objetivo do trabalho foi desenvolver sistemas de aquisição de Bt por *D. citri*, *in vitro* e *in planta*, para estudos de patogenicidade. Uma estirpe de Bt transformada com o gene *green fluorescent protein* (Btk-*gfp*), cultivada em meio NYSM, foi usada como marcador de aquisição pelo inseto e movimentação nas plantas. Para o sistema de aquisição *in vitro*, selecionaram-se dietas com base na sobrevivência e atividade alimentar de *D. citri*. Btk-*gfp* foi adicionada à dieta selecionada, composta por uma solução de sacarose a 30% em água mineral com corantes alimentícios (verde 0,1% e amarelo 0,4%). A dieta foi acondicionada em um sachê formado por duas membranas de Parafilm®, sobre a parte inferior de uma placa de Petri de 40 mm de diâmetro (gaiola de alimentação). Dez insetos foram confinados em cada gaiola para períodos de acesso à aquisição (PAA) de até 48 h, estabelecendo-se 10 gaiolas por tratamento; como controle, utilizou-se a dieta sem Btk-*gfp*. Para testes de aquisição *in planta*, suspensões de Btk-*gfp* foram inoculadas em ramos novos cortados e no solo, próximo à haste de *seedlings* de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e de murta [*Murraya paniculata* (L.) Jack], e em diferentes concentrações, avaliando-se a movimentação da bactéria após um período de 48 h. Posteriormente, adultos e ninfas de *D. citri* foram confinados nestas plantas para avaliar a aquisição de Btk-*gfp*, usando-se plantas inoculadas apenas com água como controle. Para os bioensaios de patogenicidade a *D. citri*, 21 estirpes de Bt foram testadas no sistema de aquisição em ramos cortados de murta e 5 estirpes em ramos cortados de laranja para ninfas de 3º. ínstar. *In vitro*, testaram-se 3 estirpes contra ninfas de 3º. ínstar e 9 contra adultos. Bt-*gfp* foi absorvido pelas raízes e ramos novos cortados de *seedlings* de laranja doce e de murta, e translocado até as folhas, mostrando movimentação sistêmica. Esta estirpe foi adquirida por adultos e ninfas de *D. citri* que se alimentaram nos ramos novos cortados, mantidos em suspensão bacteriana. O sistema de alimentação *in vitro* permitiu a aquisição de Bt-*gfp* (*pellet* ressuspendido na dieta de sacarose com corantes) por adultos de *D. citri* com apenas 12 h de PAA, mas 30 h é um período ótimo para exposição do inseto ao sistema. Nenhuma das nove estirpes testadas no sistema *in vitro* foi patogênica aos adultos de *D. citri*. Das 21 estirpes testadas contra ninfas de 3º. ínstar em ramos novos de murta, cinco causaram mortalidade de 24 a 45%, em 5 dias. Essas cinco estirpes também foram testadas contra ninfas de ramos de citros cortados, causando mortalidade de 35 a 75% em 48 h.

Palavras-chave: *Huanglongbing*; inseto vetor; Psilídeo-asiático-dos-citros; Entomopatógeno; Bt; Bioensaios; Dieta artificial

ABSTRACT

Development of acquisition systems of *Bacillus thuringiensis* by *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) for pathogenicity studies

Bacillus thuringiensis (Bt) is an entomopathogenic bacterium widely used as a biopesticide against insect pests, mainly Coleoptera, Lepidoptera and Diptera, or for engineering genetically-modified plants. The recent finding that Bt is able to move systemically within plants, potentially targeting piercing-sucking insects, suggests that the bacterium may be effective for microbial control of *Diaphorina citri* Kuwayama, the vector of *Huanglongbing*-associated bacteria, a serious citrus disease. The goal of this research was to develop *in vitro* and *in planta* acquisition systems of Bt by *D. citri* for pathogenicity assays. A transformed Bt strain with the green fluorescent protein gene (Btk-*gfp*), grown in NYSM medium, was used as a marker to demonstrate bacterial acquisition by the insect and movement within the plants. Artificial diets were selected for the *in vitro* acquisition system based on insect survival and feeding activity. Btk-*gfp* was added to the selected diet, a 30% sucrose solution in mineral water with green (0.1%) and yellow (0.4%) food coloring. The diet was placed inside a Parafilm® membrane sachet, covering the opening of the lower half of a 40-mm diameter culture plate, and forming the feeding cage. Ten *D. citri* adults or nymphs were introduced in each cage and allowed acquisition access periods (AAP) of up to 48 h on the diet; as a control, a diet without Btk-*gfp* was used. For testing the *in planta* acquisition system, Btk-*gfp* suspensions were inoculated in young stem cuttings or in the soil, near the stem of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and *Murraya paniculata* (L.) Jack seedlings, as well as in different concentrations, and bacterial movement was assessed after 48 h; plants inoculated with water were used as controls. *D. citri* adults and nymphs were confined on inoculated plants to verify Btk-*gfp* acquisition. In pathogenicity assays, 21 Bt strains were tested against 3rd instars of *D. citri* using the acquisition system with stem cuttings of *M. paniculata* and 5 strains were tested using citrus stem cuttings. The *in vitro* acquisition system was used to test pathogenicity of 3 and 9 Bt strains against 3rd-instar nymphs and adults, respectively. Bt-*gfp* absorbed by roots or young stem cuttings of inoculated *C. sinensis* and *M. paniculata* was detected in the leaves, showing systemic movement. Bt-*gfp* was isolated from groups of nymphs and adults that were fed on inoculated stem cuttings or on artificial diets with bacterial suspension, showing that both *in planta* and *in vitro* acquisition take place. *D. citri* adults can acquire Bt-*gfp* within 12 h of AAP to the artificial diet with bacterium inoculum, but 30 h is the optimum AAP. None of the nine Bt strains assayed *in vitro* were pathogenic to *D. citri* adults. Of 21 strains tested for pathogenicity against nymphs using inoculated stem cuttings of *M. paniculata*, five caused mortality rates varying from 24 to 45% mortality within 5 days. These five Bt strains were also tested against *D. citri* nymphs using young stem cuttings of *C. sinensis*, causing mortality rates of 35 to 75% within 48 h.

Keywords: *Huanglongbing*; Insect vector; Asian citrus psyllid; Entomopathogen; Bt; Bioassays; Artificial diet

1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças que ocorrem nos citros, o *Huanglongbing* (HLB) é uma das mais destrutivas. O primeiro relato científico sobre o HLB foi registrado em 1919, que descreveu na China a doença do ramo amarelo ('yellow shoot') dos citros (BOVÉ, 2006). A partir deste, a doença foi descrita em muitos outros países dos continentes Asiático e Africano, na Oceania e, mais recentemente, no início do século 21, no continente Americano, inclusive nos dois principais centros produtores de citros, Brasil (São Paulo) e Estados Unidos (Flórida) (GOTTWALD, 2010). Em um levantamento feito em 2011 pelo Fundo de Defesa da Citricultura, o HLB atingiu 3,8% das plantas e 53,3% dos talhões do Estado de São Paulo (FUNDECITRUS, 2011).

HLB é uma doença associada a bactérias restritas ao floema pertencentes ao gênero "*Candidatus Liberibacter*". Três espécies são descritas, incluindo "*Candidatus Liberibacter asiaticus*", "*Candidatus Liberibacter africanus*" e "*Candidatus Liberibacter americanus*" (BOVÉ, 2006; TEIXEIRA et al., 2005). A transmissão destes microrganismos se dá por meio de um inseto sugador, o psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), ao se alimentar da seiva contida nos vasos do floema das plantas (BOVÉ, 2006). Embora relatado no Brasil há várias décadas, presença do psíldeo *D. citri* nos pomares de citros tem gerado grande preocupação somente nos últimos anos, a partir da detecção das bactérias "*Candidatus L. americanus*" e "*Candidatus L. asiaticus*" nas principais regiões citrícolas do Estado de São Paulo em 2004 (COLLETA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005).

Uma das principais formas de se manejar a doença é mediante o controle do vetor, principalmente por meio da aplicação de inseticidas, além do manejo cultural e uso de agentes de controle biológico (FUNDECITRUS, 2011). A principal forma de controle biológico de *D. citri* nos países afetados pelo HLB tem sido a utilização do parasitoide *Tamarixia radiata* (Waterson) (Hymenoptera: Eulophidae) em programas de controle biológico clássico (TORRES et al., 2006). Testes com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* mostraram resultados promissores para o controle microbiano de *D. citri* (PADULLA; ALVES, 2009). Entretanto, o controle desse inseto vetor tem sido feito quase que exclusivamente de forma química no Estado de São Paulo, envolvendo aplicações freqüentes de inseticidas em grandes áreas.

O uso constante e de maneira indiscriminada de agroquímicos, impossibilita a implementação de um programa de manejo integrado, principalmente devido a casos de

resistência de pragas a agroquímicos, além do impacto sobre os agentes de controle biológico (GEORGHIU, 1983; CROFT, 1990). Portanto, torna-se imperativo o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de *D. citri* para reduzir o uso sistemático de inseticidas em pomares de laranja, principalmente por meio de agentes de controle biológico.

De modo geral, o controle microbiano tem sido pouco explorado como alternativa para o manejo de *D. citri*, devido ao número reduzido de estudos a respeito da ação de entomopatógenos sobre este inseto. O produto microbiano mais conhecido para controle de insetos é produzido com *Bacillus thuringiensis* (SILVA; FAY, 2004), sendo responsável por 90-95% do mercado de bioinseticidas no mundo (VALADARES-INGLIS et al., 1998). Os bioinseticidas formulados a partir de *B. thuringiensis* são mais comumente usados no combate a insetos da ordem Lepidoptera, porém, também têm sido utilizados para outras ordens, tais como Diptera e Coleoptera (MONNERAT; BRAVO, 2000).

B. thuringiensis é uma bactéria, aeróbica, gram-positiva, da família Bacillaceae, que se caracteriza pela produção de inclusões protéicas cristalinas (proteínas Cry) durante a fase de crescimento, quando inicia a esporulação. Esta observação levou ao desenvolvimento de bioinseticidas e de plantas transgênicas baseados em *B. thuringiensis* como forma de controle microbiano. O modo de ação das proteínas Cry tem sido extensivamente estudado. Após a ingestão de cristais e esporos da bactéria, ocorre a solubilização dessas proteínas no suco digestivo do inseto, geralmente em pH alcalino (FCHERLES, 2000). Em seguida, ocorre a ativação proteolítica da protoxina, principalmente por serino-proteínases (FEDERICI, 1990). Finalmente, a proteína ativa se liga a receptores de membrana específicos, causando a permeabilização da membrana e, conseqüentemente, a perda do suco digestivo, paralisia e morte do inseto por inanição e septicemia (RABINOVITCH et al., 2000; MONNERAT; BRAVO, 2000).

Monnerat et al. (2009), ao realizarem inoculações de estirpes de *B. thuringiensis* em plântulas de algodão e couve, observaram um comportamento sistêmico da bactéria e detectaram mortalidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) que se alimentaram destas plantas. Na tentativa de se ampliar o espectro de ação de *B. thuringiensis* para outras ordens de insetos, Melatti et al. (2010) descobriram que algumas estirpes de *B. thuringiensis* causam mortalidade no pulgão do algodoeiro *Aphis gossypii* Glover quando inoculadas em folhas cortadas de algodão.

A descoberta de que algumas estirpes de *B. thuringiensis* são patogênicas a afídeos e podem se movimentar sistemicamente em plantas abriu caminho para uma nova abordagem de controle microbiano com *B. thuringiensis*, enfocando outros insetos fitófagos sugadores que se alimentam no sistema vascular de plantas. A presente pesquisa representa um primeiro passo para se investigar o potencial de *B. thuringiensis* como agente de controle microbiano de *D. citri*, tendo como principal objetivo estabelecer métodos de aquisição oral da bactéria pelo inseto com a utilização de sistemas de alimentação *in vitro* e *in planta*, para estudos de patogenicidade. Objetivou-se, também, realizar uma avaliação inicial de estirpes de *B. thuringiensis* quanto à patogenicidade a ninfas e adultos de *D. citri*, utilizando-se os métodos de aquisição bacteriana desenvolvidos.

5 CONCLUSÕES

- ✓ O sistema de alimentação *in vitro*, composto pela parte inferior de uma placa de Petri de 40 mm de diâmetro e coberto por duas membranas de Parafilm® contendo dieta artificial, é adequado para aquisição de *Bacillus thuringiensis* (Bt) por *Diaphorina citri* Kuwayama.
- ✓ Dentre seis dietas artificiais avaliadas, a dieta de sacarose (30%) e corantes alimentícios (verde 0,1% e amarelo 0,4%) em água mineral proporcionou maior atividade alimentar e sobrevivência de adultos de *D. citri*.
- ✓ A centrifugação do cultivo final de Bt e ressuspensão do *pellet* na dieta de sacarose com corantes é a forma mais adequada para oferecer a bactéria a *D. citri* em ensaios de aquisição *in vitro*.
- ✓ Em 12 h, adultos de *D. citri* adquirem Bt no sistema de alimentação *in vitro*. Considerando-se as taxas de sobrevivência e atividade alimentar do inseto e de recuperação de células de Bt em seu corpo, estima-se que 30 h seja um período ótimo para exposição de *D. citri* ao sistema *in vitro*.
- ✓ Em bioensaios de aquisição *in vitro*, as estirpes de Bt denominadas Btk-*gfp*, S76, S16, S34, S4, S3, S96, S2 e S97 não são patogênicas aos adultos de *D. citri*.
- ✓ Bt-*gfp* é absorvido pelas raízes ou ramos novos cortados de *seedlings* de laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] cv ‘Pera’ e de murta [*Murraya paniculata* (L.) Jack], e translocado até as folhas.
- ✓ Adultos e ninfas de 3º. ínstar de *D. citri* adquirem Bt-*gfp* em ramos novos de laranja-doce e de murta cuja base foi cortada e mergulhada em suspensão de inóculo dessa bactéria.
- ✓ Em bioensaios de aquisição de Bt em ramos cortados de murta, observou-se mortalidade de ninfas de *D. citri* para as estirpes S89, S50, S2 e S1.

- ✓ Em bioensaio de aquisição de Bt em ramos cortados de citros, observou-se maior mortalidade de ninfas de *D. citri* para as estirpes S89 e S2.

REFERÊNCIAS

- AKEY, D.H.; BECK, S.D. Continuous rearing of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, on a holidic diet. **Annals of the Entomological Society of America**. College Park, v. 64, p.353-356, 1971.
- ARONSON, A.I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiological Review**, Washington, v. 50, p. 1-24, 1986.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE CITROS. Disponível em: <[http:// www.abecitrus.com.br](http://www.abecitrus.com.br)>. Acesso em: 17 de março de 2011.
- AUBERT, B. *Trioza erytreae* (del Guercio) and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, Paris, v. 42, p. 149-162, 1987.
- AZEVEDO, J.L. Engenharia genética aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S.B.(Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, v.1, p. 239 - 267.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr, W.; ARAUJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. cap. 8, p. 233-268.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr, W.; PEREIRA, J.O.; ARAUJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, p. 40-65, 2000.
- BEEGLE, C.B.; YAMAMOTO, T. Inovation paper (C.P. Alexander Fund): Hestory of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **The Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 124, p. 587-616, 1992.
- BEGAMANN, E.C.; FERNANDES, S.C.S.; FARIA, A.M. Surto de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae), em pomares cítricos no estado de São Paulo. **Biológico**, São Paulo, v. 56, p. 22-25, 1994.
- BENINTENDE, G.; GLEN, A.; IBARRA, J.; BRAVO, A.; ESPINOSA, A. *Bacillus thuringiensis*: aislamiento, crecimiento y conservacion de estas bacterias. In: BRAVO, A.; ARRIETA, G.; BENINTENDE, G.; REAL, M.; ESPINOZA, A.M.; IBARRA, J.; MONNERAT, R.; ORDUZ, S.; SOBERÓN, M. **Metodologias utilizadas en investigación sobre bacterias entomopatógenas**. México: UNAM, 2001.
- BOINA, D.R.; ONAGBOLA, E.O.; SALYANI, M.; STELINSKI, L.L. Antifeedant and sublethal effects of imidacloprid on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 65, p. 870-877, 2009.
- BONANI, J.P.; FERERES, A.; GARZO, E.; MIRANDA, M.P.; APPEZZATO-DAGLORIA, B.; LOPES, J.R.S. Characterization of electrical penetration graphs of the

- Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Amsterdam, v. 134, p. 35–49, 2010.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing *Huanglongbing*: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, Bari, v. 88, p. 7-37, 2006.
- BRADLEY, R.H.E. Effect of depth of stylet penetration on aphid transmission of potato virus Y. *Canadian Journal of Microbiology*. Ottawa, v. 2, p. 539-547, 1956.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F. J.; GUADALUPE, P.; NUNEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of Cry genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 64, p. 4965-4972, 1998.
- BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F.; GONI, I. Effects of dietary fibre and tannins from Apple pulp on the composition of faeces in rats. *British Journal of Nutrition*, London. v. 67, p. 463-473, 1992.
- CAPOOR, S.P.; RAO, D.G.; VISWANATH, S.M. Greening disease of citrus in the Deccan Trap Country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama, In: Weathers, L.G.; Cohen, M. (Eds.). In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL CITRUS VIROLOGY, 1974, Davis. **Proceedings...** Davis: University of California, Division of Agricultural Sciences, 1974. p. 43-49
- CERÓN, J. Productos comerciales: nativos y recombinantes. In: BRAVO, A.; CERÓN, J. (Ed.). *Bacillus thuringiensis en el control biológico*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2004. p. 123-147.
- CHALFIE M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD W.; PRASHER D. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, Washington, v. 263, p.802- 805. 1994.
- CHARLES, J.F.; DE BARJAC, H. Action des cristaux de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur l'intestin moyen des larves de *Aedes aegypti* L., en microscopie électronique. *Annals of . Microbiology*, Paris, p. 197-218, 1983.
- CHENG L.; DU, C.; MURRAY, D. A GFP reporter system to assess gene transfer and expression in human hematopoietic progenitor cells. *Gene Ther*, New York, v. 4, p. 1013-22. 1997.
- CHIEN, C. C.; CHU, Y. I. Biological control of citrus psyllid, *Diaphorina citri* in Taiwan. *Biological Pest Control in Systems of Integrated Pest Management*, Taipei, p. 93-105, 1996.
- COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU Jr, J.; MACHADO, M.A.; AMARAL, A.M. do; MULLER, G.W. First report of the casual agent of Huanglongbing *Huanglongbing* (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 88, p. 1382, 2004.
- COSTA LIMA, A.M. *Insetos do Brasil*. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1942. 326 p. (Série Didática, 3: Homoptera, v. 3, n. 4).

DAÍ, S.M.; GILL, S.S. In vitro and in vivo proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis CRYIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 23, p. 273-283, 1993.

DAVIDSON, E.W.; PATRON, R.B.R.; LACEY, L.A.; FRUTOS, R.; VEY, A.; HENDRIX, D.L. Activity of natural toxins against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*, using a novel feeding bioassay system. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. Dordrecht, v. 79, p. 25-32, 1996.

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

DIAS, J.M.C.S. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 59-76, 1992.

DU, C.; NICKERSON, K. W. *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized Cry 1Ac toxin: physiological and pathogenic consequences. **App. Environ. Microbiol.**, Washington DC, v. 63, p. 3722-3726, 1996.

ESCOBAR, M.R.; GONÇALVES, J.S.; CARDOSO, J.L. Diferenças e similaridades entre os segmentos do complexo citrícola paulista. **Agricultura em São Paulo**, São Paulo, v. 46, p. 59-88, 1999.

FARKAS, J.; SEBESTA, K.; HORSKA, K.; SAMEK, Z.; DOLIJS, J.; SORM, F. The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. gelechiae. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, Praha, v. 34, p. 1118-1120, 1969.

FAUST, R. M.; BULLA JR., L. A. 1982. Bacteria and their toxins as insecticides, p. 75-208. In: E. Kurstak (ed.), **Microbial and Viral Pesticides**, Marcel Dekker, 720 p.

FEITELSON, J.S. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 27., 1994. **Proceedings...** p. 184.

FERNANDES, M.X. Como brilha a proteína verde fluorescente. **Revista Ciência Hoje**. Disponível em: <<http://cienciahoje.pt/index.php?oid=28008&op=all>> Acesso em: 19 set. 2011.

FUNDECITRUS. Disponível em <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 15 set. 2011.

GEORGHIOU, G. P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIOU, G. P. & SAITO, T (eds.), **Pest resistance to pesticides**. New York, 1983, p. 769-792.

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAM, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley, 2000. 350 p.

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

- GUBIN, A.N.; REDDY, B.N.; JOROGÉ, J.M.; MILLER, J.L. Long-term, stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells. **Biochemical and Biophysics Research Communications**, Orlando, v. 236, p. 347-350, 1997.
- HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998, p. 383-446.
- HALBERT, S.E.; NUNEZ, C.A. Distribution of the asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Rynchoa: Psyllidae) in the Caribbean basin. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, p. 401-402, 2004.
- HALL, D.G.; SHATTERS, R.G.; CARPENTER, J.E.; SHAPIRO, J.P. Research toward an artificial diet for adult asian citrus psyllid. **Annals of the Entomological Society of America**. Lexington, v. 103, p. 611-617, 2010.
- HAMILTON, M.A. Notes on the culturing of insects for vírus work. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 17, p. 487-492, 1930.
- HANSEN, B.M., SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 41-64.
- HODKINSON, I.D. The biology of the Psylloidea (Homoptera): a review. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 64, p. 325-339, 1974.
- HOFFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, J.; VAN RIE, J.; JANSSENS, H.; HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal pritein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, New York, v. 53, p. 241-255, 1989.
- HOY, M.A.; NGUYEN, R. Classical biological control of Asian citrus psylla. **Citrus Industry**, Tampa, v. 81, p. 48-50, 2001.
- HUANG, J.; LOU, X.; HUANG, B.; YAO, X. Studies on citrus psylla *Diaphorina citri* Kuwayama and its control. Entomological. **Journal of East China**, Shanghai, v. 8, p. 26-34, 1999.
- JANCOVICH, J.K.; DAVISON, E.W.; LAVINE, M.; HENDRIX, D.L. Feeding chamber and diet for culture of nymphal *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). **Journal of Economic Entomology**. Lanham, v. 90, p. 628-633 1997.
- JOHNSON, D.E.; McGAUGHEY, W.H. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores do toxicity of purified Cry proteins towards indianmeal moth larvae. **Current Microbiology**, New York, v. 33, p. 54-59, 1996.
- KNOWLES, B.H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v. 24, p. 275-308, 1994.
- KNOWLES, B.H.; ELLAR, D.J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 924, p. 509-518, 1987.

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

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

LECHNER, M.; KUPKE, T.; STEFANOVIC, S.; GÖTZ, F. Molecular characterization and sequence of phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 3, p. 621-626, 1989.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M.-M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: **ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S.; (ed) *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wilwy, 1993. p. 37-69.

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

LOGUERCIO, L.; CARNEIRO, P.N.; CARNEIRO, A.A. Milho Bt. Alternativa biotecnológica para controle biológico de insetos-praga. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 24, p. 46-52, 2002.

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

MELLAERT, J. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 85, p. 7844-7848, 1998.

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

MITTLER, T.E.; DADD, R.H. Artificial feeding and rearing of the aphid, *Mizus persicae* (Sulzer), on a completely defined synthetic diet. **Nature**, London, v.195, 404 p., 1962.

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

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L.

(Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 3, p. 163-200.

MONNERAT, R.G.; PRAÇA, L.B. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. In OLIVEIRA-FILHO, E.C.; MONNERAT, R.G. **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2006. p. 121-155.

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

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

NAKANO, O.; LEITE, C.A.; FLORIM, A.C.P. Controle químico do psilídeo dos citros, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Laranja**, Cordeirópolis, v. 20, p. 319-328, 1999.

NARDO, E.A.B.; CAPALBO, D.M.F. Utilização de agentes microbianos de controle de pragas: mercado, riscos e regulamentações. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. v. 1, p. 231-262.

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

NESTER, E.; THOMASHOW, L.S.; METZ, M.; GORDON, M. **100 years of *Bacillus thuringiensis*: a critical scientific assessment**. 2002. Disponível em <<http://www.asmusa.org>>. Acesso em: 14 abr. 2011.

NEVES, E.M. Efeitos alopativos na citricultura: um comparativo entre anos de crise e de euforia. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 24, p. 1-17, 2003.

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

ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS. **Proceedings**. University of California. 1974. v. 6, p. 43-49.

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

PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 62-76, 20002.

- PEREIRA, R.M.; ALVES, S.B.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; MACEDO, N. Utilização de entomopatógenos no manejo integrado de pragas. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 1097-1118.
- POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, p. 1-10, 2003.
- POLANCZYK, R.A. **Estudo de *Bacillus thuringiensis* Berliner Visando ao Controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**. 2004. 145 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- PORCAR, M.; GRENIER, A. M.; FEDERICI, B.; RAHBÉ, Y. Effects of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxins on the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 4897-4900, 2009.
- RABINOVITCH, L.; SILVA, C.M.B.; ALVES, R.S. Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus* entomopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 2, p. 17-90.
- RAPUSSI, M.C.; FERREIRA, C.; ESTEVES, M.B.; NASCIMENTO, F.E.; GONÇALVES, R.S.; COLETTA-FILHO, H.D.; LOPES, J.R.S. Latent period of “*Candidatus Liberibacter Asiaticus*” in *Diaphorina citri*. In: HEMIPTERAN-PLANT INTERACTIONS SYMPOSIUM, 2011, Piracicaba. **Proceedings...** 1 CD ROM.
- RAVOAHANGIMALALA, O.; CHARLES, J.F.; SCHOELLER-RACCAUD, Y.J. Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar istaelensis toxin in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). **Research in Microbiology**, Paris, v. 44, p. 271-278, 1993.
- SAS INSTITUTE. **SAS system**: SAS/STAT version 9.1. Cary, 2003.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, p. 775-806, 1998.
- SILVA, C. M. M. D.; FAY, E. F. Agrotóxicos: aspectos gerais. In: **Agrotóxicos e Ambiente**. Brasília: Embrapa informação, 2004. Cap 1, p. 17-73.
- SKELLEY, L. H.; HOY, M. A. A synchronous rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoides in quarantine. **Biol. Control**, Londrina, v. 29, p. 14-23, 2004.
- SOARES, C. M. S.; MONNERAT, R. G.; LOPES, H. R. D.; SCHENKEL, R. M. Uso de *Bacillus thuringiensis* no combate às pragas da lavoura. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento; Delegacia da agricultura e abastecimento do Governo do Distrito Federal; Secretaria da Agricultura, pecuária e abastecimento do Governo Federal; EMATER-DF; Fundação Dalmo Giacometti; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Bthek Biotecnologia. **Circular técnica**. 10p. 2004.

SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* y SUS toxinas insecticidas. Disponível em: <[http:// biblioweb.dgsca.unam. mx/libros/micróbios/cap12/](http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/micróbios/cap12/)>. Acesso em: 13 jun. 2011.

SOBRAL, J. K. **A comunidade endofítica e epifítica de soja (*Glicine max*) e estudo da interação endófito-planta**. 2003. 189 p. Tese (Doutorado em Ciências em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

TEIXEIRA, D.C., DANET, J.L., EVEILLARD, S., MARTINS, E.C., JESUS JUNIOR. W.C., YAMAMOTO, P.T., LOPES, S.A., BASSANEZI, R.B., AYRES, A.J., SAILLARD, C., BOVÉ, J.M. Citrus huanglongbing *Huanglongbing* in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the *Candidatus Liberibacter* species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 19, p. 173-179, 2005.

TESTER, C.F. Influence of a genetically modified endophytic bacterium on composition and decomposition of corn residue. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 24, p. 1107-1112, 1992.

TORRES, M.G.T.; NAVA, D.E.; GRAVENA, S.; COSTA, V.A. ; PARRA, J.R.P. Registro de *Tamarixia radiata* (Waterrston) (Hymenoptera: Eulophidae) em *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em São Paulo, Brasil. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, p. 112-117, 2006.

TSAI, J.H.; LIU, Y.H. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, p. 1721-1725, 2000.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **R.E.D. Facts, *Bacillus thuringiensis***: EPA-738-F-98-001. 1999. 6 p.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SHILER, W.; SOUZA, M. T. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. v. 1, p. 201-230

VAN FRANKENHUYZEN, K. Application of *Bacillus thuringiensis* in forestry. In: CHARLES, J.C.; DELECLUSE, A.; LEROUX, N.C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Amsterdam: Kluwer, 2000. p. 371-382,

VAN RIE. *Bacillus thuringiensis* and its use transgenic insect control technologies. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 290, p. 463-469, 2000.
WARD, W.W. Biochemical and physical properties of green fluorescent protein. In: CHALFIE, M.; KAIN, S. **Green fluorescent protein: properties, applications and protocols**. New York: Wiley-Liss, 1998. p. 45-75.

WEISER, J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in Eastern Europe and in Soviet Union. **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem Heft**, Berlin, v. 233, p. 37-50, 1986.

World Health Organization. Environmental health criteria for *Bacillus thuringiensis*, 1987. Disponível em <<http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/en/EHC217.PDF>> acesso em 21 de jul. 2011.

YAMAMOTO, P.T.; FELIPPE, M.R.; GARBIM, L.F.; COELHO, J.H.C.; MARTINS, E.C.; LEITE, A.P.R.; SOUSA, M.C.; ABRAHÃO, D.P.; BRAZ, J.D. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): Vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. In: HUAGLONGBING – GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 2006. **Proceedings...** p. 18.

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

YU, C.G.; MULLINS, M.A.; WARREN, G.W.; KOZIEL, M.G.; ESTRUCH, J.J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 532-536, 1997.