

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MOLÉCULA ATIVA,
PERTENCENTE AO GÊNERO *Burkholderia*, COM POTENCIAL
PARA TORNAR-SE UM NOVO PRODUTO NO CONTROLE
BIOLÓGICO**

Luis Ángel Chicoma Rojas
Engenheiro Agrônomo

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MOLÉCULA ATIVA,
PERTENCENTE AO GÊNERO *Burkholderia*, COM POTENCIAL
PARA TORNAR-SE UM NOVO PRODUTO NO CONTROLE
BIOLÓGICO**

Discente: Luis Ángel Chicoma Rojas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Coorientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)

R741i

Rojas, Luis Angel Chicoma

Identificação e caracterização de molécula ativa, pertencente ao gênero *Burkholderia*, com potencial para tornar-se um novo produto no controle biológico / Luis Angel Chicoma Rojas. -- Jaboticabal, 2023
87 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Coorientadora: Manoel Victor Franco Lemos

1. Controle biológico. 2. Metabolitos secundarios. 3. Spodoptera spp.. 4. Fungos fitopatogenicos. 5. Cromatografia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MOLÉCULA ATIVA, PERTENCENTE AO GÊNERO Burkholderia, COM POTENCIAL PARA TORNAR-SE UM NOVO PRODUTO NO CONTROLE BIOLÓGICO

AUTOR: LUIS ANGEL CHICOMA ROJAS

ORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), área: Microbiologia Agropecuária pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO (Participação Virtual)
ViceDiretoria / FCAV UNESP Jaboticabal

Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS (Participação Virtual) Santos:16903009817
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Jaboticabal, 03 de agosto de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Luis Ángel Chicoma Rojas, nascido em 14 de maio de 1996 na cidade de Trujillo, Departamento de La Libertad - Peru. Iniciou o curso de Engenharia Agrônômica em 2013 na Universidad Privada Antenor Orrego (UPAO), foi monitor das disciplinas de Química Geral e Fisiologia Vegetal, também foi membro do Grupo de Pesquisa em Controle Biológico e do Laboratório de Proteômica, Enzimas e Metabólitos Ativos. Realizou estágio no Laboratório de Entomologia Agrícola e no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias - UPAO, além de estágio obrigatório na empresa Agorindustrial UPAO S.A.C. na área de pesquisa e desenvolvimento. Em 2018 fez estágio internacional por dois anos no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas - UNESP/FCAV, em seguida iniciou o mestrado no programa de Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), no mesmo laboratório, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Marleni e Cesar, minha querida irmã Amanda e meus avós, Amanda, Pochito, Luis; (*in memorian*), e Amelia, aos quais certamente jamais serei capaz retribuir todo o apoio, incentivo e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Dr^a. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, por sua orientação, gentileza, carisma e por me ensinar a seguir em frente apesar das adversidades. Eu a considero como pessoa e como cientista, e não há dúvida de que ela é um exemplo a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, pelo apoio em relação à redação científica e orientação em temas relacionados ao controle biológico.

Ao Prof. Dr. André Gonzaga Dos Santos, por abrir as portas de seu laboratório para a realização dos estudos cromatográficos, muito obrigado pela gentileza e entusiasmo com o desenvolvimento do projeto.

Ao Steven e ao Winer, por sua orientação e apoio na análise cromatográfica.

Ao técnico de laboratório, Dr. João Carlos Campanharo, por seus valiosos ensinamentos relacionados à bioquímica, biologia molecular e microbiologia, e por sua grande gentileza e disposição em ajudar.

A minha grande parceira Noelia, por ser um dos meus pilares e motivos de inspiração e admiração.

A todos os meus grandes amigos do laboratório, Ana, Tainá, Tatiane, Elizangela, Anne, Cinara, Max, Renato, Gabriela e, em especial a, Natália, Bárbara, Pâmela e minha parceira Paula, pela amizade, por compartilharem momentos felizes e pela disposição em ajudar. Vocês me proporcionaram um ambiente de trabalho muito acolhedor e familiar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da FCAV/Unesp, ao corpo docente, pelo apoio, oportunidade de realização do curso e conhecimentos transmitidos.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal pela infraestrutura e apoio fornecidos.

A todos os membros da seção de pós-graduação, por seu grande apoio, ajuda e disposição para dar orientações.

A todos os meus irmãos da República Xicrete e Bell, por sua amizade e amor. Nunca me esquecerei de nossas anedotas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E a todos os demais que, direta ou indiretamente, colaboraram para a concretização deste trabalho

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	1
1.1. Introdução	1
1.2. Revisão da literatura.....	2
1.2.1. Controle biológico.....	2
1.2.2. Mecanismos de ação dos “ <i>Biological Control Agents</i> ” (BCAs).....	3
1.2.2.1. Antibiose.....	6
1.2.2.2. Microparasitismo	7
1.2.2.3. Competição por espaço e nutrientes	8
1.2.2.4. Resistência induzida nas plantas.....	9
1.2.3. Taxonomia de <i>Burkholderia</i>	10
1.2.4. <i>Burkholderia</i> no controle de pragas e fungos fitopatogênicos	11
1.2.5. Moléculas bioativas de <i>Burkholderia</i>	12
1.3. Referências	16
2. CAPÍTULO 2 – Atividade inseticida do metabólito secundário de <i>Burkholderia</i> JBC02 contra <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith, 1797)	25
2.1. Resumo	25
2.2. Introdução	28
2.3. Materiais e Métodos	30
2.3.1. Isolado e condições de cultura	30
2.3.2. Obtenção do extrato seco do isolado JBC02	30
2.3.3. Isolamento e purificação de metabólitos secundários inseticidas.....	30
2.3.4. Biomonitoramento da atividade inseticida.....	34
2.3.5. Identificação molecular do isolado bacteriano JBC02	34
2.3.5.1. Extração e amplificação do DNA	34
2.3.5.2. Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e análise filogenética.....	35
2.4. Resultados e discussão	36
2.4.1. Sequenciamento do gene 16S rRNA e análise filogenética da cepa JBC02	36
2.4.2. Obtenção do extrato seco e análise cromatográfica	37
2.4.3. Atividade inseticida de frações cromatográficas contra <i>Spodoptera frugiperda</i>	48
2.5. Conclusões.....	51
2.6. Informações de suporte	52
2.7. Referências	53
3. CAPÍTULO 3 – Atividade antagônica de substâncias difusíveis e de compostos orgânicos voláteis (VOCs) produzido por <i>Burkholderia</i> JBC02 contra fungos patógenos de plantas.....	58

3.1.	Resumo	58
3.2.	Introdução	61
3.3.	Materiais e Métodos	63
3.3.1.	Condições de cultura	63
3.3.2.	Atividade de enzimas hidrolíticas extracelulares	63
3.3.2.1.	Atividade de Protease.....	63
3.3.2.2.	Atividade de Celulase	63
3.3.2.3.	Atividade de Amilase	64
3.3.2.4.	Atividade de Esterase y Lipase.....	64
3.3.3.	Avaliação da atividade antagônica do isolado JBC02	64
3.3.3.1.	Ensaio de cultivo dual.....	64
3.3.3.2.	Inibição do crescimento micelial por VOCs.....	65
3.3.3.3.	Ensaio de folha destacada	65
3.3.4.	Alterações ultraestruturais de fungos patogênicos de plantas	66
3.3.5.	Análise estatística.....	66
3.4.	Resultados e discussão.....	67
3.4.1.	Atividade enzimática de <i>Burkholderia</i> JBC02.....	67
3.4.2.	Atividade antifúngica de amplo espectro de <i>Burkholderia</i> JBC02	68
3.4.2.1.	Antagonismos de substâncias difusíveis.....	68
3.4.2.2.	Efeito de VOCs no crescimento micelar.....	72
3.4.3.	Análise por MEV das estruturas fúngicas	77
3.5.	Conclusão	80
3.6.	Referências	81

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MOLÉCULA ATIVA, PERTENCENTE AO GÊNERO *Burkholderia*, COM POTENCIAL PARA TORNAR-SE UM NOVO PRODUTO NO CONTROLE BIOLÓGICO

Resumo – O uso inadequado de produtos químicos para a proteção de cultivos tem consequências negativas, como danos a organismos benéficos, contaminação ambiental, desenvolvimento de resistência, afeta o ser humano, etc., portanto, há necessidade de novas alternativas para o controle de insetos-praga e patógenos de plantas. Assim, o objetivo do projeto foi isolar/purificar metabólitos secundários produzidos pela *Burkholderia* JBC02 com atividade inseticida sobre *Spodoptera frugiperda*, bem como estudar os mecanismos diretos de biocontrole da antibiose por meio de substâncias difusíveis e liberação de compostos orgânicos voláteis (VOCs) sobre diferentes fungos fitopatogênicos. Foram usadas técnicas de cromatografia (SPE, TLC, HPLC) e monitoramento bioguiado para o isolamento de metabólitos secundários. Os ensaios de cultura dupla e de placa sobreposta foram usados para estudar o efeito inibitório das substâncias difusíveis e dos VOCs em oito fungos fitopatogênicos. A atividade antagonista do isolado bacteriano foi corroborada pela visualização das estruturas miceliais dos fungos por microscopia eletrônica de varredura (SEM). Foram obtidas por separação em HPLC oito frações com potencial atividade inseticida, sendo que a fração 2 apresentou 100% de mortalidade; em relação à atividade antagônica, todos os fungos foram inibidos, com valores acima de 50% de inibição e observou-se que os micélios estavam desidratados, com anomalias e superfícies rugosas. Os resultados demonstram que o isolado bacteriano *Burkholderia* JBC02 possui função multivalente e tem potencial para ser um novo agente de controle biológico e, assim, ser utilizado para o desenvolvimento de biopesticidas.

Palavras-chave: controle biológico, *Burkholderia*, antagonismo, bioinseticida, atividade antifúngica

Abstract – The inappropriate use of chemical products for crop protection has negative consequences, such as damage to beneficial organisms, environmental contamination, development of resistance, affects humans, etc., therefore, there is a need for new alternatives for the control of insect pests and plant pathogens. Thus, the objective of the project was to isolate/purify secondary metabolites produced by *Burkholderia* JBC02 with insecticidal activity on *Spodoptera frugiperda*, as well as to study the direct mechanisms of biocontrol of antibiosis using diffusible substances and release of volatile organic compounds (VOCs) on different phytopathogenic fungi. Chromatography techniques (SPE, TLC, HPLC) and bioguided monitoring were used for the isolation of secondary metabolites. Dual culture and overlay plate assays were used to study the inhibitory effect of diffusible substances as well as VOCs on eight phytopathogenic fungi, the antagonistic activity of the bacterial isolate was corroborated by visualizing mycelial structures of the fungi by scanning electron microscopy (SEM). Eight fractions were isolated with potential insecticidal activity, being fraction 2 the one that showed 100% mortality; about the antagonistic activity, all fungi were inhibited, registering values higher than 50% inhibition and it was observed that the mycelia were dehydrated, with anomalies and rough surface. The results show that the bacterial isolate *Burkholderia* JBC02 presents a multivalent function having the potential to be a new Biological Control Agent and thus be used for the development of biopesticides.

Keyword: *biological control, Burkholderia, antagonism, bioinsecticide, antifungal activity*

1. CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1. Introdução

Os agentes de controle biológico bacteriano desempenham um papel fundamental na proteção das plantas contra insetos-praga e patógenos. Sua importância está na capacidade de suprimir com eficácia as populações de pragas e reduzir o impacto dos patógenos nas plantações. Ao contrário dos pesticidas químicos, os agentes de controle biológico são seguros para o meio ambiente e para os seres humanos, o que os torna uma alternativa sustentável e favorável à biodiversidade (He et al., 2021).

Os agentes de controle biológico bacteriano usam uma variedade de mecanismos de ação para combater insetos-praga e patógenos de plantas. Algumas bactérias produzem toxinas ou compostos bioativos que são tóxicos para os insetos ou inibem o crescimento de patógenos. Outras bactérias podem competir diretamente com insetos ou patógenos por nutrientes ou espaço, limitando sua capacidade de sobreviver e se reproduzir. Além disso, as bactérias benéficas podem estimular as defesas naturais das plantas, fortalecendo sua resistência a pragas e doenças. Esses mecanismos combinados tornam os agentes de controle biológico bacteriano altamente eficazes no manejo integrado de pragas e doenças na agricultura (Köhl et al., 2019; Legein et al., 2020).

Entre os gêneros bacterianos que se mostraram promissores como fonte de novas moléculas bioativas para o controle de pragas de insetos e patógenos de plantas está a *Burkholderia*. Esse gênero bacteriano demonstrou a capacidade de produzir uma ampla gama de compostos bioativos com atividade inseticida e antifúngica. Essas moléculas podem agir diretamente sobre os insetos, causando danos ao seu sistema nervoso ou interrompendo seus processos biológicos essenciais. Além disso, alguns compostos bioativos da *Burkholderia* têm a capacidade de inibir o crescimento de patógenos de plantas, evitando assim a disseminação de doenças. O estudo da *Burkholderia* como fonte de novas moléculas bioativas representa uma excelente oportunidade para o desenvolvimento de estratégias de controle biológico mais eficientes e sustentáveis para a proteção de culturas agrícolas (Depoorter et al., 2016; Kunakom et al., 2019).

1.2. Revisão da literatura

1.2.1. Controle biológico

Ao longo dos anos, surgiram duas preocupações principais: por um lado, garantir a disponibilidade de alimentos suficientes para a sociedade e, por outro, reduzir a poluição ambiental global (DeBach P & Rosen D, 1991; Rajaram & Dubin, 2021). A produção agrícola pode ser significativamente reduzida devido a fatores abióticos e bióticos, como falta ou excesso de água, altas temperaturas, deficiências de nutrientes, presença de metais pesados no solo ou outros contaminantes, presença de ervas daninhas, patógenos e pragas (Oerke, 2006; Savary et al., 2019). Embora o controle químico de pragas tenha sido fundamental para a obtenção de aumentos significativos na produtividade das culturas, o uso inadequado e o abuso frequente de pesticidas químicos levaram a sérios problemas ambientais e de saúde humana, bem como ao surgimento de insetos resistentes a pesticidas (Magaña-Gómez J & Calderón de la Barca AM, 2017; Nishimoto, 2019).

O uso do controle biológico para combater pragas de insetos e patógenos de plantas é uma alternativa sustentável e eficaz que beneficia a saúde das culturas e o meio ambiente. Essa estratégia envolve o uso de organismos vivos benéficos, como insetos, bactérias, fungos e vírus, bem como a dispersão de nematoides e parasitas entomopatogênicos, e o uso de compostos e semioquímicos derivados de plantas, para controlar a disseminação de organismos prejudiciais às culturas de forma natural (He et al., 2021; Ruiu, 2015).

É importante mencionar que o controle biológico tem um impacto positivo em termos econômicos e ambientais. Do ponto de vista econômico, essa prática pode reduzir significativamente os custos associados à proteção das culturas. Ao contrário dos agroquímicos, o uso de organismos benéficos não exige gastos elevados com a compra de produtos químicos ou aplicações frequentes e pode ser implementado de forma preventiva, o que representa uma economia considerável. Em termos ambientais, o controle biológico se destaca por sua sustentabilidade e sua capacidade de promover

a conservação da biodiversidade e dos ecossistemas por ser seletivo e não prejudicial a outros seres vivos e ao meio ambiente, em comparação com os agroquímicos, que podem deixar resíduos tóxicos e poluir o solo e a água (Aloo et al., 2019; Glare et al., 2012; Kour et al., 2020).

1.2.2. Mecanismos de ação dos “*Biological Control Agents*” (BCAs)

Os agentes de controle biológico (BCAs) são organismos naturais com a capacidade de interromper o crescimento e o desenvolvimento de "organismos-alvo", como insetos pragas ou patógenos de plantas, interferindo assim em seu ciclo de vida (Corke, 1975; Raymaekers et al., 2020a). Foram identificados diferentes mecanismos de ação para a interação dos BCAs com patógenos e pragas de plantas (Figura 1). Em geral, esses mecanismos podem ser classificados como mecanismos diretos de ação, como antibiose, parasitismo e competição por nutrientes e espaço, e mecanismos indiretos, como resistência sistêmica induzida (Köhl et al., 2019; Legein et al., 2020).

A ação de biocontrole dos BCAs depende da ativação de vários mecanismos, e esses mecanismos não são mutuamente exclusivos. Da mesma forma, a capacidade de empregar um desses mecanismos varia dependendo das condições ambientais, da presença ou ausência de nutrientes, da temperatura e do pH, da praga ou do fitopatogênico, da planta hospedeira, etc. (Köhl et al., 2019a; Raymaekers et al., 2020b; Vinale et al., 2008).

Considerando a base teórica apresentada, utilização de métodos de controle biológico e inseticidas microbianos é de grande importância para o avanço dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (SDGs); assim, essas abordagens ecologicamente corretas se alinham com o ODS 2 (Fome zero e agricultura sustentável) ao proteger a produtividade agrícola por meio da supressão de insetos pragas e fitopatógenos prejudiciais às culturas, garantindo a segurança alimentar para uma população crescente. Além disso, o controle biológico contribui diretamente para o ODS 15 (Vida na Terra) ao preservar a biodiversidade e mitigar os impactos adversos dos pesticidas químicos nos ecossistemas, promovendo, assim, o gerenciamento

sustentável da terra, e apoia o ODS 12 (Consumo e produção responsáveis), reduzindo a necessidade de pesticidas sintéticos, minimizando os resíduos químicos nos alimentos e aprimorando as práticas agrícolas sustentáveis. Em resumo, a implementação dessas estratégias ecologicamente amigáveis enfatiza a importância fundamental que têm no alcançado dos ODS, atuando na conexão entre o bem-estar da humanidade e a gestão do meio ambiente.

Nesse contexto, os objetivos do presente estudo foi isolar/purificar e identificar metabólitos secundários com atividade inseticida contra a lagarta *Spodoptera frugiperda*, por meio do fracionamento bioguiado do extrato de *Burkholderia* JBC02 e, estudar o efeito antagônico *in vitro* do isolado bacteriano JBC02 por meio de substâncias difusíveis e compostos orgânicos voláteis (VOCs), e seu efeito na estrutura micelar, sobre vários fungos fitopatogênicos importância agrícola.

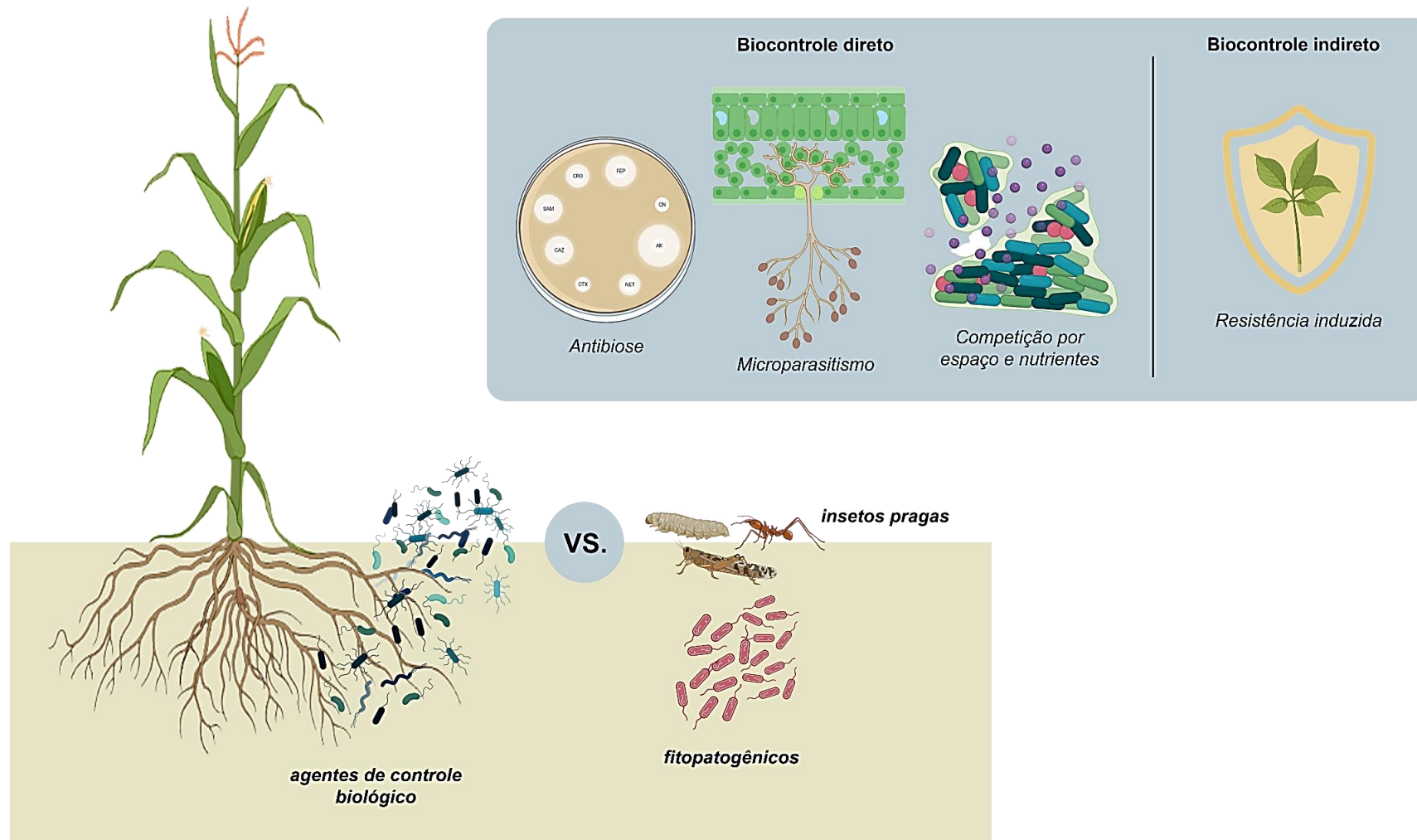


Figura 1. Mecanismos de ação dos Agentes de Controle Biológico (BCA) sobre insetos-praga e patógenos de plantas.

Imagem desenvolvida com BioRender.com

1.2.2.1. Antibiose

A antibiose, derivada do grego que significa "*contra a vida*", é comumente considerada como a capacidade de um agente de biocontrole de impedir o crescimento ou eliminar outro microrganismo por meio da geração de substâncias antibióticas que podem se difundir ou ser liberadas como compostos voláteis, mostrando uma gama de eficácia contra diferentes alvos (Hutchings et al., 2019). As espécies pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Serratia*, *Burkholderia*, dentre outras, são estudadas por sua capacidade de produzir e liberar substâncias com propriedades antibacterianas e antifúngicas (Brescia et al., 2021; M. T. Hossain et al., 2016; Meziane et al., 2006; Obagwu & Korsten, 2003; Pacios-Michelena et al., 2021; Pretorius et al., 2015; Weller, 2007).

Em estudos foi constatado que as cepas de *Pseudomonas* inibem diretamente o crescimento de uma ampla variedade de patógenos de plantas, como *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium graminearum* (Romero et al., 2016; Simionato et al., 2017). Essa atividade de biocontrole, na maioria dos casos, é atribuída às fenazinas, que são metabólitos secundários heterocíclicos produzidos por *Pseudomonas* spp. com ação antifúngica, que interferem na acetilação de histonas fúngicas e participam da formação de biofilmes nas hifas, afetando sua patogenicidade (Y. Chen et al., 2018; Guennoc et al., 2018).

Quanto ao gênero *Bacillus* spp., os agentes de controle biológico mais descritos até o momento são *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*. As cepas de *B. subtilis* apresentam uma capacidade inibitória de amplo espectro em patógenos fúngicos e bacterianos, como *Fusarium graminearum* e *Alternaria* spp. (Ali et al., 2016; J. Wang et al., 2007). A síntese de peptídeos não ribossômicos e policetídeos é a principal responsável pela atividade antipatogênica dos bacilos (Chen et al., 2009), entre os quais estão a iturina (lipopeptídeo), a fengicina (lipopeptídeo) e a surfactina (lipopeptídio); sendo que as iturinas e as fengicinas agem principalmente em fungos filamentosos, afetando as estruturas da membrana celular, e a surfactina participa da

formação de biofilmes, permitindo uma melhor colonização bacteriana e a liberação de compostos antimicrobianos (Ongena et al., 2007; Zerrouh et al., 2014).

1.2.2.2. Microparasitismo

O microparasitismo refere-se à interação de um BCA com um patógeno, causando sua morte ou matando seus propágulos. Por exemplo, temos o *Ampelomyces quisqualis*, considerado o microparasita fúngico mais estudado por sua capacidade de controlar o oídio em diferentes plantas, o *Coniothyrium minitans* que atua sobre a *Sclerotinia sclerotiorum*, afetando a viabilidade dos escleródios (Huang & Erickson, 2002), e o *Trichoderma* spp. e o *Pythium oligandrum* que afetam diferentes patógenos fúngicos de plantas (Moreno-Ruiz et al., 2020; Nofal et al., 2021).

Além dos fungos microparasitas, há também estudos de bactérias que parasitam fungos, como *Streptomyces* spp. que hiperparasitam *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria brassicicola*, etc., também a bactéria *Serratia marcescens*, que tem a capacidade de injetar fatores antifúngicos nas hifas das células fúngicas (Trunk et al., 2018; Ziedan et al., 2009).

Em adição, alguns BCAs foram descritos com comportamento predatório, caçando e matando outros organismos, principalmente por fagocitose e sob condições limitadas de nutrientes. Por exemplo, quando o composto de casca madura está presente, o *Trichoderma* spp. pode produzir enzimas quitinase para parasitar o *R. solani* estimulando a expressão dos genes da quitinase. Isso ocorre devido a uma diminuição na disponibilidade de glicose e celulose prontamente disponíveis. Entretanto, quando o composto de casca fresca é usado, o *Trichoderma* spp. não apresenta um efeito antagônico sobre o patógeno vegetal *R. solani*. (Benhamou & Chet, 1997; Pal & Gardener, 2006).

1.2.2.3. Competição por espaço e nutrientes

A competição por recursos limitados, incluindo nutrientes e espaço, é um fator crítico nas comunidades microbianas (Ghoul & Mitri, 2016). Os fungos patogênicos dependem das fontes de nutrientes disponíveis para a germinação de esporos e o crescimento durante a infecção em diferentes plantas. Os exsudatos da raiz atuam como quimioatraentes para os patógenos do solo, ao mesmo tempo em que favorecem a colonização da raiz por microrganismos benéficos (Turrà & Di Pietro, 2015). O aprimoramento da utilização de nutrientes e da competição por meio de consórcios microbianos surgiu como uma estratégia para antagonizar os patógenos transmitidos pelo solo (Niu et al., 2020).

No biocontrole pós-colheita de frutos, a capacidade de um BCA de colonizar rapidamente as feridas dos frutos, conhecida como competência da ferida, é crucial para evitar ataques de patógenos (J. Liu et al., 2013). O manuseio da fruta durante a colheita e o transporte pode causar ferimentos, levando à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Castoria et al., 2007). Os BCAs devem possuir mecanismos para resistir ao estresse oxidativo induzido por ROS para exercer uma atividade de biocontrole eficaz (Sleutel et al., 2012). Estudos sobre *Papiliotrema terrestris* LS28 demonstraram a importância dos genes responsivos ao estresse oxidativo em sua atividade de biocontrole (Palmieri et al., 2022). Da mesma forma, o pré-tratamento da levedura *Candida oleophila* com concentrações subletais de peróxido de hidrogênio aumentou sua atividade de biocontrole contra *Penicillium expansum* e *Botrytis cinérea* (J. Liu et al., 2012).

Os BCAs entram em competição com os patógenos, em especial pelos recursos de carboidratos e nitrogênio, já que esses macronutrientes estão prontamente disponíveis para o crescimento microbiano no frutoplano e na filosfera, mas também estão presentes no solo no nível da rizosfera (Filonow, 2010; Spadaro & Droby, 2016a). Além disso, em relação aos micronutrientes, a competição por ferro surge como um fator crucial nas interações antagônicas entre BCAs e patógenos. Vários estudos destacaram

a importância da competição por ferro, com ênfase especial no papel dos sideróforos (Segarra et al., 2010). As leveduras *Metschnikowia pulcherrima* e *M. fructicola* competem efetivamente pelo ferro produzindo o sideróforo ácido pulcherrimínico, que desempenha um papel fundamental no controle de *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata* (Saravanakumar et al., 2008). Da mesma forma, a *Rhodotorula glutinis* usa o ácido rodotorúlico para sequestrar o ferro para seu próprio crescimento em feridas de maçã (Calvente et al., 1999).

A eficácia dos BCAs também depende de seu rápido crescimento e de sua capacidade de formar biofilmes, o que lhes permite ocupar e cobrir vários nichos, resultando na "exclusão do local" (Harman et al., 2004). No caso do *Aureobasidium pullulans*, foi demonstrado que a produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) é influenciada pela concentração da fonte de nitrogênio, e a dosagem ideal de EPS aumenta a aptidão competitiva em feridas e melhora a eficácia do biocontrole (Klein & Kupper, 2018). Posteriormente, observações de microscopia eletrônica de varredura (SEM) feitas por Di Francesco & Ugolini (2017) revelaram que a competição por recursos e espaço entre duas cepas de *A. pullulans* desempenha um papel crucial no controle de *Monilinia laxa*. É importante ressaltar que esse modo de ação oferece uma vantagem importante, pois torna mais difícil para os patógenos de plantas desenvolverem resistência.

1.2.2.4. Resistência induzida nas plantas

Os microrganismos que atuam como antagonistas têm a capacidade de estimular a resistência nas plantas, permitindo o controle de uma ampla gama de fitopatógenos (Compant et al., 2005). Essa resistência pode ocorrer localmente ou se espalhar por toda a planta hospedeira por meio de sinalização química. A aplicação de microrganismos não patogênicos pode reduzir a incidência de doenças abióticas, bem como os danos causados por insetos e nematoides (Bhavanam et al., 2021; Ramamoorthy et al., 2001; Sangiorgio et al., 2020). Tanto os microrganismos patogênicos quanto os não patogênicos podem ativar as defesas das plantas por meio de padrões moleculares associados a patógenos ou micróbios

(PAMPs ou MAMPs), bem como compostos químicos naturais ou sintéticos (Beneduzi et al., 2012).

As plantas desenvolveram diferentes estratégias em resposta ao ataque de patógenos, como o reforço das paredes celulares por meio da lignificação, a deposição de calose e o acúmulo de substâncias antimicrobianas de baixo peso molecular, como as fitoalexinas. Além disso, as plantas sintetizam várias proteínas, inclusive proteínas relacionadas à patogênese (PRs), como quitinases, glucanases e peroxidases, que desempenham um papel fundamental na luta contra os patógenos. Ademais, elicitores bacterianos e fúngicos, como lipopolissacarídeos e sideróforos, contribuem para as respostas de defesa das plantas (Conrath et al., 2015; Van Loon et al., 2003).

Entre os primeiros relatos sobre a capacidade dos BCAs de incitar a resistência sistêmica induzida (ISR) é descrito a redução da suscetibilidade ao *Fusarium* sp. em cravos mediada por *Pseudomonas* sp. (Peer, 1991), bem como a doença mediada por *Colletotrichum orbiculare* em pepino que é influenciada por rizobactérias promotoras de crescimento (Wei, 1991). Também é descrito o efeito de *Burkholderia phytofirmans* PsJN no desencadeamento da ISR em tomate e videira afetados por *Verticillium dahliae* e *Botrytis cinerea*, respectivamente (Ait Barka et al., 2002; Barka et al., 2000).

1.2.3. Taxonomia de *Burkholderia*

Em 1950, Walter H. Burkholder identificou um grupo de bactérias que causava a podridão do bulbo da cebola, conhecida como "sour skin", e inicialmente as classificou como *Pseudomonas cepacia* (Burkholder, 1950). No entanto, com o avanço da hibridização DNA-DNA e das técnicas de sequenciamento do rRNA e do genoma completo, a classificação dessas bactérias sofreu alterações. Várias bactérias anteriormente identificadas como *Pseudomonas* foram reclassificadas e transferidas para o novo gênero *Burkholderia* (Hotta et al., 1992). Essa reclassificação foi possível graças a ferramentas aprimoradas de análise genética. Além disso, duas outras bactérias, *Burkholderia picketti* e *Burkholderia solanacearum*, foram

transferidas para outro novo gênero proposto, chamado *Ralstonia* (Yabuuchi et al., 1995).

Publicações anteriores sobre *Burkholderia* (Caballero-Mellado et al., 2004; Estrada-De Los Santos et al., 2001; Suárez-Moreno et al., 2011) revelaram a classificação desse gênero em dois grupos principais: Grupo A e Grupo B, com base em dados de sequenciamento do gene 16S rRNA. Essa classificação foi apoiada ainda pela análise de sequência multilocus (MLSA) de cepas tipo e cepas de referência de *Burkholderia*. O Grupo A corresponde ao cluster PBE (planta-beneficial-ambiental) identificado por Suárez-Moreno et al., (2011), enquanto o Grupo B engloba patógenos de plantas, humanos e animais, bem como patógenos oportunistas. Com base nessas descobertas, Sawana et al. (2014) realizaram uma análise filogenética das proteínas conservadas e da sequência do gene 16S rRNA de várias espécies de *Burkholderia*. Seus resultados confirmaram a presença de dois clados principais, consistentes com os grupos identificados no estudo anterior de Estrada-De Los Santos et al. (2013). Como resultado, Sawana et al. (2014) propuseram a criação de um novo gênero chamado *Paraburkholderia* ao reclassificar as espécies do Grupo A. Outro estudo realizado por Zuleta et al. (2014) analisou 545 genes housekeeping de 15 espécies de *Burkholderia* e também apoiou a divisão do gênero em dois grupos distintos (grupo A e B).

1.2.4. *Burkholderia* no controle de pragas e fungos fitopatogênicos

Diversas espécies de *Burkholderia* atuam como agentes de controle biológico contra fungos, bactérias, insetos e nematoides fitopatogênicos em muitas culturas. Biessy et al. (2022) identificaram vários grupos de genes relacionados a biocontrole em cinco cepas do complexo *Burkholderia cepacia*, incluindo genes codificadores de pirrolnitrina, burkholdinas, cepacina, hidroquinolininas etc., que têm efeito sobre *Pseudomonas cichthyosis*, *Xanthomonas campestris*, *Pectobacterium carotovorum* e *Sclerotinia sclerotiorum*; atividade antagonista semelhante foi registrada em *Burkholderia* sp. BV6 ao inibir *Magnaporthe oryzae*, fungo importante no cultivo de arroz (Xue et al., 2022).

O biocontrole por compostos voláteis também está presente em *Burkholderia* como demonstrado por Andrade et al. (2021), quando três cepas de *B. perseverans* restringiram o crescimento micelial em mais de 60% de *Aspergillus welwitschiae*, *Phytophthora palmivora* e *Moniliophthora perniciosa* por meio da liberação de compostos orgânicos voláteis. Por outro lado, a utilização da *Burkholderia vietnamiensis* B418 em melancias com o propósito de gerenciar o nematoide-das-galhas *Meloidogyne* spp. alcançou um índice de eficácia de 71,15%, superior quando comparado à combinação do B418 com os agentes nematicidas fostiazato e avermectina (com taxas de 62,71% e 67,87%, respectivamente) (M. Liu et al., 2022).

Poucos trabalhos relatam o papel da *Burkholderia* spp. no controle de insetos-praga, por exemplo, Kil et al. (2014) que observaram a presença de *Burkholderia* sp. no nível intestinal em *Riptortus pedestris*, afetando o número de ovos e o tempo necessário para a primeira oviposição, além disso, as larvas de *Drosophila* foram afetadas pela *Burkholderia cepacia*, apresentando um efeito inseticida (Hsu et al., 2014). *Capsicum frutescens*, quando inoculado com cepas de *Burkholderia* (ZoB72 e ZoB82), apresentou menor incidência de *Bemisia tabaci* em comparação com o controle, bem como uma redução no número de ovos e ninfas da praga (Sabu et al., 2019).

1.2.5. Moléculas bioativas de *Burkholderia*

Muitos organismos, como invertebrados, plantas e microrganismos, não têm um sistema imunológico, mas evoluíram para gerar metabólitos secundários bioativos, alguns dos quais têm propriedades tóxicas contra microrganismos nocivos (Bourgaud et al., 2001). Esses produtos naturais desempenham um papel fundamental como mecanismos de defesa específicos contra outros organismos, permitindo que eles concorram e inibam seu crescimento, ao mesmo tempo em que interferem em processos biológicos essenciais. A pesquisa se concentra nos metabólitos secundários microbianos (MSM) como uma fonte valiosa de novos produtos naturais. Descobrir e caracterizar esses compostos é um objetivo fundamental na busca de métodos eficazes de controle de importantes patógenos humanos e de plantas (Camele et al., 2019).

Diversas espécies de *Burkholderia*, reconhecidas como bactérias benéficas em seus habitats naturais, possuem a capacidade de sintetizar compostos antimicrobianos. Essas bactérias podem servir como agentes de biocontrole contra fungos patogênicos de plantas e inibir com eficácia o crescimento de várias bactérias, protozoários e nematoides em diversas culturas agrícolas, como milho, milho doce, algodão, videira, ervilha, tomate e pimentão. Em geral, as espécies de *Burkholderia* são uma grande promessa biotecnológica como reservatórios valiosos de novos antibióticos e metabólitos secundários bioativos. Suas possíveis aplicações na agricultura são dignas de destaque (Cain et al., 2000; Depoorter et al., 2016a; Hu & Young, 1998a).

O repertório de produtos naturais produzidos por *Burkholderia* é caracterizado por uma ampla gama de classes de metabolitos e diversidade estrutural (Figura 2). Entre eles, os peptídeos não ribossômicos representam a classe biossintética mais abundante. É interessante notar que os híbridos de peptídeos não ribossômicos e policetídeos também são comuns (Kunakom & Eustáquio, 2019).

Além de seu potencial terapêutico, os produtos naturais de *Burkholderia* desempenham papéis importantes nas funções ecológicas e na virulência. Eles foram implicados em atividades como enxameação, formação de biofilme, aquisição de ferro e detecção de quorum. Essas funções são essenciais para a sobrevivência e a adaptação da *Burkholderia* em diversos nichos ecológicos (Kunakom & Eustáquio, 2019).

Uma abordagem para identificar as diversas moléculas produzidas pela *Burkholderia* é a extração por fracionamento bioguiado, sendo sua principal vantagem sua capacidade de identificar compostos com uma bioatividade específica desejada. Entretanto, essa abordagem tem algumas limitações. Por um lado, nem todos os grupos de genes são ativamente transcritos em níveis que permitam sua detecção em bioensaios. Por outro lado, o fracionamento bioguiado exige o cultivo do organismo produtor nativo, o que pode ser complicado em certos casos (Kunakom & Eustáquio, 2019).

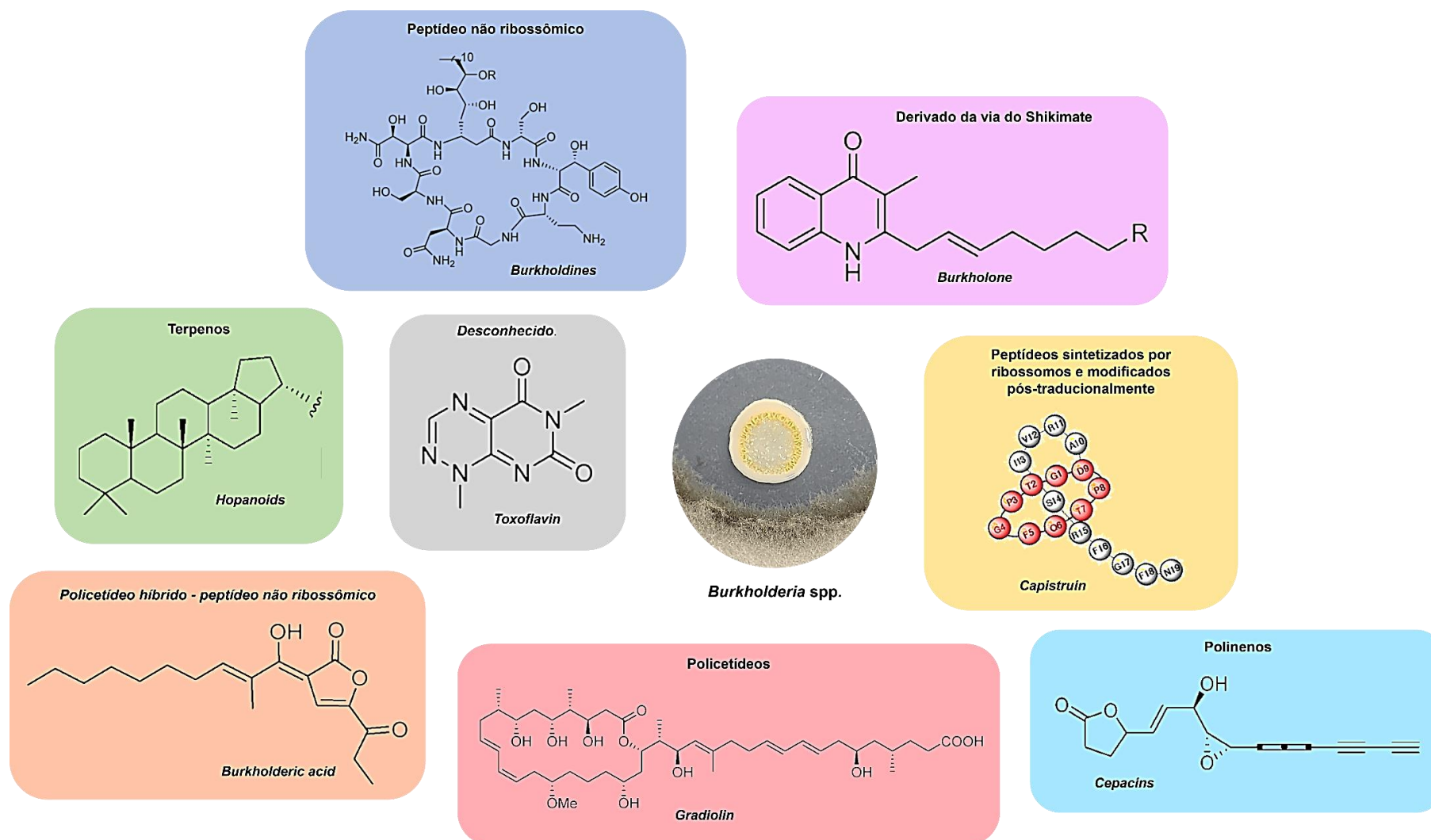


Figura 2. Compostos bioativos produzidos pelo gênero bacteriano *Burkholderia*. Cada cor representa um grupo representativo das moléculas. Imagem adaptada de Kunakom, Sylvia e Alessandra S. Eustáquio (2019). Imagem desenvolvida com BioRender.com

A mineração genômica representa uma estratégia promissora para superar as limitações associadas à descoberta de compostos bioativos. Com essa abordagem, é possível identificar compostos codificados em grupos de genes com baixa expressão em condições de cultura de laboratório. Além disso, a mineração genômica permite a exploração de compostos de bactérias não cultivadas e conjuntos de dados metagenômicos. Embora a atividade biológica desses compostos possa ser imprevisível, foram descritos casos em que a prospecção genômica foi realizada para alvos específicos ou genes de resistência. No entanto, a mineração genômica tem certas limitações, pois pode deixar passar compostos cuja biossíntese é desconhecida e, portanto, não detectada por programas de software automatizados. Nesses cenários, o isolamento orientado pela bioatividade surge como uma vantagem na descoberta de compostos bioativos (Braesel et al., 2019; Panter et al., 2018; Yan et al., 2018; Yeh et al., 2016).

Em conclusão, o isolamento orientado pela bioatividade e a mineração genômica são estratégias complementares na descoberta de compostos bioativos. O isolamento orientado pela bioatividade permite a identificação de compostos específicos com atividade biológica, enquanto a mineração genômica oferece a oportunidade de superar os desafios associados à expressão gênica e explorar compostos de fontes não cultivadas. Ambas as abordagens têm vantagens exclusivas e sua combinação pode aprimorar a descoberta de novos compostos com propriedades bioativas.

Referências

- Ait Barka, E., Gognies, S., Nowak, J., Audran, J. C., & Belarbi, A. (2002). Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. **Biological Control**, 24(2), 135–142. 8
- Ali, G. S., El-Sayed, A. S. A., Patel, J. S., Green, K. B., Ali, M., Brennan, M., & Norman, D. (2016). Ex vivo application of secreted metabolites produced by soil-inhabiting *Bacillus* spp. efficiently controls foliar diseases caused by *Alternaria* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, 82(2), 478–490.
- Aloo, B. N., Makumba, B. A., & Mbega, E. R. (2019). The potential of *Bacilli* rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. **Microbiological Research**, 219, 26–39.
- Andrade, J. P., de Souza, H. G., Ferreira, L. C., Cnockaert, M., De Canck, E., Wieme, A. D., Peeters, C., Gross, E., De Souza, J. T., Marbach, P. A. S., Góes-Neto, A., & Vandamme, P. (2021). *Burkholderia perseverans* sp. nov., a bacterium isolated from the Restinga ecosystem, is a producer of volatile and diffusible compounds that inhibit plant pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, 52(4), 2145–2152
- Barka, E. A., Belarbi, A., Hachet, C., Nowak, J., & Audran, J.-C. (2000). Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, 186(1), 91–95.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and Molecular Biology**, 35(4 SUPPL.), 1044–1051.
- Benhamou, N., & Chet, I. (1997). Cellular and Molecular Mechanisms Involved in the Interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. **Applied and Environmental Microbiology**, 63(5), 2095–2099.
- Bhavanam, S., Stout, M. J., Schaller, J., Matichenkov, V. V., Nagabovanalli, P., & Katz, O. (2021). Assessment of Silicon- and Mycorrhizae- Mediated Constitutive and Induced Systemic Resistance in Rice, *Oryza sativa* L., against the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* Smith. **Plants** 2021, Vol. 10, Page 2126, 10(10), 2126.
- Biessy, A., Ciotola, M., Cadieux, M., Albert, D., & Fillion, M. (2022). Complete Genome Sequences of Five *Burkholderia* Strains with Biocontrol Activity against Various Lettuce Pathogens. **Microbiology Resource Announcements**, 11(1).
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, 161(5), 839–851.

- Braesel, J., Lee, J. H., Arnould, B., Murphy, B. T., & Eustáquio, A. S. (2019). Diazaquinomycin Biosynthetic Gene Clusters from Marine and Freshwater Actinomycetes. **Journal of Natural Products**, 82(4), 937–946.
- Brescia, F., Vlassi, A., Bejarano, A., Seidl, B., Marchetti-deschmann, M., Schuhmacher, R., & Puopolo, G. (2021). Characterisation of the antibiotic profile of *lysobacter capsici* az78, an effective biological control agent of plant pathogenic microorganisms. **Microorganisms**, 9(6), 1320.
- Burkholder, W. H. (1950). Sour skin, a bacterial rot of Onion bulbs. **Phytopathology**, 40(1).
- Caballero-Mellado, J., Martínez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., & Estrada-de los Santos, P. (2004). *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 54(4), 1165–1172.
- Cain, C. C., Henry, A. T., Waldo, R. H., Casida, J., & Falkinham, J. O. (2000). Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad-spectrum antimicrobial activity. **Applied and Environmental Microbiology**, 66(9), 4139–4141.
- Calvente, V., Benuzzi, D., & De Tosselli, M. I. S. (1999). Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 43(4), 167–172.
- Camele, I., Elshafie, H. S., Caputo, L., Sakr, S. H., & De Feo, V. (2019). *Bacillus mojavensis*: biofilm formation and biochemical investigation of its bioactive metabolites. **Journal of Biological Research - Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale**, 92(1), 39–45.
- Castoria, R., Caputo, L., De Curtis, F., & De Cicco, V. (2007). Resistance of Postharvest Biocontrol Yeasts to Oxidative Stress: A Possible New Mechanism of Action.
- Chen, X. H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., & Borriss, R. (2009). Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. **Journal of Biotechnology**, 140(1–2), 38–44.
- Chen, Y., Wang, J., Yang, N., Wen, Z., Sun, X., Chai, Y., & Ma, Z. (2018). Wheat microbiome bacteria can reduce virulence of a plant pathogenic fungus by altering histone acetylation. **Nature Communications** 2018 9:1, 9(1), 1–14.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, 71(9), 4951–4959.

Conrath, U., Beckers, G. J. M., Langenbach, C. J. G., & Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for Enhanced Defense. **Annual Review of Phytopathology**, 53, 97–119.

Corke, A. T. K. (1975). *Biological Control of Plant Pathogens*. By Kenneth F. Baker and R. James Cook. San Francisco: Freeman (1974), pp. 433, £5.90. **Experimental Agriculture**, 11(2), 159–159.

DeBach P., & Rosen D. (1991). *Biological Control by Natural Enemies*. **Cambridge University Press**.

Depoorter, E., Bull, M. J., Peeters, C., Coenye, T., Vandamme, P., & Mahenthiralingam, E. (2016). Burkholderia: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. **Applied Microbiology and Biotechnology** 2016 100:12, 100(12), 5215–5229.

Di Francesco, A., Ugolini, L., D'Aquino, S., Pagnotta, E., & Mari, M. (2017). Biocontrol of *Monilinia laxa* by *Aureobasidium pullulans* strains: Insights on competition for nutrients and space. **International Journal of Food Microbiology**, 248, 32–38.

Estrada-De Los Santos, P., Bustillos-Cristales, R., & Caballero-Mellado, J. (2001). Burkholderia, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, 67(6), 2790–2798.

Estrada-De Los Santos, P., Vinuesa, P., Martínez-Aguilar, L., Hirsch, A. M., & Caballero-Mellado, J. (2013). Phylogenetic analysis of burkholderia species by multilocus sequence analysis. **Current Microbiology**, 67(1), 51–60.

Filonow, A. B. (2010). Role of Competition for Sugars by Yeasts in the Biocontrol of Gray Mold of Apple. **Biocontrol Science and Technology**, 8(2), 243–256.

Ghoul, M., & Mitri, S. (2016). The Ecology and Evolution of Microbial Competition. **Trends in Microbiology**, 24(10), 833–845.

Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., Marrone, P., Morin, L., & Stewart, A. (2012). Have biopesticides come of age? **Trends in biotechnology**, 30(5), 250–258.

Guennoc, C. M., Rose, C., Labbé, J., & Deveau, A. (2018). Bacterial biofilm formation on the hyphae of ectomycorrhizal fungi: a widespread ability under controls? **FEMS Microbiology Ecology**, 94(7), 93.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). Trichoderma species — opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology** 2004 2:1, 2(1), 43–56.

He, D. C., He, M. H., Amalin, D. M., Liu, W., Alvindia, D. G., & Zhan, J. (2021). Biological Control of Plant Diseases: An Evolutionary and Eco-Economic Consideration. **Pathogens**, 10(10).

- Hossain, M. T., Khan, A., Chung, E. J., Rashid, M. H. O., & Chung, Y. R. (2016). Biological Control of Rice Bakanae by an Endophytic *Bacillus oryzicola* YC7007. **The Plant Pathology Journal**, 32(3), 228.
- Hotta, H., Yano, I., Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Ezaki, T., Hashimoto, Y., & Arakawa, M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and Transfer of Seven Species of the Genus *Pseudomonas* Homology Group II to the New Genus, with the Type Species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, 36(12), 1251–1275.
- Hsu, C. H., Nguyen, A. D., Chen, Y. W., & Wang, S. L. (2014). Tyrosinase inhibitors and insecticidal materials produced by *Burkholderia cepacia* using squid pen as the sole carbon and nitrogen source. **Research on Chemical Intermediates**, 40(6), 2249–2258.
- Huang, H. C., & Erickson, R. S. (2002). Overwintering of *Coniothyrium minitans*, a mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*, on the Canadian Prairies. **Australasian Plant Pathology**, 31(3), 291–293.
- Hu, F. P., & Young, J. M. (1998). Biocidal activity in plant pathogenic *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Ralstonia* and *Xanthomonas* spp. **Journal of Applied Microbiology**, 84(2), 263–271.
- Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, 51, 72–80.
- Kil, Y. J., Seo, M. J., Kang, D. K., Oh, S. N., Cho, H. S., Youn, Y. N., Yasunaga-Aoki, C., & Yu, Y. M. (2014). Effects of *Enterobacteria* (*Burkholderia* sp.) on development of *Riptortus pedestris*. **Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University**, 59(1), 77–84.
- Klein, M. N., & Kupper, K. C. (2018). Biofilm production by *Aureobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. **Food Microbiology**, 69, 1–10.
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, 10, 454982.
- Kour, D., Rana, K. L., Yadav, A. N., Yadav, N., Kumar, M., Kumar, V., Vyas, P., Dhaliwal, H. S., & Saxena, A. K. (2020). Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 23, 101487.
- Kunakom, S., & Eustáquio, A. S. (2019). *Burkholderia* as a Source of Natural Products. **Journal of Natural Products**, 82(7), 2018–2037.
- Legein, M., Smets, W., Vandenheuvel, D., Eilers, T., Muyshondt, B., Prinsen, E., Samson, R., & Lebeer, S. (2020). Modes of Action of Microbial Biocontrol in the Phyllosphere. **Frontiers in Microbiology**, 11, 544057.

- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. **International Journal of Food Microbiology**, 167(2), 153–160.
- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J., HersHKovitz, V., Tian, S., & Farrell, R. (2012). Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, 80(3), 578–590.
- Liu, M., Philp, J., Wang, Y., Hu, J., Wei, Y., Li, J., Ryder, M., Toh, R., Zhou, Y., Denton, M. D., Wu, Y., & Yang, H. (2022). Plant growth-promoting rhizobacteria *Burkholderia vietnamiensis* B418 inhibits root-knot nematode on watermelon by modifying the rhizosphere microbial community. **Scientific Reports** 2022 12:1, 12(1), 1–13.
- Magaña-Gómez J, & Calderón de la Barca AM. (2017). *Human health concerns related to the consumption of foods from genetically modified crops. Environmental Pest Management: Challenges for Agronomists, Ecologists, Economists and Policymakers*. Wiley-Blackwell.
- Meziane, H., Gavriel, S., Ismailov, Z., Chet, I., Chernin, L., & Höfte, M. (2006). Control of green and blue mould on orange fruit by *Serratia plymuthica* strains IC14 and IC1270 and putative modes of action. **Postharvest Biology and Technology**, 39(2), 125–133.
- Moreno-Ruiz, D., Lichius, A., Turrà, D., Di Pietro, A., & Zeilinger, S. (2020). Chemotropism Assays for Plant Symbiosis and Mycoparasitism Related Compound Screening in *Trichoderma atroviride*. **Frontiers in Microbiology**, 11, 601251.
- Nishimoto, R. (2019). Global trends in the crop protection industry. **Journal of Pesticide Science**, 44(3), 141–147.
- Niu, B., Wang, W., Yuan, Z., Sederoff, R. R., Sederoff, H., Chiang, V. L., & Borriss, R. (2020). Microbial Interactions Within Multiple-Strain Biological Control Agents Impact Soil-Borne Plant Disease. **Frontiers in Microbiology**, 11, 585404.
- Nofal, A. M., El-Rahman, M. A., Abdelghany, T. M., & Abd El-Mongy, M. (2021). Mycoparasitic nature of Egyptian *Trichoderma* isolates and their impact on suppression *Fusarium* wilt of tomato. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, 31(1), 1–8.
- Obagwu, J., & Korsten, L. (2003). Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. **Postharvest Biology and Technology**, 28(1), 187–194.
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. **The Journal of Agricultural Science**, 144(1), 31–43.

- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J. L., & Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, 9(4), 1084–1090.
- Pacios-Michelena, S., Aguilar González, C. N., Alvarez-Perez, O. B., Rodriguez-Herrera, R., Chávez-González, M., Arredondo Valdés, R., Ascacio Valdés, J. A., Govea Salas, M., & Ilyina, A. (2021). Application of *Streptomyces* Antimicrobial Compounds for the Control of Phytopathogens. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, 5, 696518.
- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor. **Biological Control**
- Palmieri, D., Ianiri, G., Del Grosso, C., Barone, G., De Curtis, F., Castoria, R., & Lima, G. (2022). Advances and Perspectives in the Use of Biocontrol Agents against Fungal Plant Diseases. **Horticulturae** 2022, Vol. 8, Page 577, 8(7), 577.
- Panter, F., Krug, D., Baumann, S., & Müller, R. (2018). Self-resistance guided genome mining uncovers new topoisomerase inhibitors from myxobacteria. **Chemical Science**, 9(21), 4898–4908.
- Peer, R. van. (1991). Induced Resistance and Phytoalexin Accumulation in Biological Control of Fusarium Wilt of Carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r . **Phytopathology**, 81(7), 728.
- Pretorius, D., van Rooyen, J., & Clarke, K. G. (2015). Enhanced production of antifungal lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of postharvest disease. **New Biotechnology**, 32(2), 243–252.
- Rajaram, S., & Dubin, H. J. (2021). Plant Diseases, Global Food Security and the Role of R. Glenn Anderson. **Springer International Publishing**, 35–45.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., & Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, 20(1), 1–11.
- Raymaekers, K., Ponet, L., Holtappels, D., Berckmans, B., & Cammue, B. P. A. (2020a). Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. **Biological Control**, 144, 104240.
- Romero, F. M., Marina, M., & Pieckenstain, F. L. (2016). Novel components of leaf bacterial communities of field-grown tomato plants and their potential for plant growth promotion and biocontrol of tomato diseases. **Research in Microbiology**, 167(3), 222–233.

Ruiu, L. (2015). Insect Pathogenic Bacteria in Integrated Pest Management. *Insects* 2015, Vol. 6, Pages 352-367, 6(2), 352–367.

Sabu, R., Aswani, R., Nidheesh, K. S., Ray, J. G., Remakanthan, A., & Radhakrishnan, E. K. (2019). Beneficial Changes in *Capsicum frutescens* Due to Priming by Plant Probiotic *Burkholderia* spp. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 11(2), 519–525.

Sangiorgio, D., Cellini, A., Donati, I., Pastore, C., Onofrietti, C., & Spinelli, F. (2020). Facing Climate Change: Application of Microbial Biostimulants to Mitigate Stress in Horticultural Crops. **Agronomy** 2020, Vol. 10, Page 794, 10(6), 794.

Saravanakumar, D., Ciavarella, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2008). *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. **Postharvest Biology and Technology**, 49(1), 121–128.

Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution** 2019 3:3, 3(3), 430–439.

Sawana, A., Adeolu, M., & Gupta, R. S. (2014). Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: Proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers in Genetics**, 5(NOV), 119458.

Segarra, G., Casanova, E., Avilés, M., & Trillas, I. (2010). *Trichoderma asperellum* strain T34 controls *Fusarium* wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. **Microbial Ecology**, 59(1), 141–149.

Simionato, A. S., Navarro, M. O. P., de Jesus, M. L. A., Barazetti, A. R., da Silva, C. S., Simões, G. C., Balbi-Peña, M. I., de Mello, J. C. P., Panagio, L. A., de Almeida, R. S. C., Andrade, G., & de Oliveira, A. G. (2017). The effect of phenazine-1-carboxylic acid on mycelial growth of *Botrytis cinerea* produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. **Frontiers in Microbiology**, 8(JUN), 233325.

Sleutel, S., Bouckaert, L., Buchan, D., Van Loo, D., Cornelis, W. M., & Sanga, H. G. (2012). Manipulation of the soil pore and microbial community structure in soil mesocosm incubation studies. **Soil Biology and Biochemistry**, 45, 40–48.

Spadaro, D., & Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends in Food Science & Technology**, 47, 39–49.

Suárez-Moreno, Z. R., Caballero-Mellado, J., Coutinho, B. G., Mendonça-Previato, L., James, E. K., & Venturi, V. (2011). Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated Burkholderia. **Microbial Ecology** 2011 63:2, 63(2), 249–266.

Trunk, K., Peltier, J., Liu, Y. C., Dill, B. D., Walker, L., Gow, N. A. R., Stark, M. J. R., Quinn, J., Strahl, H., Trost, M., & Coulthurst, S. J. (2018). The type VI secretion system deploys antifungal effectors against microbial competitors. **Nature Microbiology** 2018 3:8, 3(8), 920–931.

Turrà, D., & Di Pietro, A. (2015). Chemotropic sensing in fungus–plant interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, 26, 135–140.

Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (2003). SYSTEMIC RESISTANCE INDUCED BY RHIZOSPHERE BACTERIA. **Annual Review of Phytopathology**, 36, 453–483.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). Trichoderma–plant–pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, 40(1), 1–10.

Wang, J., Liu, J., Chen, H., & Yao, J. (2007). Characterization of Fusarium graminearum inhibitory lipopeptide from Bacillus subtilis IB. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 76(4), 889–894.

Wei, G. (1991). Induction of Systemic Resistance of Cucumber to Colletotrichum orbiculare by Select Strains of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. **Phytopathology**, 81(12), 1508.

Weller, D. M. (2007). Pseudomonas Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years, 97(2), 250–256.

Xue, L., Yang, C., Jihong, W., Lin, L., Yuqiang, Z., Zhitong, J., Yanxin, W., Zhoukun, L., Lei, F., & Zhongli, C. (2022). Biocontrol potential of Burkholderia sp. BV6 against the rice blast fungus Magnaporthe oryzae. **Journal of Applied Microbiology**, 133(2), 883–897.

Yabuuchi, E., Yano, I., Hotta, H., Nishiuchi, Y., & Kosako, Y. (1995). Transfer of Two Burkholderia and An Alcaligenes Species to Ralstonia Gen. Nov. **Microbiology and Immunology**, 39(11), 897–904.

Yan, Y., Liu, Q., Zang, X., Yuan, S., Bat-Erdene, U., Nguyen, C., Gan, J., Zhou, J., Jacobsen, S. E., & Tang, Y. (2018). Resistance-gene-directed discovery of a natural-product herbicide with a new mode of action. **Nature** 2018 559:7714, 559(7714), 415–418.

Yeh, H. H., Ahuja, M., Chiang, Y. M., Oakley, C. E., Moore, S., Yoon, O., Hajovsky, H., Bok, J. W., Keller, N. P., Wang, C. C. C., & Oakley, B. R. (2016). Resistance Gene-Guided Genome Mining: Serial Promoter Exchanges in Aspergillus nidulans Reveal the Biosynthetic Pathway for Fellutamide B, a Proteasome Inhibitor. **ACS Chemical Biology**, 11(8), 2275–2284.

Zeriouh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Romero, D. (2014). Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. **Environmental Microbiology**, *16*(7), 2196–2211.

Ziedan, E. S. H., Farrag, E. S., El-Mohamedy, R. S., & Abd Alla, M. A. (2009). *Streptomyces alni* as a biocontrol agent to root-rot of grapevine and increasing their efficiency by biofertilisers inocula. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, *43*(7), 634–646.

Zuleta, L. F. G., Cunha, C. D. O., de Carvalho, F. M., Ciapina, L. P., Souza, R. C., Mercante, F. M., de Faria, S. M., Baldani, J. I., Stralio, R., Hungria, M., & de Vasconcelos, A. T. R. (2014). The complete genome of *Burkholderia phenoliruptrix* strain BR3459a, a symbiont of *Mimosa flocculosa*: Highlighting the coexistence of symbiotic and pathogenic genes. **BMC Genomics**, *15*(1), 1–19.

2. CAPÍTULO 2 – Atividade inseticida do metabólito secundário de *Burkholderia* JBC02 contra *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797)

2.1. Resumo

O gênero bacteriano *Burkholderia* tem uma alta capacidade de produzir uma grande diversidade de metabólitos secundários com diversas aplicações, sendo o controle biológico uma área promissora para o uso dessas moléculas bioativas. No entanto, há uma lacuna na aplicação de metabólitos de *Burkholderia* no controle de insetos-praga. Nesse contexto, no presente estudo, isolamos/purificamos e identificamos metabólitos secundários termoestáveis produzidos por *Burkholderia* JBC02 e avaliamos sua função inseticida contra a lagarta-do-cartucho (FAW). O extrato seco foi obtido a partir da cultura da JBC02, o qual foi submetido à extração líquido-líquido e concentrado em um evaporador rotativo. Posteriormente, foi submetido à análise cromatográfica (TLC, SPE, HPLC) por fracionamento guiado por bioensaio, obtendo-se oito frações com potencial atividade inseticida, sendo a F2 do HPLC a fração que gerou 100% de mortalidade. Este trabalho representa um dos poucos relatos envolvendo o uso de metabólitos secundários produzidos por *Burkholderia* sp. no controle de *S. frugiperda*.

Palavras-chave: biopesticida, metabólitos secundários, controle biológico, fracionamento guiado por bioensaio, *Burkholderia*.

Abstract - The bacterial genus *Burkholderia* has a high capacity to produce a great diversity of secondary metabolites with diverse applications, being biological control a promising area for the use of these bioactive molecules. However, there is a gap in the application of *Burkholderia* metabolites in the control of insect pests. Against such a background, in the present study, we isolated/purified and identified thermostable secondary metabolites produced by JBC02 and evaluated their insecticidal function against the Fall Armyworm (FAW). The dry extract was obtained from the culture of JBC02, which was subjected to liquid-liquid extraction and concentrated in a rotatory evaporator, subsequently, it was subjected to chromatographic analysis (TLC, SPE, HPLC) by bioassay-guided fractionation, obtaining eight fractions with potential insecticidal activity, being HPLC F2 the fraction that generated a 100% mortality. This work represents one of the few reports involving use of secondary metabolites produced by *Burkholderia* sp. on the control of *S. frugiperda*.

Keywords: *biopesticide, secondary metabolites, biological control, bioassay-guided fractionation, Burkholderia.*

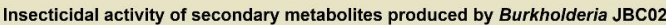
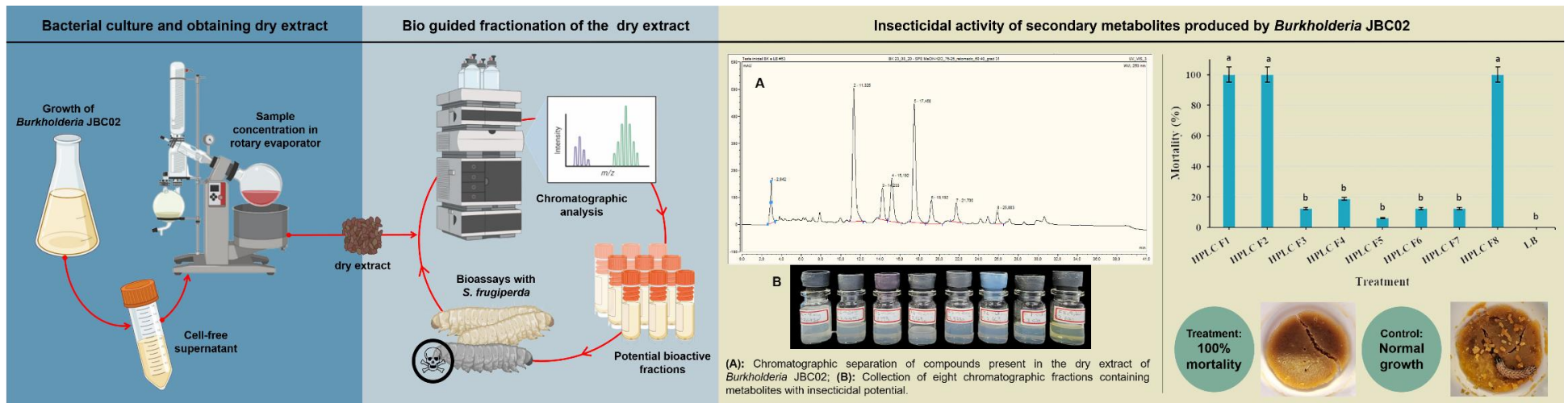


Imagem desenvolvida com BioRender.com

2.2. Introdução

A lagarta-do-cartucho (FAW), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), é um inseto praga nativo das regiões tropicais e subtropicais da América, embora tenha sido recentemente relatada em outras partes do mundo, como Europa, Ásia e África, tornando-se uma praga de relevância global (Goergen et al., 2016; Ganiger et al., 2018). Sua capacidade de voar longas distâncias, sua alta capacidade reprodutiva e seu alto grau de polifagia, alimentando-se de uma grande variedade de plantas hospedeiras, sendo até o momento 350 espécies hospedeiras conhecidas, favorecem sua adaptação a diversos territórios (Nagoshi et al., 2015; Montezano et al., 2018). O estágio larval (3 a 4 cm de comprimento) de *S. frugiperda* se alimenta principalmente de estruturas reprodutivas, caules e folhas, sendo a soja (*Glycine max* (L.) Merrill), o milho (*Zea mays* L.) e o algodão (*Gossypium hirsutum* L.) as culturas mais afetadas por essa praga no Brasil. (de Freitas Bueno et al., 2011; Hardke et al., 2015; Montezano et al., 2018).

Nos últimos anos, o uso de pesticidas químicos e de plantas que expressam proteínas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) têm sido as principais formas de controle de brocas (Burtet et al., 2017). No entanto, o uso intensivo e incorreto desses métodos de controle tem causado sérias contaminações ambientais, perigo para a saúde humana e animal, além de induzir o desenvolvimento de resistência (Van Rensburg et al., 2007; Liu et al., 2010; Gassmann et al., 2011; Farias et al., 2014; Glare et al., 2017). Atualmente, já foram registrados cerca de 200 casos de resistência a vários ingredientes ativos e às proteínas *cry* de *B. thuringiensis* (Mota-Sanchez). Nesse contexto, surgiu a necessidade de novas alternativas para o controle de pragas, destacando-se o controle biológico como uma alternativa favorável para maior sustentabilidade da produção agrícola (Leeman et al., 1996; Péchy-Tarr et al., 2008). Entre as diversas metodologias de controle biológico estão compostos extraídos de plantas que atuam como semioquímicos, nematoides entomopatogênicos, parasitoides e predadores e agentes microbianos (como bactérias, fungos e vírus) (Ruiu et al., 2015).

Uma fonte abundante de novas moléculas bioativas são os micróbios (Oh et al., 2009; Oh et al., 2011; Carr et al., 2012), sendo um exemplo claro os bioinseticidas bacterianos, que, devido à sua compatibilidade com programas de manejo integrado de pragas, rápida degradação no meio ambiente e baixos custos de desenvolvimento e produção (Chattopadhyay et al., 2017), dominam o mercado de biopesticidas (Glare et al., 2017). Entre os vários gêneros bacterianos, destaca-se o gênero *Burkholderia*, que tem se tornado cada vez mais importante por sua capacidade de produzir metabólitos secundários diversos e abundantes com funções de promoção do crescimento vegetal e características herbicidas, antimicrobianas e inseticidas (Jeong et al., 2003; Compant et al., 2008; Kunakom et al., 2019; Mullins et al., 2019; Ruiu, 2020; Lin et al., 2021; Alam et al., 2022). Cepas como *B. ambifaria*, *B. pyrrocinia*, *B. vietnamiensis*, *B. seminalis* e *B. stabilis* foram relatadas como agentes de controle biológico eficientes (Mahenthiralingam et al., 2008; Araújo et al., 2017; Kim et al., 2019). Um dos principais mecanismos da *Burkholderia* para combater insetos-praga é a produção de metabólitos secundários, conforme evidenciado por: Cordova-Kreylos et al. (2013) ao utilizar *B. rinojensis* A396 em bioensaios com *Spodoptera exigua* e *Tetranychus urticae* atingindo mortalidade de 100% e 93%, respectivamente. Também foi determinado que o sobrenadante livre de células, após ser submetido a tratamento térmico, manteve sua atividade inseticida, indicando que um metabólito secundário seria o responsável pela atividade. Morita et al. (2003) determinaram que *B. plantarii* produz tropolona, um composto orgânico com atividade inseticida contra *Tyrophagus putrescentiae*, *Dermatophagoides farina* e *Coptotermes formosanus*. No entanto, há um grande número de moléculas bioativas produzidas por *Burkholderia* que ainda são desconhecidas, portanto, a caracterização e a purificação dessas moléculas devem ser estudadas em profundidade (Xu et al., 2020).

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi isolar/purificar e identificar metabólitos secundários com atividade inseticida contra a lagarta *Spodoptera frugiperda*, por meio do fracionamento bioguiado do extrato de *Burkholderia* JBC02.

2.3. Materiais e Métodos

2.3.1. Isolado e condições de cultura

O isolado bacteriano JBC02 (SISGEN ID: A16E408) foi obtido de solo da rizosfera de plantas encontradas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal-São Paulo. Logo, o isolado foi armazenado no Banco de Controle Biológico de Jaboticabal do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e de Plantas (LBMP) em freezers -80°C. Para uso, a bactéria foi cultivada em meio líquido Luria-Bertani (LB) a 30°C e 150 rpm por 40 h, até atingir aproximadamente uma densidade óptica (DO) de 6.

2.3.2. Obtenção do extrato seco do isolado JBC02

Após as 40 h, o caldo de cultivo foi centrifugado (Sorvall-RC5C, DuPont, USA) a 16.000 g, 10°C por 20 min. e, em seguida, o sobrenadante foi filtrado com membrana de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,45 µm (Merck Millipore®, Brasil). Logo, o sobrenadante livre de células foi submetido à extração líquido-líquido (ELL) com acetato de etila (EtOAc) em uma proporção de 1:1(v/v) em um funil de separação para obter a solução extrativa. Esse procedimento foi repetido três vezes. Após a ELL, a solução extrativa de EtOAc foi concentrada em um evaporador rotativo BÜCHI-R11 (Flawil, Switzerland) a vácuo a 40°C, seca em uma capela de fluxo laminar e, em seguida, colocada em um dessecador com sílica gel para obter o extrato seco. Como controle negativo, para avaliar a atividade inseticida, o meio LB foi usado sem inoculação e foi submetido ao mesmo método mencionado acima.

2.3.3. Isolamento, purificação e identificação de metabólitos secundários inseticidas

O extrato seco foi submetido a fracionamento bioquímico, usando extração em fase sólida (EFS) e, posteriormente, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV). A EFS foi desenvolvida em um cartucho Strata™ C18E (15 mm x 10 mm, 55 µm) (Phenomenex, California, USA) com 10 mg de extrato seco solubilizado em 1 mL de metanol: água 95:05 (v/v), que foi eluído com 4 mL de metanol: água 50:50, 4 mL de metanol: água 75:25 e 4 mL de metanol: água 95:05, sequencialmente. As frações foram secas em

um concentrador Vacufuge® plus (Hamburg, Germany), solubilizadas em MeOH:H₂O 95:05 (10 mg/mL) e filtradas em filtro de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,22 µm (Merck Millipore®, Brazil). Cada fração coletada foi submetida a bioensaios para avaliar sua bioatividade contra lagarta-do-cartucho e analisadas por HPLC-UV segundo método abaixo.

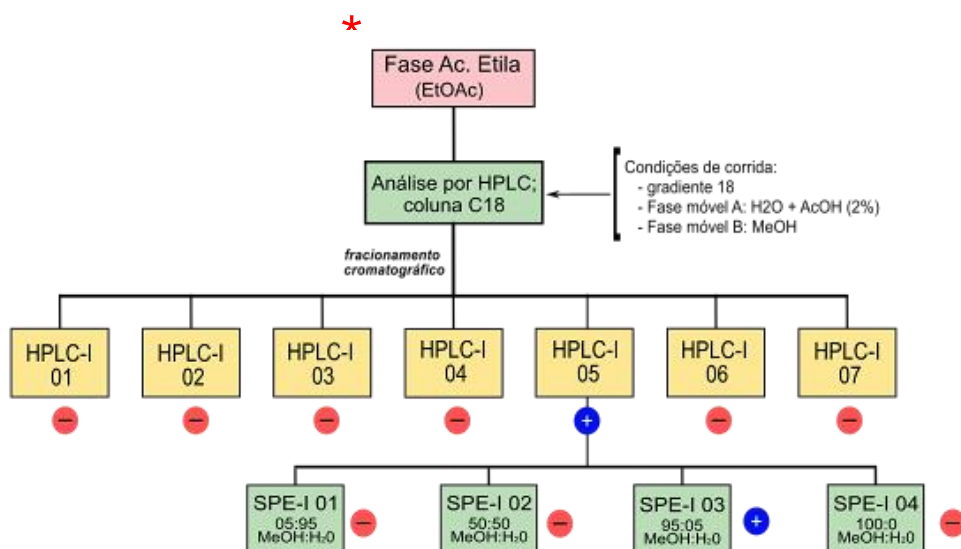
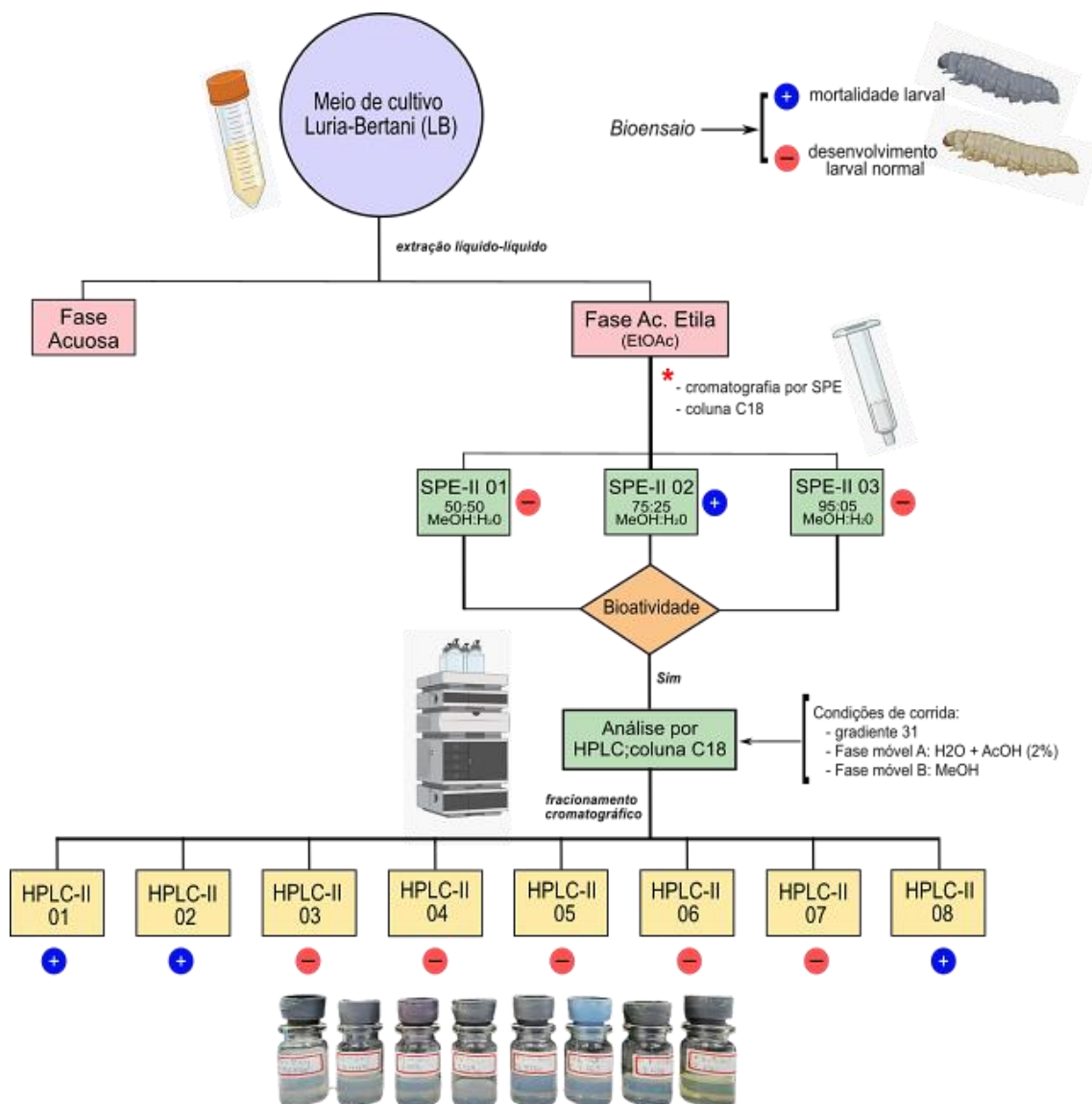
Para obtenção de maior volume das frações e para o isolamento dos compostos presentes na SPE-II 02, foi realizada uma nova EFS utilizando-se coluna de vidro e como fase estacionária sílica C18 Discovery® DSC-18 (2,0 x 1,5 cm, 40-63 µm) com eluição sob pressão. A fase móvel utilizada foi metanol 50:50 (v/v), na qual a amostra foi solubilizada no menor volume possível. A amostra foi aplicada na coluna após homogeneização com FE (1:1, m/m). Foram obtidas três frações empregando-se os seguintes eluentes sob pressão negativa: 1) 25 mL metanol: água 50: 50 (v/v) (SPE-II 01); 2) 25 mL metanol: água 75: 25 (SPE-II 02); 3) 25 mL metanol: água 95: 5 (SPE-II 03). As frações foram secas sob fluxo de ar em capela e em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida.

Posteriormente à secagem, a SPE-II 02 foi solubilizada em metanol: água 60: 40 (v/v) e filtrada em membrana (0,22 µm, PVDF Millipore®). Para análise/separação por HPLC-UV foi utilizado um HPLC modelo UltiMate 3000 (Thermo® Scientific, Massachusetts, USA) com as seguintes condições: coluna de modo reversa Thermo Scientific® (C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), modo isocrático com metanol 61% (v/v) por 10 min, gradiente para metanol 80% até 35 min, metanol 100% mantendo isocraticamente em 36 min por 10 min, vazão 1,0 mL/min, detecção em 230 nm, volume de injeção 20 µL. Foram selecionados 8 picos da SPE-II 02 que foram isolados e submetidos a bioensaios para avaliar sua bioatividade contra lagarta-do-cartucho.

A SPE-II 02 também foi submetida a análise por UPLC-ESI-MS utilizando o cromatógrafo Acquity UPLC Waters® acoplado a quadrupole/time of flight system (XEVO-QToF, Waters®), equipado com coluna ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 µm; operando em modo gradiente com água acidificada 0,1% ác. fórmico(A): acetonitrila acidificada 0,1% ác. fórmico (B), 5-100% B de 0-10min, e mantendo isocraticamente de 10-14 min em 100% B, vazão 0,5 mL/min, volume de injeção 0,3 µL. Os parâmetros de

operação utilizados na fonte de ionização ESI foram: voltagem do capilar: 2,5 kV, voltagem do cone: 40.0 V, temperatura da fonte ESI (modo positivo): 120 °C, temperatura de dessolvatação do gás: 350 °C, vazão do gás de dessolvatação: 50 L/h. A faixa de massas usada no modo de análise full-scan foi de 50 a 1500 unidades de massa (m/z). O programa MassLynx (Waters® Corporation) foi usado para controle do equipamento e aquisição e análise de dados.

Fluxograma das análises cromatográficas



2.3.4. Biomonitoramento da atividade inseticida

Larvas neonatas de *S. frugiperda* fornecidas pelo Laboratório de Ecologia Aplicada (FCAV/UNESP, Jaboticabal, Brasil) foram usadas para identificar as frações ativas por meio de bioensaios. Em placas de poliestireno de 128 poços (Cell Wells, Corning Glass Works), foi incorporado 1 ml/poço de dieta artificial (Greene et al., 1976). Após a solidificação da dieta, 60 µL (0,26 mg/mL) de cada fração foram adicionados sobre a superfície da dieta (2 cm²) em cada poço. Cada parcela consistia em 16 poços. Posteriormente, as placas foram condicionadas em uma cabina de fluxo laminar até que o líquido secasse e, em seguida, uma larva neonata de *S. frugiperda* foi transferida para cada poço e selada com adesivo. Imediatamente, as placas foram transferidas para câmaras com ar condicionado, com temperatura de 27°C ± 2 e fotoperíodo de 14:10 h L:D. Ao longo de sete dias, o aspecto visual do desenvolvimento e da mortalidade das larvas foi avaliado; assim, a taxa de mortalidade foi calculada usando a fórmula de Abbott como mortalidade (%) = [(C-T) / C] × 100, em que C é o número de larvas vivas nas amostras de controle e T representa o número de larvas vivas nos tratamentos. As diferenças estatísticas entre os tratamentos (frações) foram analisadas por ANOVA unidirecional e teste HSD de Tukey (p < 0,05). O meio LB esterilizado foi usado como controle negativo. O experimento foi realizado em triplicata.

2.3.5. Identificação molecular do isolado bacteriano JBC02

2.3.5.1. Extração e amplificação do DNA

Para identificar o isolado bacteriano, ele foi cultivado em um meio líquido LB e incubado a 30°C, 150 r.p.m., por 24 h. O DNA total foi extraído usando o QIAGEN Dneasy Minikit (Hilden, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante; a integridade do DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose e a quantificação usando o espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo® Scientific, Massachusetts, USA). Posteriormente, a amplificação do DNA foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene 16S rRNA, fD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') e rD1 (5'-CCCGGG ATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC - 3') (Weisburg et al., 1991).

2.3.5.2. Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e análise filogenética

O produto amplificado foi então analisado em um sequenciador capilar modelo ABI 3130 - Perkin Elmer utilizando o kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing de acordo com as recomendações do fabricante. As sequências obtidas foram submetidas a consultas de similaridade de nucleotídeos no banco de dados GenBank acessado através do site do NCBI ("National Center for Biotechnology Information"), utilizando a ferramenta local BLAST - "Basic Local Alignment Search Tools". Foram analisadas as sequências do gene 16S rRNA do isolado e sequências representativas de espécies de Burkholderia de acordo com a List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - LPSN (Euzeby, J.P., 1997), disponível no banco de dados GenBank (Sayers et al., 2021), para isso as sequências obtidas foram alinhadas com mafft (<https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>).

As extremidades foram aparadas e as "lacunas" externas foram preenchidas com Ns. A inferência filogenética usando a abordagem de máxima verossimilhança foi realizada com o programa IQ-TREE (v.1.5.5) (Nguvent et al., 2015), definindo as opções -m TEST alrt 1000 -bb 1000000. A árvore de consenso foi visualizada e editada com o programa iTOL (Letunic et al., 2021).

2.4. Resultados e discussão

2.4.1. Sequenciamento do gene 16S rRNA e análise filogenética da cepa JBC02

A análise de sequência com a ferramenta BLASTn do gene 16S rRNA (1466 bp) da cepa JBC02 mostrou 100% de similaridade com a cepa BPM (CP050021.1) de *Burkholderia thailandensis* quando comparada ao banco de dados GenBank (consulte o Suplemento S1). Da mesma forma, a construção da árvore filogenética com 37 espécies de *Burkholderia* mostrou que a cepa JBC02 está intimamente relacionada à *Burkholderia thailandensis* BD10-00323 (NR 118629.1) e à *Burkholderia thailandensis* E264 (NR 116051.1) (Figura 1). Portanto, com base na sequência parcial do gene 16S rRNA, infere-se que a cepa JBC02 pertence ao gênero *Burkholderia* e está próxima da espécie *thailandensis*; no entanto, é necessário um estudo mais aprofundado para determinar a espécie. A sequência de JBC02 foi depositada no GenBank sob o número de acesso OM735580.1. Para formar o grupo externo da árvore, foram utilizadas as sequências de *Pandoraea norimbergensis* (Y09879), *Pandoraea apista* (AF139173) e *Pandoraea pulmonicola* (AF139175).

Burkholderia é um grupo bacteriano composto por mais de 100 espécies, heterogêneo e, pela análise filogenética, é classificado como polifilético, portanto, é considerado um gênero bacteriano taxonomicamente controverso (Estrada-De Los Santos et al., 2013; Beukes et al., 2017; Estrada-De Los Santos et al., 2013; Beukes et al., 2017). A identificação das espécies desse gênero representa um desafio, uma vez que alguns isolados de *Burkholderia* são fenotipicamente indistinguíveis, apesar de serem distintos em nível de DNA, indicando que o uso de ensaios fenotípicos para a classificação de indivíduos desse gênero não representa uma alternativa viável; Por outro lado, os métodos moleculares, como o uso de genes conservados, como a análise de 16S rRNA, e o sequenciamento de genes housekeeping, como *lepA* e *recA*, constituem uma ferramenta essencial para a identificação de organismos *Burkholderia*, pois permitem uma aproximação da identidade taxonômica do isolado bacteriano estudado. É aconselhável realizar o sequenciamento do genoma para aumentar a precisão da

identificação (Beukes et al., 2017b; Parke & Gurian-Sherman, 2003; Carrión et al., 2018).

2.4.2. Obtenção do extrato seco e, análise e separação cromatográfica

Após o cultivo do JBC02 e a centrifugação da cultura, foram obtidos aproximadamente 3,77 L de sobrenadante, dos quais, por meio de extração líquido-líquido com EtOAc, concentração em um rotoevaporador e secagem, foram obtidos 0,4961 g de extrato bruto, equivalente a 131,5 mg/mL. O extrato obtido foi submetido a SPE e diluído a uma concentração de 10 mg/mL para realizar execuções cromatográficas exploratórias.

Figura 1. Árvore filogenética de máxima verossimilhança com base nas sequências de 16S rRNA do JBC02 e de outras cepas de *Burkholderia*. As cores verde, amarela e azul indicam os valores mínimo, médio e máximo de bootstrap, respectivamente.

O perfil cromatográfico do extrato seco foi obtido por TLC. Usando acetato de etila, metanol, acetona e ácido acético como solventes para a migração dos compostos, foram utilizadas nove diferentes fases moveis, sendo Rc-1, Rc-2 e Rc-3, as condições compostas de apenas dois solventes (acetato de etila e metanol), e as outras condições compostas de três a quatro solventes. As condições Rc-1 e Rc-2 apresentaram perfis semelhantes, porém as bandas, principalmente em Rc-1, não eram tão definidas; também mostraram perfis semelhantes, apresentando uma banda principal de coloração marrom Rc-5, Rc-6 e Rc-7, a condição Rc-8 (97:02:01 acetato de etila: metanol: ácido acético) foi a que apresentou a melhor resolução entre as 3 bandas principais observadas no extrato. Cabe ressaltar que tais bandas não foram observadas no meio de cultura (CK), confirmando que correspondem a metabolitos produzidos pelo isolado bacteriano. (Figura 2).

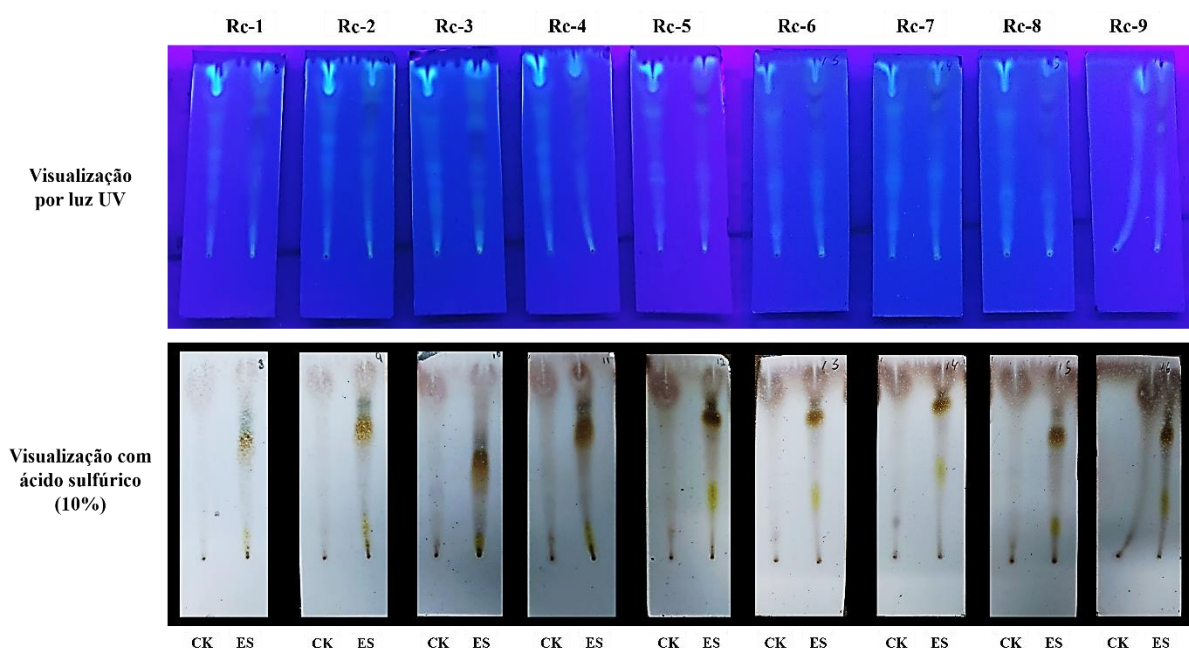


Figura 2. Perfil de impressão digital TLC do extrato seco de *Burkholderia* JBC02 em diferentes condições de corrida. CK representa o controle (meio de cultura LB) e ES representa o extrato seco. Condições cromatográficas: cromatoplaças de sílica gel (0,20 mm) com 7 cm de comprimento; volume de aplicação 20 µl; concentração do extrato 10 mg/mL; composição das fases móveis, Rc-1 - 95:05 acetato de etila: metanol; Rc-2 - 93:07 acetato de etila: metanol; Rc-3 - 98:02 acetato de etila: metanol; Rc-4 - 85:12:03 acetato de etila: acetona: metanol; Rc-5 - 75:24:01 acetato de etila: acetona: ácido acético; Rc-6 - 94:05:01 acetato de etila: metanol: ácido acético; Rc-7 -

92:07:01 acetato de etila: metanol: ácido acético; Rc-8 - 97:02:01 acetato de etila: metanol: ácido acético; Rc-9 - 84:12:03:01 acetato de etila: acetona: metanol: ácido acético

Após sucessivos ajustes nas condições cromatográficas (% B e gradiente), a melhor resolução dos componentes do extrato foi obtida pelo Gradiente 18 (0 a 15 min, 5 a 70% B; 15 a 35 min, 70 a 80% B; 35 a 36 min, 80 a 100% B; 36 a 45 min, 100% B.; 45 a 46 min, 100 a 5% B; A: água acidificada com 2% de ácido acético; B: metanol), que foi fracionada em sete tempos de coleta (Figura 3). Em seguida, cada uma das sete frações coletadas foi submetida a bioensaios com larvas neonatas de *S. fugiperda* e, após sete dias de avaliação, a fração HPLC-I 05 foi responsável pela maior mortalidade (Tabela 2).

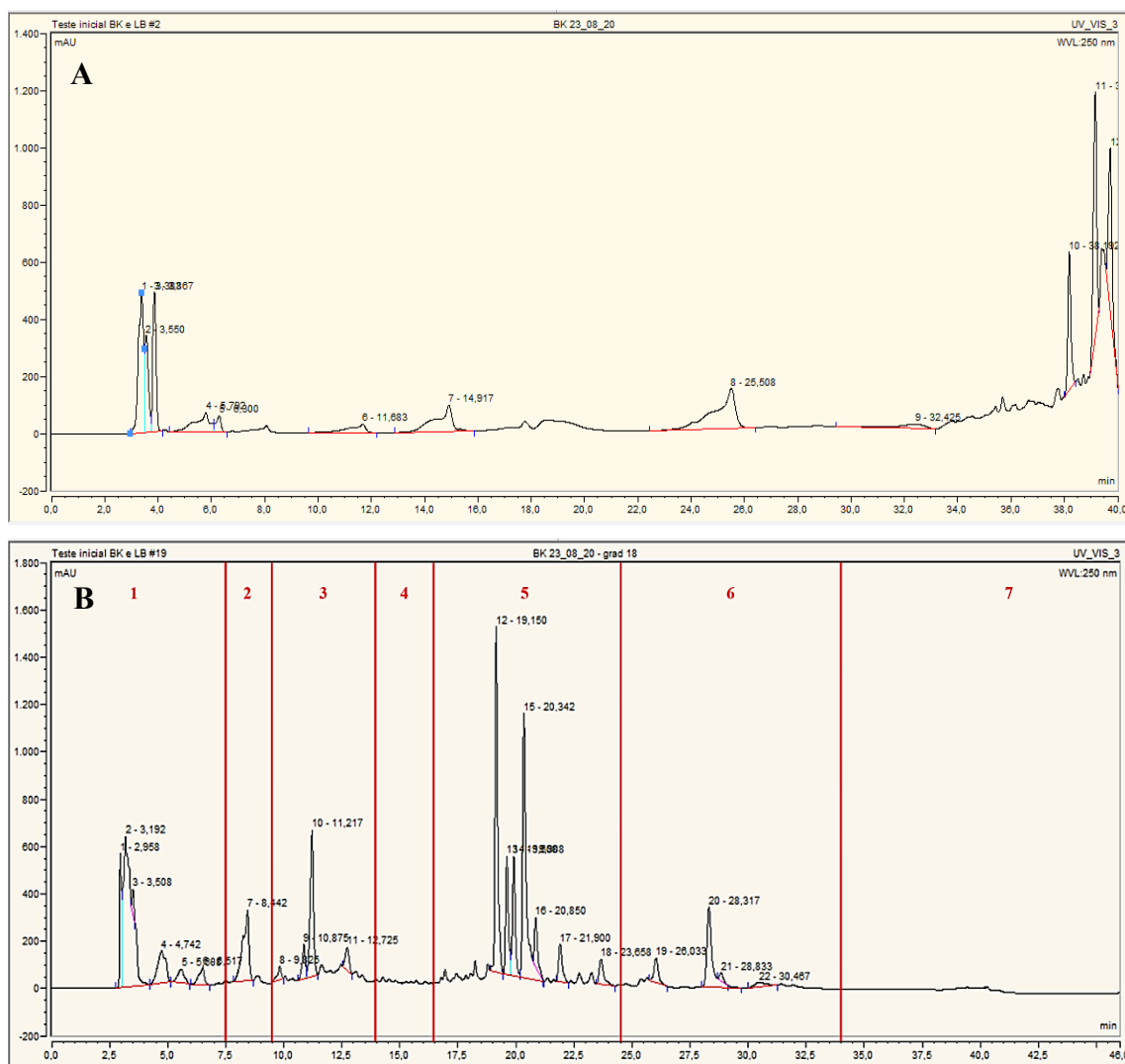


Figura 3. Perfil cromatográfico obtido do extrato seco de *Burkholderia* JBC02; **(A):** Cromatograma de HPLC obtido usando condições iniciais; **(B):** Fracionamento cromatográfico utilizando o Gradiente 18 (0 a 15 min, 5 a 70% B; 15 a 35 min, 70 a 80% B; 35 a 36 min, 80 a 100% B; 36 a 45 min, 100% B; 45 a 46 min, 100 a 5% B; A: água acidificada com 2% de ácido acético; B: metanol); divisão de acordo com o agrupamento de picos: HPLC-I 01 (0 - 7,5 min), HPLC-I 02 (7,5 - 9,5 min), HPLC-I 03 (9,5 - 14 min), HPLC-I 04 (14 - 16,5 min), HPLC-I 05 (16,5 - 24,5 min), HPLC-I 06 (24,5 - 34 min) e HPLC-I 07 (34 - 45 min).

Com base nos resultados obtidos no bioensaio em que as frações HPLC-I 01-07 foram usadas, o extrato seco foi submetido a SPE (SPE-I), utilizando eluentes que permitam a concentração dos componentes do extrato correspondentes a fração ativa HPLC-I 05. Assim, foram obtidas quatro frações (SPE-I 01: MeOH:H₂O 5:95; SPE-I 02: MeOH:H₂O 50:50; SPE-I 03: MeOH:H₂O 95:5; SPE-I 04: MeOH:H₂O 100:0) que, após serem submetidas à análise cromatográfica usando o Gradiente 18, determinou-se que a fração SPE-I 03 apresentava um perfil muito próximo ao da fração HPLC-I 05 (Figura 5) e era responsável pela alta mortalidade (Tabela 1; Figura 4).

A partir dos resultados acima, foi realizada uma SPE (SPE-II), em que a eluição com metanol:água 50:50 (SPE-II 01) permitiu a remoção dos componentes polares inativos e a eluição com metanol:água 75:25 concentrou os componentes ativos na fração SPE-II 02; os componentes inativos menos polares foram eluídos na fração SPE-II 03 (metanol:água 95:05) ou foram retidos no cartucho da SPE (C18).

Tabela 1 - Mortalidade e aspecto do desenvolvimento de *S. frugiperda* quando exposta às quatro frações obtidas por SPE (SPE-I) após 7 dias de crescimento larval. Controle LB (meio de cultura não inoculado).

Tratamento	Mortalidade (%)	Aspecto de desenvolvimento
SPE-I 01	0	Normal
SPE-I 02	0	Fortemente reduzido
SPE-I 03	100	Morto
SPE-I 04	0	Normal

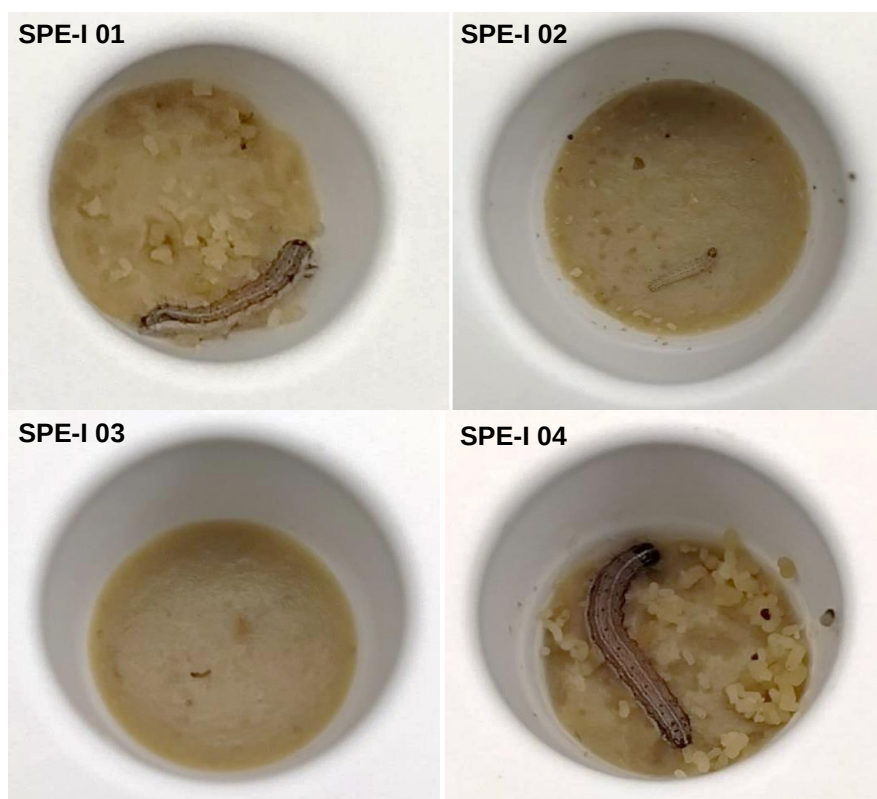


Figura 4. Bioensaio com *S. frugiperda* quando exposta às frações SPE-I 01: MeOH:H₂O 5:95; SPE-I 02: MeOH:H₂O 50:50; SPE-I 03: MeOH:H₂O 95:5; SPE-I 04: MeOH:H₂O 100:0 após 7 dias de crescimento larval.

A fração SPE-II 02, responsável pela atividade inseticida, foi submetida a um processo de otimização de gradiente cromatográfico, em que a melhor separação dos componentes foi obtida com o Gradiente 31 (0 - 10 min, 61% B; 10 - 35 min, 61 - 80% B; 35 - 36 min, 80 - 100% B; 36 - 40 min, 100% B; 40 - 41 min, 100 - 61% B; A: água acidificada com 2% de ácido acético; B: metanol). As análises por HPLC-PDA detectaram oito picos principais (HPLC-II 01-08), que foram coletados em frações (Figura 6 e 7) para avaliar sua atividade inseticida por bioensaio (Figura 9).

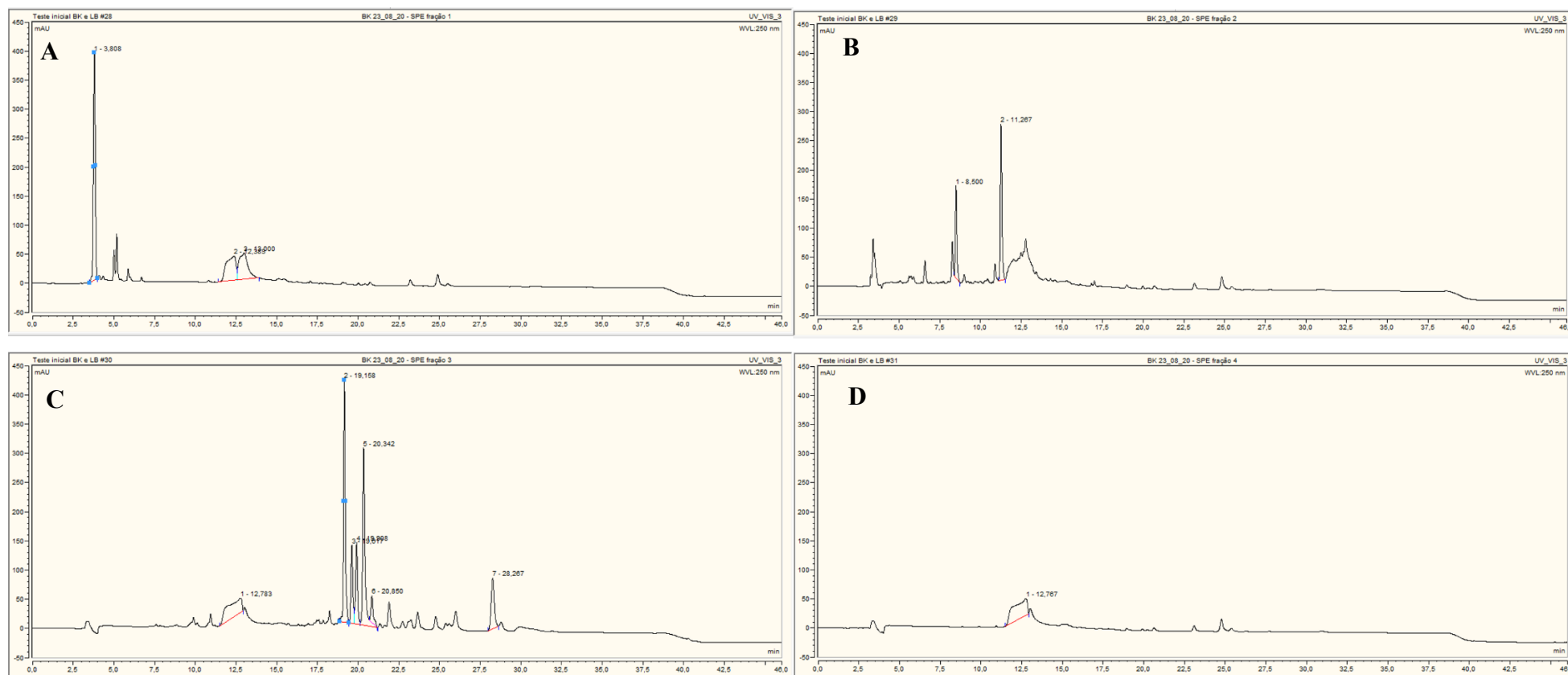


Figura 5. Perfis cromatográficos das quatro frações obtidas do extrato seco de *Burkholderia* JBC02 após serem submetidas à separação por SPE utilizando diferentes eluentes e análise subsequente por HPLC usando o Gradiente 18 (0 a 15 min, 5 a 70% B; 15 a 35 min, 70 a 80% B; 35 a 36 min, 80 a 100% B; 36 a 45 min, 100% B; 45 a 46 min, 100 a 5% B; A: água acidificada com 2% de ácido acético; B: metanol); (A): SPE-I 01 eluída com MeOH:H₂O (5:95); (B): SPE-I 02 eluída com MeOH:H₂O (50:50); (C): SPE-I 03 eluída com MeOH:H₂O (95:5); (D): SPE-I 04 eluída com MeOH:H₂O (100:0).

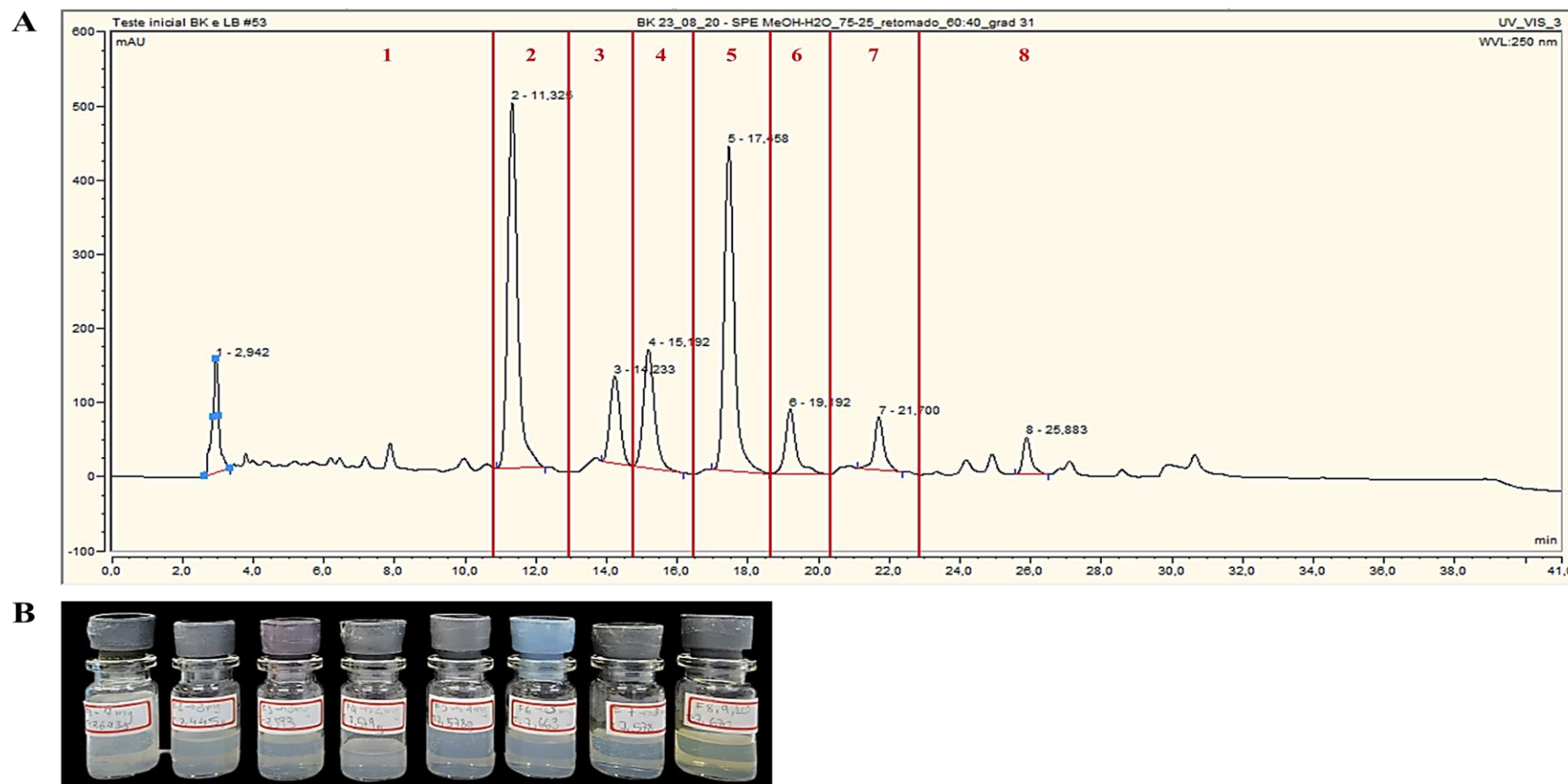


Figura 6. Fracionamento do perfil cromatográfico para coleta de picos usando o Gradiente 31 (0 a 10 min, 61% B; 10 a 35 min, 51 a 80% B; 35 a 36 min, 80 a 100% B; 36 a 40 min, 100% B; 40 a 41 min, 100 a 61% B); **(A):** Frações formadas de acordo com o agrupamento de picos: HPLC-II 01 (0 - 10,8 min), HPLC-II 02 (10,8 - 12,9 min), HPLC-II 03 (12,9 - 14,6 min), HPLC-II 04 (14,6 - 16,5 min), HPLC-II 05 (16,5 - 18,6 min), HPLC-II 06 (18,6 - 20,3 min), HPLC-II 07 (20,3 - 22,9 min) e HPLC-II 08 (22,9 - 41 min); **(B):** Frações coletadas, usadas nos bioensaios.

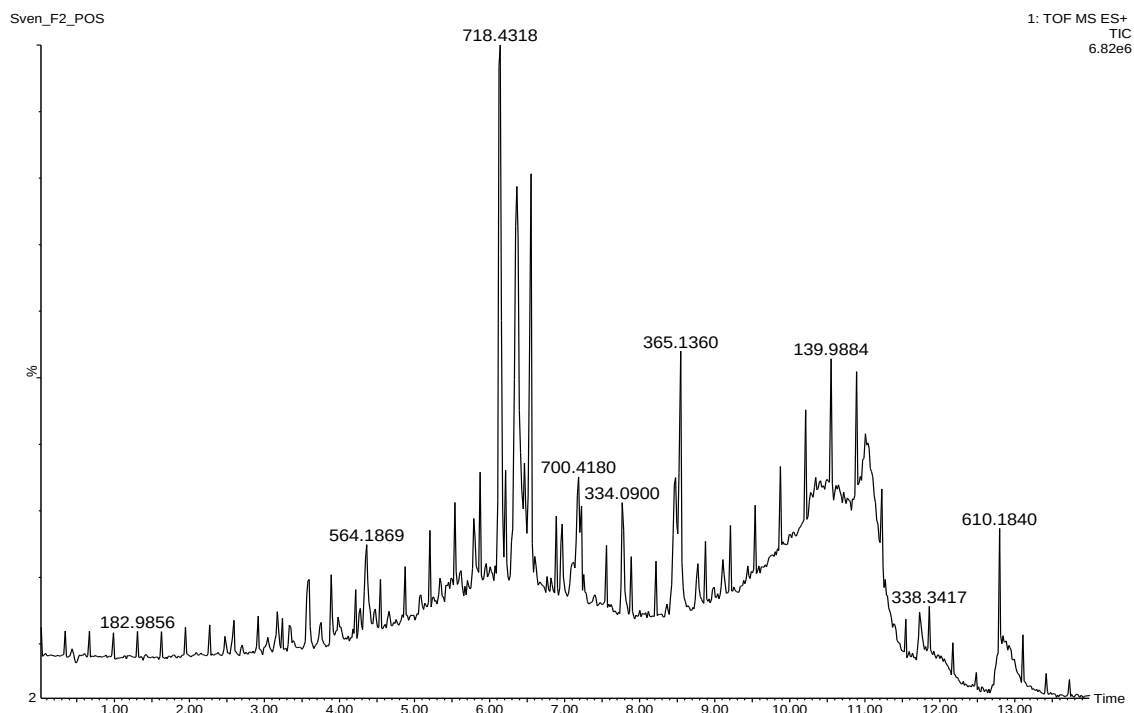


Figura 7. Cromatogramas ESI+ (TIC) da fração SPE-II 02 do extrato de *Burkholderia* JBC02. Análise em UPLC-ESI-MS, coluna ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 μ m, operando em modo gradiente com água acidificada 0,1% ác. fórmico(A): acetonitrila acidificada 0,1% ác. fórmico (B), 5-100% B de 0-10min, e mantendo isocraticamente de 10-14 min em 100% B, vazão 0,5 mL/min, volume de injeção 0,3 μ L.

O espectro de massas do pico de interesse HPLC-II 02 (Figura 8A), que apresentou bioatividade nos bioensaios contra lagarta-do-cartucho, e é o composto majoritário da fração HPLC-II 02, apresentou pico com valor de m/z de 718,4317 no modo positivo, confirmando a fórmula molecular $C_{43}H_{59}NO_8$ (erro menor que 5 ppm). Essa massa e fórmula moleculares sugerem que o pico HPLC-II 02 corresponda a substância tailandamida (Figura 8B), isolada previamente de espécies do gênero *Burkholderia* spp. (Ishida et al., 2010; Ishida; Lincke; Hertweck, 2012; Wozniak et al., 2018). A confirmação da identificação será realizada a partir de dados espectrométricos obtidos por RMN de 1H e ^{13}C .

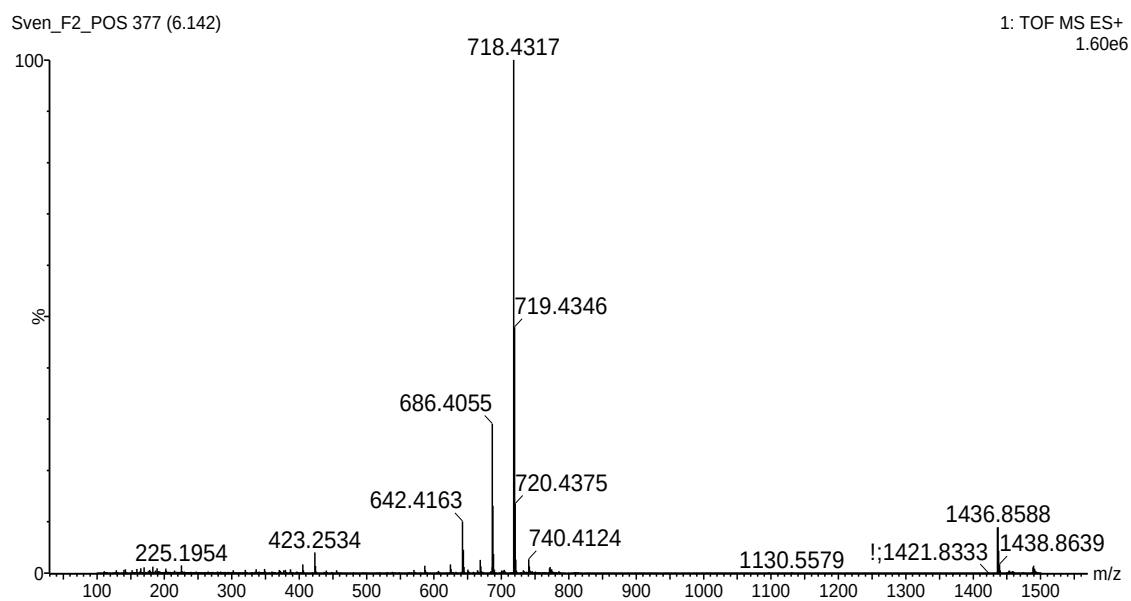
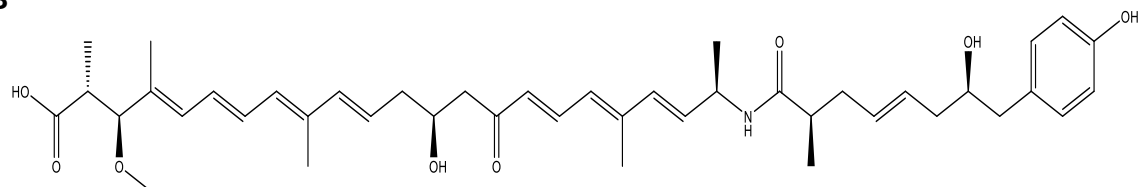
A**B**

Figura 8. A: Espectro de massas ESI+ (MS2) do pico de interesse da fração HPLC-II 02 do extrato de *Burkholderia* JBC02. (tR de 6,14 min); **B:** Estrutura da tailandamida.

2.4.3. Atividade inseticida de frações cromatográficas contra *Spodoptera frugiperda*

Das sete frações coletadas do Gradiente 18, as frações HPLC-I 04 e HPLC-I 05 apresentaram uma mortalidade de 56 e 100%, respectivamente. Além disso, foram observadas alterações no aspecto do desenvolvimento, em nível de tamanho e cor, nas larvas tratadas com as frações HPLC-I 04 e HPLC-I 03 (Tabela 2).

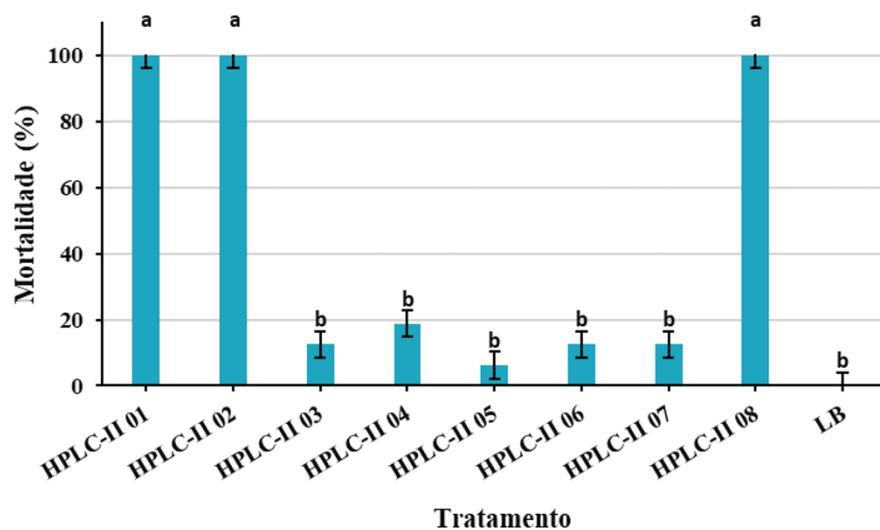
Tabela 2 - Mortalidade e aspecto do desenvolvimento de *S. frugiperda* obtidos das 7 frações coletadas na separação por HPLC e controle LB (meio de cultura não inoculado).

Tratamento	Mortalidade (%)	Aspecto de desenvolvimento
HPLC-I 01	0	Normal
HPLC-I 02	0	Normal
HPLC-I 03	0	Ligeiramente reduzido
HPLC-I 04	56	Fortemente reduzido
HPLC-I 05	100	Morto
HPLC-I 06	0	Normal
HPLC-I 07	0	Normal
LB	0	Normal

As frações que apresentaram bioatividade contra as larvas da lagarta do cartucho foram HPLC-II 01, HPLC-II 02 e HPLC-II 08 após a análise de HPLC usando o Gradiente 31, com 100% de mortalidade em todos os casos. O HPLC-II 05 teve a menor mortalidade (6%), seguido pelo HPLC-II 03, HPLC-II 06 e HPLC-II 07 com 13% e HPLC-II 04 com 19% de mortalidade (Figura 9). Também inferimos que a mortalidade registrada nas frações HPLC-II 01 e HPLC-II 08 é o resultado da presença de outras biomoléculas com atividade inseticida.

Os gêneros bacterianos, como *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Streptomyces* spp. etc., são amplamente utilizados como agentes de controle biológico (Bonaterra et al, 2022), no entanto, nos últimos anos, o gênero *Burkholderia* tem despertado grande interesse para ser usado na proteção de culturas contra fitopatógenos e insetos-praga por produzir metabólitos secundários abundantes (Elshafie & Camele, 2021; Kunakom & Eustáquio, 2019). Isso é demonstrado por Elshafie et al. (2012) quando determinaram que a *Burkholderia gladioli* pv. *Agaricicola* possui atividade antifúngica contra vários fungos fitopatogênicos, incluindo *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*, sendo um metabólito, classificado como um terpeno cíclico, o responsável por essa atividade; No mesmo contexto, o estearato de metila e o 2-butoxi fosfato de etanol foram identificados como os metabólitos difusíveis responsáveis pela atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora cactorum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum* e *Penicillium expansum*, produzidos por quatro cepas *Burkholderia gladioli* pv. *Agaricicola* (Elshafie, Racioppi, et al., 2017), da mesma forma, as mesmas cepas de *Burkholderia* foram empregadas para avaliar sua capacidade de controlar a doença da murcha do tomate causada por *Verticillium dahliae*, usando metabólitos secundários (Elshafie, Sakr, et al., 2017).

A



B

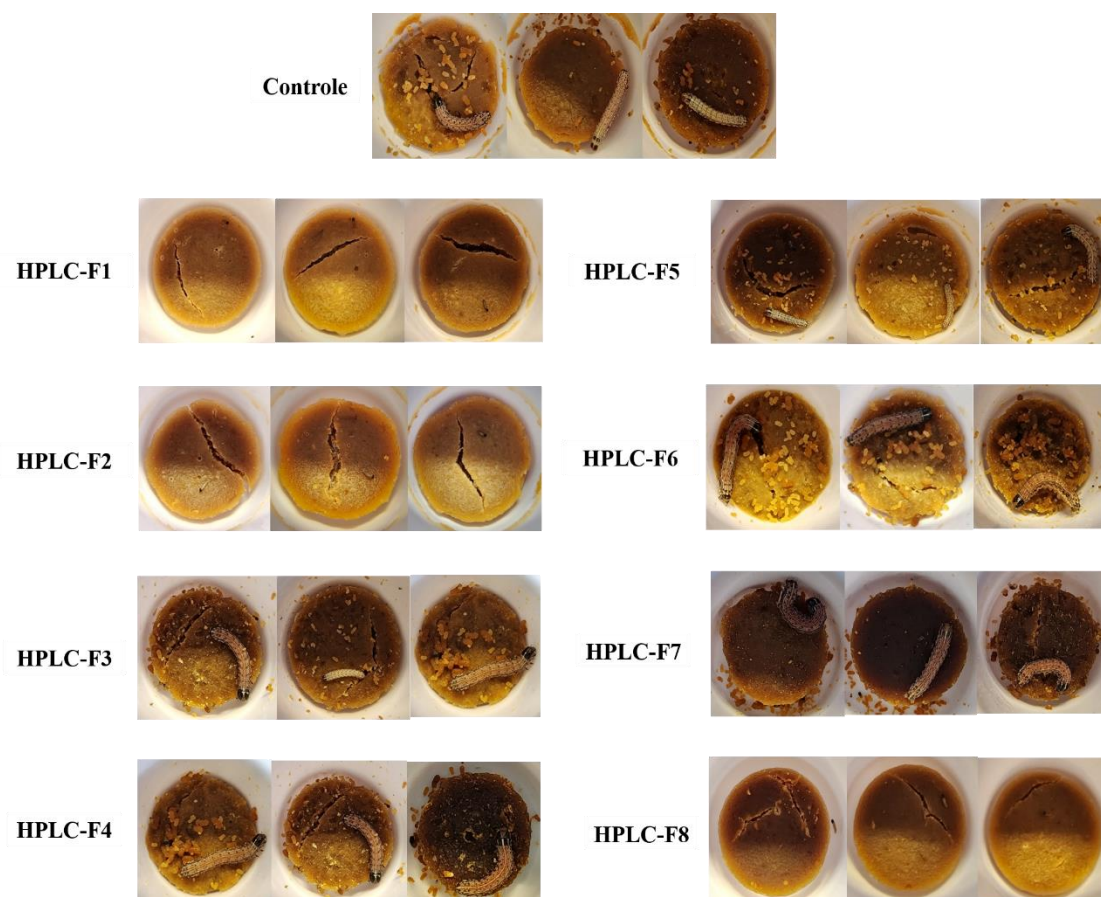


Figura 9. Atividade inseticida das frações obtidas da análise de HPLC usando o Gradiente 31: **(A)** Mortalidade relatada das oito frações cromatográficas isoladas. As barras de erro são exibidas. Letras diferentes mostram significância estatística. **(B)** Bioensaio com *S. frugiperda* após 7 dias de desenvolvimento larval.

Em geral, os metabólitos produzidos pelo gênero *Burkholderia* podem ser classificados em sete grupos: Peptídeos não ribossômicos, Peptídeos híbridos policetídeos-não ribossômicos, Derivados da via do chiquimato, Policetídeos, Peptídeos sintetizados ribossomalmente e modificados pós-traducionalmente (RiPPs), Polímeros, Terpenos e um grupo classificado como outros compostos/desconhecidos. Essa grande diversidade de compostos confere a esse gênero bacteriano um alto potencial biotecnológico (Depoorter et al., 2016; Kunakom & Eustáquio, 2019).

Vários estudos demonstraram a capacidade de moléculas bioativas produzidas por *Burkholderia* para o controle de fungos fitopatogênicos; no entanto, há poucas informações sobre o potencial desse gênero bacteriano para combater insetos-praga usando metabólitos secundários. Em nosso trabalho, isolamos/purificamos metabólitos secundários produzidos pela *Burkholderia* JBC02 presentes no sobrenadante livre de células com atividade inseticida, realizando bioensaios com larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda*. Os metabólitos apresentaram controle da praga gerando 100% de mortalidade, demonstrando seu grande potencial como agente de controle biológico.

2.5. Conclusões

Assim, concluímos que a *Burkholderia* JBC02 tem um alto potencial para se tornar um novo agente de controle biológico devido ao seu efeito inseticida, bem como que o isolamento/purificação de metabólitos secundários de isolados bacterianos representa uma abordagem atraente para a bioprospecção de moléculas com atividade de biocontrole

2.6. Informações de suporte

Suplemento S1

Tabela S1 - Alinhamento do isolado JBC02 com sequências de nucleotídeos do banco de dados do NCBI. As cinco primeiras sequências com o mais alto grau de similaridade são mostradas.

Nome científico	Max Score	Total Score	Cobertura	E-value	Per. Ident	Acesso
<i>Burkholderia thailandensis</i> strain BPM	2708	2708	100%	0.0	100.00%	CP050021.1
<i>Burkholderia thailandensis</i> strain FDAARGOS_242	2708	8104	100%	0.0	100.00%	CP022217.1
<i>Burkholderia thailandensis</i> strain FDAARGOS_237	2708	8117	100%	0.0	100.00%	CP020390.1
<i>Burkholderia thailandensis</i> strain MSMB59	2708	2708	100%	0.0	100.00%	CP013408.1
<i>Burkholderia thailandensis</i> 2002721643	2708	2708	100%	0.0	100.00%	CP009602.1

Referências

- Abbott, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Am. Mosq. Control Assoc*, 1987, 3, 302–303
- Alam, K., Zhao, Y., Lu, X., Gong, K., Zhong, L., Hao, J., ... & Li, A. Isolation, complete genome sequencing and in silico genome mining of *Burkholderia* for secondary metabolites. **BMC microbiology**, 2022, 22(1), 1-11.
- Araújo, F. D. D. S., Araújo, W. L., & Eberlin, M. N. Potential of *Burkholderia seminalis* TC3. 4.2 R3 as biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* evaluated by mass spectrometry imaging. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, 2017, 28(5), 901-907.
- Beukes, Chrizelle W., et al. "Genome data provides high support for generic boundaries in *Burkholderia* sensu lato." **Frontiers in microbiology**, 2017, 8: 1154.
- Bonaterra, Anna, et al. "Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases." **Microorganisms**, 2022, 10.9: 1759.
- Burtet, L. M., Bernardi, O., Melo, A. A., Pes, M. P., Strahl, T. T., & Guedes, J. V. Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. **Pest management science**, 2017, 73(12), 2569-2577.
- Carr, G., Poulsen, M., Klassen, J. L., Hou, Y., Wyche, T. P., Bugni, T. S., ... & Clardy, J. Microtermolides A and B from termite-associated *Streptomyces* sp. and structural revision of vinylamycin. **Organic letters**, 2012, 14(11), 2822-2825.
- Carrión, Víctor J., et al. "Involvement of *Burkholderiaceae* and sulfurous volatiles in disease-suppressive soils." **The ISME journal**, 2018, 12.9: 2307-2321.
- Chattopadhyay, P., Banerjee, G., & Mukherjee, S. Recent trends of modern bacterial insecticides for pest control practice in integrated crop management system. **3 Biotech**, 2017, 7, 1-11.
- Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clement, C., & Ait Barka, E. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. **FEMS microbiology reviews**, 2008, 32(4), 607-626.
- Cordova-Kreylos, A. L., Fernandez, L. E., Koivunen, M., Yang, A., Flor-Weiler, L., & Marrone, P. G. Isolation and characterization of *Burkholderia rinojensis* sp. nov., a non-*Burkholderia cepacia* complex soil bacterium with insecticidal and miticidal activities. **Applied and Environmental Microbiology**, 2013, 79(24), 7669-7678.

de Freitas Bueno, R. C. O., de Freitas Bueno, A., Moscardi, F., Postali Parra, J. R., & Hoffmann-Campo, C. B. Lepidopteran larva consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions. **Pest Management Science**, 2011, 67(2), 170-174.

Elshafie, Hazem S., and Ippolito Camele. "An overview of metabolic activity, beneficial and pathogenic aspects of Burkholderia Spp." **Metabolites**, 2021, 11.5: 321.

Elshafie, Hazem S., et al. "An attempt of biocontrol the tomato-wilt disease caused by *Verticillium dahliae* using *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* and its bioactive secondary metabolites." **International Journal of Plant Biology**, 2017, 8.1: 7263.

Elshafie, Hazem S., et al. "In vitro antifungal activity of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* against some phytopathogenic fungi." **International Journal of Molecular Sciences**, 2012, 13.12: 16291-16302.

Elshafie, Hazem S., et al. "In vitro study of biological activity of four strains of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* and identification of their bioactive metabolites using GC–MS." **Saudi journal of biological sciences**, 2017, 24.2: 295-301.

Estrada-De Los Santos, Paulina, et al. "Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis." **Current microbiology**, 2013, 67: 51-60.

Euzéby, Jean Paul. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 1997, 47.2: 590-592.

Farias, J. R., Andow, D. A., Horikoshi, R. J., Sorgatto, R. J., Fresia, P., dos Santos, A. C., & Omoto, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop protection**, 2014, 64, 150-158.

Ganiger, P. C., Yeshwanth, H. M., Muralimohan, K., Vinay, N., Kumar, A. R. V., & Chandrashekara, K. Occurrence of the new invasive pest, fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), in the maize fields of Karnataka, India. **Current Science**, 2018, 115(4), 621-623.

Gassmann, A. J., Petzold-Maxwell, J. L., Keweshan, R. S., & Dunbar, M. W. Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm. **PloS one**, 2011, 6(7), e22629.

Glare, T. R., Jurat-Fuentes, J. L., & O'callaghan, M. Basic and applied research: entomopathogenic bacteria. In: Microbial control of insect and mite pests. **Academic press**, 2017. p. 47-67.

Goergen, G., Kumar, P. L., Sankung, S. B., Togola, A., & Tamò, M. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. **PloS one**, 2016, 11(10), e0165632.

Greene, G. L., N. C. Leppla, and W. A. Dickerson. "Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium." **Journal of economic entomology**, 1976 69.4: 487-488.

Hardke, J. T., Lorenz III, G. M., & Leonard, B. R. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) ecology in southeastern cotton. **Journal of Integrated Pest Management**, 2015, 6(1), 10.

Ishida, Keishi; Lincke, Thorger; Hertweck, Christian. Assembly and Absolute Configuration of Short-Lived Polyketides from *Burkholderia thailandensis*. **Angewandte Chemie**, 2012, v. 124, n. 22, p. 5566-5570.

ISHIDA, Keishi Et Al. Induced biosynthesis of cryptic polyketide metabolites in a *Burkholderia thailandensis* quorum sensing mutant. **Journal of the American Chemical Society**, 2010, v. 132, n. 40, p. 13966-13968.

Jeong, Y., Kim, J., Kim, S., Kang, Y., Nagamatsu, T., & Hwang, I. Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. **Plant disease**, 2003, 87(8), 890-895.

Kim, H., Rim, S. O., & Bae, H. Antimicrobial potential of metabolites extracted from ginseng bacterial endophyte *Burkholderia stabilis* against ginseng pathogens. **Biological Control**, 2019, 128, 24-30.

Kunakom, S., & Eustáquio, A. S. *Burkholderia* as a source of natural products. **Journal of natural products**, 2019, 82(7), 2018-2037.

Leeman, M., Den Ouden, F. M., Van Pelt, J. A., Dirkx, F. P. M., Steijl, H., Bakker, P. A. H. M., & Schippers, B. Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, 1996, 86(2), 149-155.

Letunic, I., & Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Nucleic acids research**, 2021, 49.W1, W293-W296.

Lin, Y. T., Lee, C. C., Leu, W. M., Wu, J. J., Huang, Y. C., & Meng, M. Fungicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Burkholderia gladioli* strain BBB-01. **Molecules**, 2021, 26(3), 745.

Liu, F., Xu, Z., Zhu, Y. C., Huang, F., Wang, Y., Li, H., ... & Shen, J. Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing Bt cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. **Pest Management Science: Formerly Pesticide Science**, 2010, 66(2), 155-161.

Mahenthiralingam, E., Baldwin, A., & Dowson, C. G. Burkholderia cepacia complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. **Journal of applied microbiology**, 2008, 104(6), 1539-1551.

Montezano, D. G., Sosa-Gómez, D. R., Specht, A., Roque-Specht, V. F., Sousa-Silva, J. C., Paula-Moraes, S. D., ... & Hunt, T. E. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African entomology**, 2018, 26(2), 286-300.

Morita, Yasuhiro, et al. Biological activity of tropolone. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 2003, vol. 26, no 10, p. 1487-1490.

Mota-Sanchez, D.; Wise, J. Arthropod Pesticide Resistance Database. Available online: <https://www.pesticideresistance.org/> (acessado em 23 de fevereiro de 2023) .

Mullins, A. J., Murray, J. A., Bull, M. J., Jenner, M., Jones, C., Webster, G., ... & Mahenthiralingam, E. Genome mining identifies cepacin as a plant-protective metabolite of the biopesticidal bacterium *Burkholderia ambifaria*. **Nature Microbiology**, 2019, 4(6), 996-1005.

Nagoshi, R. N., Rosas-García, N. M., Meagher, R. L., Fleischer, S. J., Westbrook, J. K., Sappington, T. W., ... & Murúa, G. M. Haplotype profile comparisons between *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Mexico with those from Puerto Rico, South America, and the United States and their implications to migratory behavior. **Journal of economic entomology**, 2015, 108(1), 135-144.

Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular biology and evolution**, 2015, 32.1, 268-274.

Oh, D. C., Poulsen, M., Currie, C. R., & Clardy, J. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. **Nature Chemical Biology**, 2009, 5(6), 391-393.

Oh, D. C., Poulsen, M., Currie, C. R., & Clardy, J. Sceliphrolactam, a polyene macrocyclic lactam from a wasp-associated *Streptomyces* sp. **Organic letters**, 2011, 13(4), 752-755.

Parke, Jennifer L., and Doug Gurian-Sherman. "Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains." **Annual review of phytopathology**, 2001, 39.1: 225-258.

Péchy-Tarr, M., Bruck, D. J., Maurhofer, M., Fischer, E., Vogne, C., & Henkels, M. D. Molecular analysis of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of *Pseudomonas fluorescens*. **Environ Microbiol**, 2008, 10: 2368–2386.

Ruiu, L. Plant-growth-promoting bacteria (PGPB) against insects and other agricultural pests. **Agronomy**, 2020, 10(6), 861.

Ruiu, L.. Insect pathogenic bacteria in integrated pest management. **Insects**, 2015, 6(2), 352-367.

Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Pruitt, K. D., Schoch, C. L., Sherry, S. T., & Karsch-Mizrachi, I. GenBank. **Nucleic acids research**, 2022, 50(D1), D161.

Van Rensburg, J. B. J. First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. **South African Journal of Plant and Soil**, 2007, 24(3), 147-151.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, 1991, 173.2, 697-703.

Wozniak, Christopher E. et al. Thailandamide, a fatty acid synthesis antibiotic that is coexpressed with a resistant target gene. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2018, v. 62, n. 9, p. 10.1128/aac. 00463-18.

Xu, Z., Wang, M., Du, J., Huang, T., Liu, J., Dong, T., & Chen, Y. Isolation of *Burkholderia* sp. HQB-1, a promising biocontrol bacteria to protect banana against *Fusarium* wilt through phenazine-1-carboxylic acid secretion. **Frontiers in Microbiology**, 2020, 11, 605152.

3. CAPÍTULO 3 – Atividade antagônica de substâncias difusíveis e de compostos orgânicos voláteis (VOCs) produzido por *Burkholderia* JBC02 contra fungos patógenos de plantas.

3.1. Resumo

Atualmente, o controle de doenças causadas por fungos fitopatogênicos é feito principalmente pelo uso de fungicidas sintéticos, mas o uso prolongado e inadequado desses produtos tem gerado efeitos negativos. Em resposta a essa preocupação, estratégias alternativas, como o uso de microrganismos antagônicos e suas moléculas bioativas, têm sido adotadas no manejo integrado de pragas nas últimas décadas. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito antagônico *in vitro* da *Burkholderia* JBC02, por meio da liberação de substâncias difusíveis e compostos orgânicos voláteis (VOCs), em vários fungos fitopatogênicos e seu impacto na estrutura micelial. O isolado bacteriano produziu enzimas hidrolíticas, como proteases, celulasas, amilases, etc., além disso, mostrou um efeito antagônico ao inibir, em mais de 50%, o desenvolvimento de oito fungos fitopatogênicos, tendo uma maior atividade antifúngica sobre *Fusarium* spp. (70%) e *S. sclerotiorum* (74%), o efeito de biocontrole foi corroborado pela visualização, por meio de SEM, de micélios distorcidos, desidratados e com superfície rugosa. O JBC02 também foi capaz de inibir o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Macrophomina phaseolina* por meio da liberação de VOCs. Os resultados *in vitro* obtidos ao confrontar *Burkholderia* JBC02 com vários fungos fitopatogênicos indicam que esse isolado bacteriano possui dois mecanismos de ação. Por um lado, produz moléculas ativas que se difundem no meio de cultura e, por outro lado, libera compostos orgânicos voláteis (VOCs). Essas características tornam a cepa bacteriana multivalente e promissora para o desenvolvimento de bioinsumos específicos

Palavras-chave: controle biológico, antagonismo, atividade antifúngica, VOCs, *Burkholderia*.

Abstract - Currently, the control of diseases caused by phytopathogenic fungi is done mainly by the use of synthetic fungicides, but the prolonged and inappropriate use of these products has generated negative effects. In response to this concern, alternative strategies, such as the use of antagonistic microorganisms and their bioactive molecules, have been adopted in integrated pest management in the last decades. The objective of this study was to investigate the *in vitro* antagonistic effect of *Burkholderia* JBC02, through the release of diffusible substances and volatile organic compounds (VOCs), on various phytopathogenic fungi and its impact on mycelial structure. The bacterial isolate produced hydrolytic enzymes, such as proteases, cellulases, amylases, etc., moreover, it showed an antagonistic effect by inhibiting, by more than 50%, the development of eight phytopathogenic fungi, having a higher antifungal activity on *Fusarium* spp. (70%) and *S. sclerotiorum* (74%), the biocontrol effect was corroborated by the visualization, by means of SEM, of distorted mycelia, dehydrated and with rough surface. JBC02 was also able to inhibit the mycelial growth of *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* and *Macrophomina phaseolina* through the release of VOCs. The *in vitro* results obtained by confronting *Burkholderia* JBC02 with several phytopathogenic fungi indicate that this bacterial isolate possesses two mechanisms of action. On the one hand, it produces active molecules that diffuse into the culture medium, and on the other hand, it releases volatile organic compounds (VOCs). These characteristics make the bacterial strain multivalent and promising for the development of specific bioinsuements

Keywords: *biological control, antagonism, antifungal activity, VOCs, Burkholderia.*

Resumo gráfico

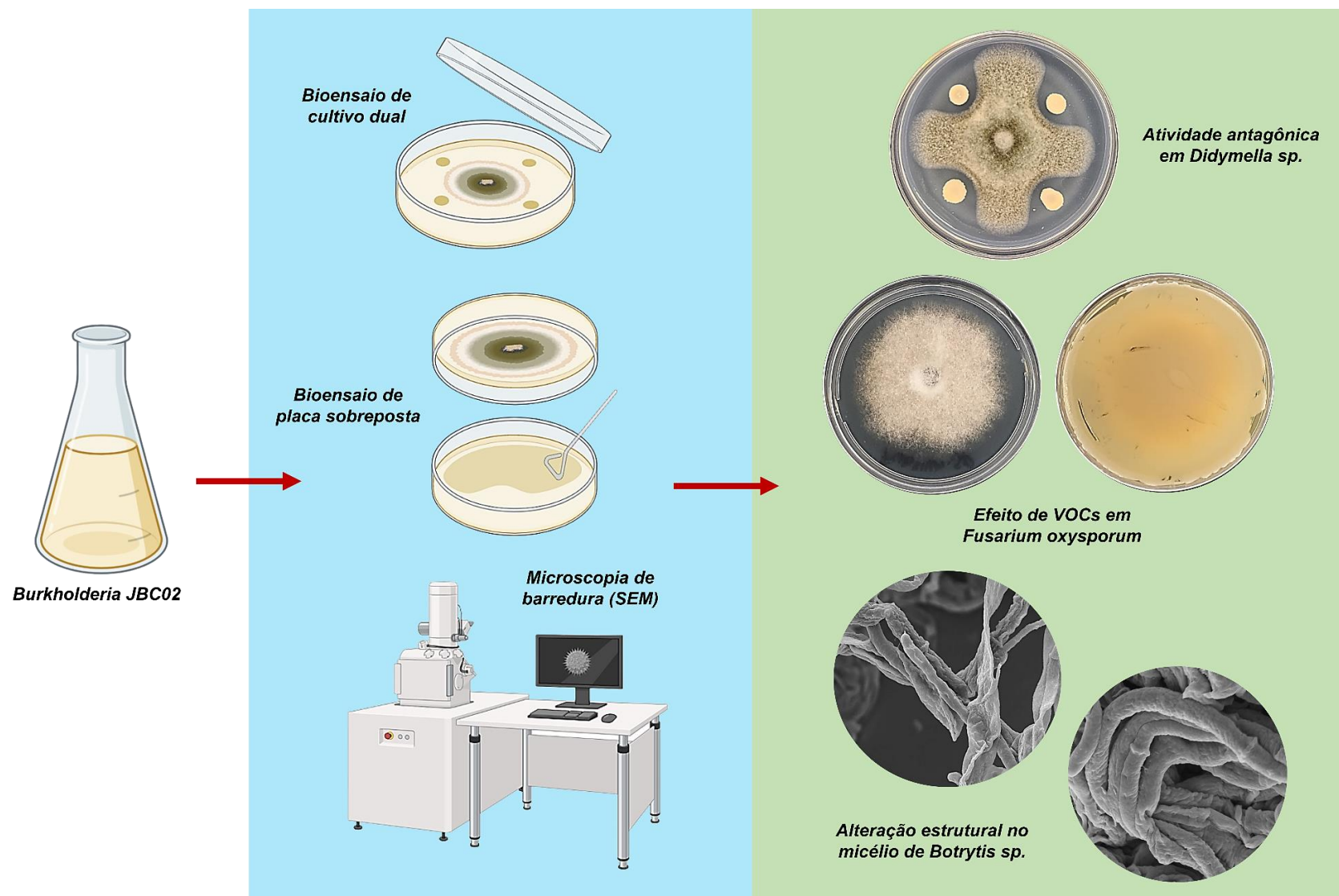


Imagem desenvolvida com BioRender.com

3.2. Introdução

Os fungos fitopatogênicos foram listados como os principais agentes causais de doenças de plantas, ameaçando o setor agrícola em todo o mundo (Dean et al., 2012; Doehlemann et al., 2017; Strange & Scott, 2005). Atualmente, o controle de doenças causadas por agentes fúngicos se baseia principalmente no uso de fungicidas sintéticos, por serem considerados uma medida simples e eficiente (Maluin et al., 2019). No entanto, o uso prolongado e inadequado de fungicidas químicos tem causado vários efeitos negativos, como toxicidade para plantas, animais e seres humanos, contaminação ambiental e o surgimento de microrganismos patogênicos resistentes aos ingredientes ativos dos produtos comerciais. (Ansari et al., 2021a; Parnell et al., 2007). Essa preocupação com os efeitos secundários gerou, nas últimas décadas, nos agricultores/produtores, a adoção de nossas estratégias, como a remediação de solos contaminados, o cultivo misto e a rotação de culturas, bem como o uso de microrganismos antagônicos e suas moléculas bioativas, tornando-se um elemento fundamental no manejo integrado de pragas e os pilares dos negócios de base biológica (Baker et al., 2020; Berg et al., 2013; Wohlgemuth et al., 2021).

Microrganismos antagonistas, também chamados de agentes de controle biológico, desempenham um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento das plantas, na melhoria da resistência das plantas a fatores bióticos e abióticos e na inibição de microrganismos fitopatogênicos (Baccari et al., 2019; Carrión et al., 2019; Zehra et al., 2021). Várias espécies de gêneros bacterianos, como *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, etc., foram estudadas e usadas para o controle de diversos fungos patogênicos de plantas (Boukaew et al., 2022; Zhu et al., 2022), por exemplo, o *Bacillus cereus* BcD1 suprimiu o crescimento micelial do *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense Tropical Race 4 por meio de compostos antifúngicos difusíveis e voláteis (Tsai et al., 2023), também, as cepas BE17 e BE24 do gênero *Burkholderia* inibiram o crescimento de *Botrytis cinerea*, o agente causador da doença do mofo cinzento em videiras (*Vitis vinifera* L.) (Ansari et al., 2021b; Esmaeel et al., 2020). Da mesma

forma, o crescimento de *Magnaporthe oryzae*, *Gibberella fujikuroi*, *Sarocladium oryzae*, *Phellinus noxius* e *Colletotrichum fructicola* foi restringido pela liberação de compostos voláteis produzidos por *Burkholderia gladioli* BBB-01 (Lin et al., 2021).

O gênero *Burkholderia* tornou-se um recurso emergente devido à sua capacidade de induzir a produção de hormônios vegetais, atividade de fixação de nitrogênio e produção de compostos bioativos antagônicos e enzimas hidrolíticas, como celulases, amilases, celulasas etc. (Alam et al., 2022; J. H. Chen et al., 2020; Eberl & Vandamme, 2016; Kandel et al., 2017). Por exemplo, *Burkholderia cenocepacia* ETR-B22, inibiu o crescimento e causou a morte celular de hifas de *Botrytis cinérea* (J. Chen et al., 2022) , um efeito semelhante foi registrado por Magalhães et al. (2017), que observaram que dezesseis cepas de *Burkholderia* produziram enzimas líticas, secretaram compostos difusíveis e liberaram compostos orgânicos voláteis, que afetaram o crescimento micelial e a germinação de esporos de *Aspergillus niger*.

Em vista do exposto, objetivou-se estudar o efeito antagônico *in vitro* do *Burkholderia* JBC02 por meio de substâncias difusíveis e compostos orgânicos voláteis (VOCs), e seu efeito na estrutura micelar, sobre vários fungos fitopatogênicos.

3.3. Materiais e Métodos

3.3.1. Condições de cultura

O isolado bacteriano JBC02, armazenado no banco “*Jaboticabal Biological Control*” do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (UNESP /FCAV), foi cultivado em meio Luria-Bertani (LB) e incubado a 30°C e 150 rpm por 24 horas. Condições de cultura usadas para todas as análises.

3.3.2. Atividade de enzimas hidrolíticas extracelulares

Em placas de Petri com meio específico para cada enzima, foram inoculados 10 µl de cultura bacteriana em quatro pontos equidistantes, em seguida, as placas foram deixadas em uma incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a 25°C. Depois de 2 a 3 dias, as placas foram fotografadas para registrar a atividade enzimática. Os meios de cultura com substrato específico para cada enzima foram os seguintes (em g/L):

3.3.2.1. Atividade de Protease

O meio Difco™ Skim Milk (BD Life Sciences, New Jersey, USA) foi usado de acordo com as especificações do fabricante e autoclavado por 20 minutos a 121°C. Após a incubação, a atividade positiva da protease foi identificada por um halo de lise translúcido no meio de cultura.

3.3.2.2. Atividade de Celulase

A metodologia descrita por Pretscher et al. (2018) foi seguida com algumas modificações. Em água deionizada, 10,0 g de carboximetilcelulose (CMC), 10,0 g de triptona, 5,0 g de extrato de levedura, 10,0 g de NaCl e 10,0 g de ágar foram solubilizados, ajustados para pH 7,0 e autoclavados por 20 min a 121°C. Para avaliação, a placa Petri foi tratada com uma solução de vermelho Congo 0,2% (p/v), até que sua superfície fosse coberta, por 10 min depois, descolorida com várias aplicações de NaCl 1 M. A formação de uma zona clara ao redor das colônias foi considerada como um resultado positivo da atividade enzimática.

3.3.2.3. Atividade de Amilase

Foi determinada usando a metodologia estabelecida por Hossain et al. (2020), ao suplementar o meio de cultura com amido solúvel, no qual 20,0 g de amido, 10,0 g de peptona, 10,0 g de extrato de levedura e 10,0 g de ágar foram solubilizados em água deionizada e autoclavados (20 minutos a 121°C). Para avaliar a atividade enzimática, uma solução de Lugol (0,3 g de iodo e 0,6 g de KI/L) foi vertida na placa de Petri; após 3-5 min de interação com a solução de Lugol, a mesma foi descartada e a placa foi deixada em repouso por pelo menos 30 min. A presença de um halo claro ao redor das colônias foi considerada como atividade de amilase positiva.

3.3.2.4. Atividade de Esterase e Lipase

A metodologia descrita por Ramnath et al. (2017) foi seguida, com algumas modificações, na qual NaCl (5,0 g), peptona (10,0 g), CaCl₂·2H₂O (0,1 g) e ágar (10,0 g) foram solubilizados com água deionizada e 10 ml (v/v) de Tween 20 (para esterase) e Tween 80 (para lipase) foram adicionados. A formação de precipitados brancos ao redor das colônias foi considerada como um resultado positivo para a atividade enzimática.

3.3.3. Avaliação da atividade antagônica do isolado JBC02

Os fungos fitopatogênicos usados nos bioensaios de atividade antagônica estão listados no material suplementar (suplemento S1).

3.3.3.1. Ensaio de cultivo dual

A atividade antagonista do JBC02 contra os fungos fitopatogênicos selecionados foi determinada pela técnica de cultura dual in vitro, seguindo a metodologia descrita por Baptista et al. (2022) com pequenas modificações. Discos de ágar (≈5 mm de diâmetro) de cultura fúngica (cultivados por 7 dias) foram colocados no centro de placas de Petri (9 cm de diâmetro) com BDA e, em seguida, a 2 cm do disco micelial fúngico, 10 µl da suspensão de JBC02 foram inoculados em quatro pontos equidistantes (Figura 2A). Placas de Petri inoculadas apenas com fungos fitopatogênicos foram usadas como controles negativos. As placas foram incubadas a 25 ± 1°C por 5 a 7 dias e, em seguida,

a porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) foi calculada usando a fórmula:

$$\text{ICM (\%)} = ((C - T) / C) * 100$$

Onde C representa o crescimento radial do micélio nas placas de controle e T representa o crescimento radial do micélio nos tratamentos. O experimento foi realizado em triplicata.

3.3.3.2. Inibição do crescimento micelial por VOCs

Os efeitos dos compostos orgânicos voláteis no crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* foram avaliados usando a metodologia descrita por Kong et al. (2022), com modificações. Em uma placa com meio de ágar LB, 100 ul de cultura bacteriana JBC02 foram inoculados em uma concentração de xxx UFC e, com uma alça de Drigalsky, foram espalhados por toda a superfície da placa. Da mesma forma, um disco (≈5 mm de diâmetro) de micélio de *F. oxysporum* (5 dias de idade) foi colocado no centro de uma placa de Petri com meio BDA e sobreposto à placa com JBC02 (Figura A1). Ambas placas foram hermeticamente fechadas com Parafilm® para evitar a perda dos voláteis produzidos. As placas com BDA contendo disco de *F. oxysporum* colocadas em placas de LB não inoculadas foram usadas como controles. Após 6 dias de incubação a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, a taxa de inibição do crescimento micelial (TIC) foi calculada (Liu et al., 2020). O experimento foi realizado três vezes.

$$\text{TIC (\%)} = ((\varnothing C - \varnothing T) / \varnothing C) * 100$$

O diâmetro da placa de controle e de tratamento é representado por $\varnothing C$ e $\varnothing T$, respectivamente.

3.3.3.3. Ensaio de folha destacada

Para avaliar o efeito do VOCs no desenvolvimento de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Macrophomina phaseolina*, foram cortadas folhas de soja (estágio V3) da linhagem BMX Valencia, depois esterilizadas com água destilada estéril e uma solução de hipoclorito de sódio a 10% (procedimento realizado três vezes), colocadas em papel toalha estéril em uma extremidade de uma placa de Petri bipartida (9 cm de diâmetro) e o

pecíolo coberto com algodão umedecido com água estéril. Em seguida, discos de ágar (≈ 5 mm de diâmetro) contendo micélio fúngico foram colocados sobre a folha e, no lado oposto da placa de Petri, 60 μ l de JBC02 foram inoculados e espalhados com uma alça de Drigalsky; por fim, as placas foram seladas com Parafilm® e incubadas em B.O.D. a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 a 7 dias. As placas sem inoculação bacteriana foram usadas como controle. A incidência da doença foi avaliada visualmente e o programa Fiji (Schindelin et al., 2012) foi usado para calcular a área e a porcentagem da lesão. O experimento foi repetido cinco vezes.

3.3.4. Alterações ultraestruturais de fungos patogênicos de plantas

A morfologia dos fungos usados no bioensaio de cultura dual foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os micélios fúngicos foram colhidos das placas de controle e tratamento e, em seguida, fixados por 18 h com glutaraldeído a 2,5% (Solarbio, Co. Ltd.) em tampão de cacodilato de sódio (0,1M). Usando o mesmo tampão, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% (Koch, São Paulo, Brasil) por 6 h a 4°C e depois desidratadas em soluções de etanol em gradiente de 30-100% (vol/vol). Por fim, as amostras foram secas em um (Autosamdri-815 Série A), em seguida, metalizadas em ouro (Denton Vacuum Desk-II) e finalmente visualizadas em um microscópio eletrônico de varredura Zeiss Evo MA10 (Carl-Zeiss-Stiftung, Oberkochen, Alemanha) a uma voltagem de 10KV.

3.3.5. Análise estatística

Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Turkey, definindo $p < 0,05$ para indicar diferenças estatísticas. O Microsoft Excel (versão 2019) foi usado para processar os dados.

3.4. Resultados e discussão

3.4.1. Atividade enzimática de *Burkholderia* JBC02

Burkholderia JBC02, quando inoculada em meio com substrato específico para cada enzima, apresentou atividade positiva para todas as cinco enzimas (Figura 1), sendo que as placas para avaliar a atividade de protease, celulase e amilase apresentaram os halos claros/translúcidos mais perceptíveis. No caso da atividade de esterase, a formação de pequenos precipitados ao redor das colônias foi evidente, enquanto um leve halo ao redor das colônias bacterianas foi visível na placa de lipase.

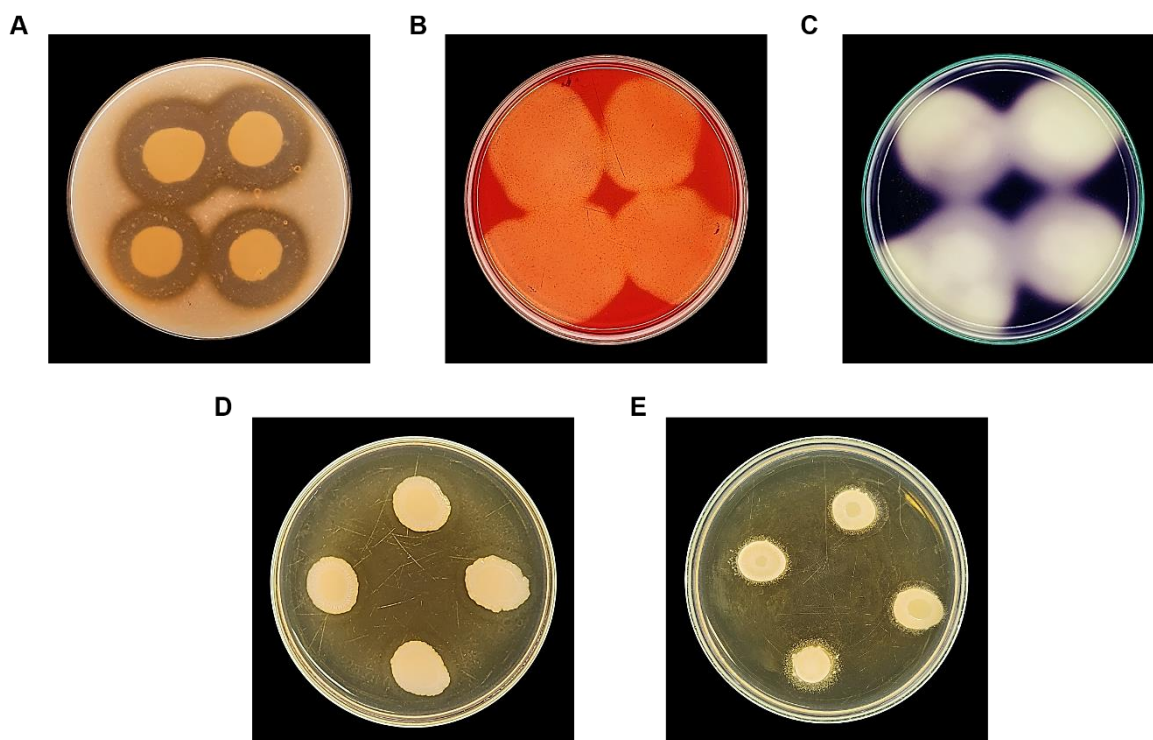


Figura 1. Enzimas hidrolíticas produzidas pelo isolado bacteriano JBC02; Placas mostram a atividade de: **A** – Protease, **B** – Celulase, **C** – Amilase, **D** - Lipase e **E** – Esterase.

A produção de enzimas hidrolíticas é considerada um dos mecanismos de controle direto dos “*Biological Control Agent*” (BCAs), uma vez que, sendo produzidas pelos próprios BCAs, essas enzimas podem atuar diretamente nas estruturas de insetos-praga e patógenos de plantas

(Carmona-Hernandez et al., 2019; W.-L. Kong et al., 2020; Legein et al., 2020b). Entre o diverso arsenal enzimático estão as “*Cell Wall Degrading Enzymes*” (CWDEs), incluindo proteases, celulasas, amilases, glicosidases, esterases, quitinases etc. (Giovannoni et al., 2020), que induzem a abertura da parede celular e, conseqüentemente, desorganizam o citoplasma da célula-alvo (Köhl et al., 2019b). Assim, por exemplo, os agentes bacterianos se alimentam das paredes dos fungos, pois elas são compostas por glucanos (50-60%), proteínas (20-30%) e quitina (20%) (Spadaro & Droby, 2016b). No caso do gênero *Burkholderia*, estudos demonstraram a produção de protease, amilase, catalase, urease e fenilalanina desaminase, o que permite que este gênero bacteriano catalise e hidrolise a parede celular de fungos fitopatogênicos (Heo et al., 2022a; D. Wang et al., 2023a). Além da produção de enzimas líticas por BCAs, esses organismos também podem induzir a síntese de enzimas protetoras nas plantas, uma função catalogada como um mecanismo de biocontrole indireto (Legein et al., 2020b).

3.4.2. Atividade antifúngica de amplo espectro de *Burkholderia* JBC02

3.4.2.1. Antagonismos de substâncias difusíveis

A *Burkholderia* JBC02 apresentou uma inibição acentuada do crescimento fúngico quando foi co-inoculada com *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium verticillioides*, *Botrytis cinerea*, *Didymella bryoniae*, *Colletotrichum musae*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum*. Além disso, foi observada uma mudança na intensidade da cor no micélio de alguns fungos, como *Macrophomina phaseolina*, *F. oxysporum* e *C. gloeosporioides*, bem como uma mudança na coloração do micélio de *F. verticillioides*, de violeta claro (na placa de controle) para laranja avermelhado (no tratamento) (Figura 2B). Em relação ao ICM, em todos os tratamentos de cultura dupla, foi observada uma porcentagem de inibição do crescimento micelial acima de 50%, sendo o valor mais alto obtido de 74% em *S. sclerotiorum*, seguido de 70% para *F. oxysporum* e 57% para *Macrophomina phaseolina*, que obteve a menor porcentagem registrada. Além disso, determinou-se que o JBC02 não apresenta diferença estatisticamente significativa no controle do crescimento de *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium*

verticillioides, *Botrytis cinerea*, *Didymella bryoniae* e *Colletotrichum musae*, no entanto, se observou uma diferença quando confrontado com *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum* (Figura 3).

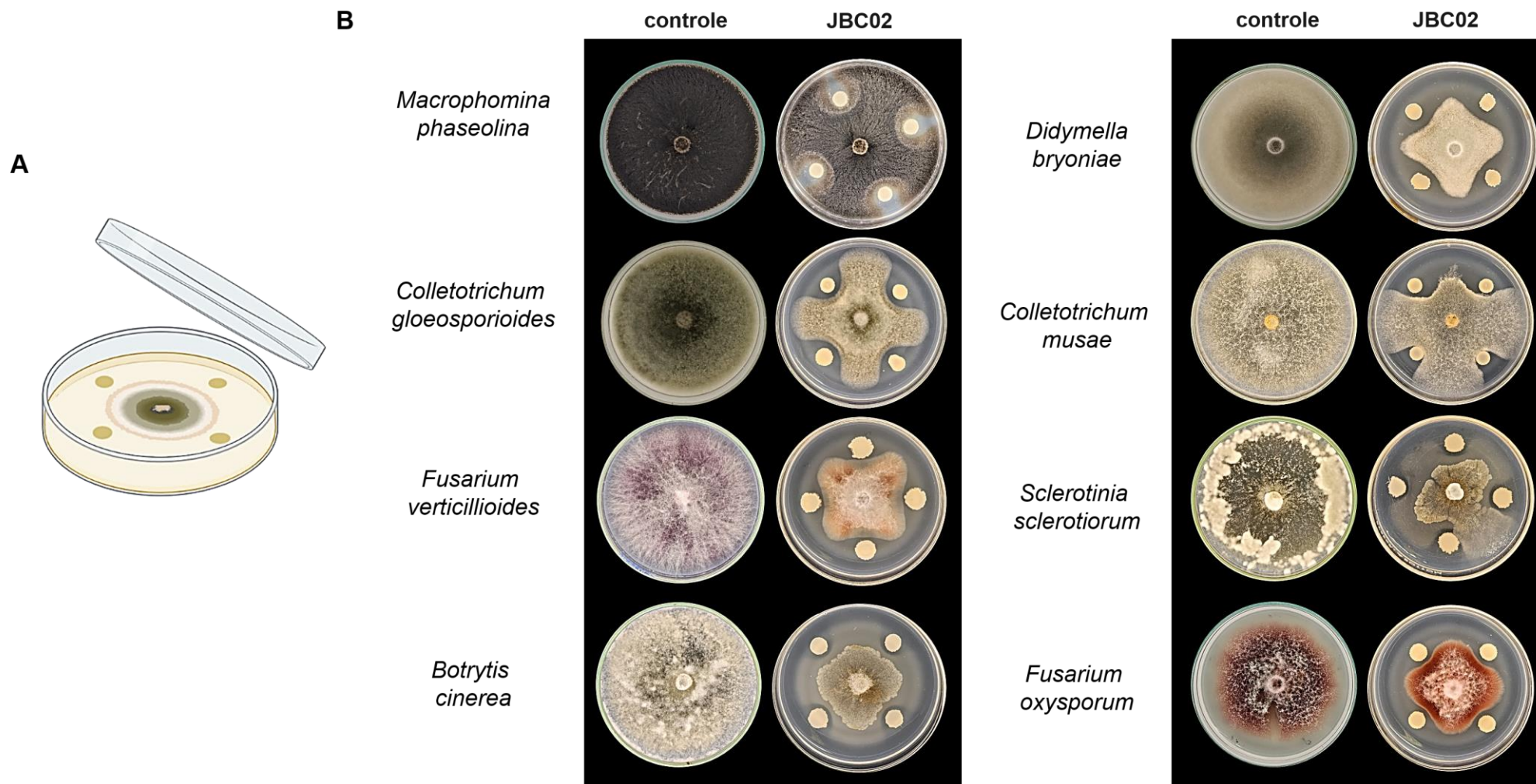


Figura 2. Atividade antagônica *in vitro* de *Burkholderia* JBC02: **A** – Representação esquemática da placa Petri para ensaio de cultivo dual; **B** – Bioensaio da atividade antifúngica de JBC02 sobre fungos patogênicos de plantas.

A formação da zona de inibição do crescimento micelial ao redor das colônias bacterianas pode ser atribuída à habilidade do JBC02 de competir com os fungos por recursos e nutrientes, além de sua capacidade de produzir compostos orgânicos voláteis, substâncias difusíveis, enzimas que degradam a parede celular e metabólitos secundários, como lipopeptídeos, antibióticos, sideróforos, biossurfactantes, amônia e cianeto (Bonaterra et al., 2022; Deng et al., 2016; Guevara-Avendaño et al., 2020; Hu & Young, 1998b; Lim et al., 2017). *Burkholderia* produz uma variedade de metabólitos secundários, incluindo sulfazecina, cepalicina, cepafungina, occidiofungina, rizoxina, cepacidina A, ácido burkholderico, tailandamidas, tailandepsinas (Bach et al., 2022; Depoorter et al., 2016b; Elshafie & Camele, 2021), bem como a pirrolnitrina e o catecol, que foram relatados como compostos antifúngicos, da *Burkholderia contaminans* NZ, ao agir sobre a *M. phaseolina* (Zaman et al., 2021), e a toxoflavina ao controlar o fungo *Sporisorium scitamineum*, quando produzida pela *Burkholderia gladioli* CGB10 (Cui et al., 2020).

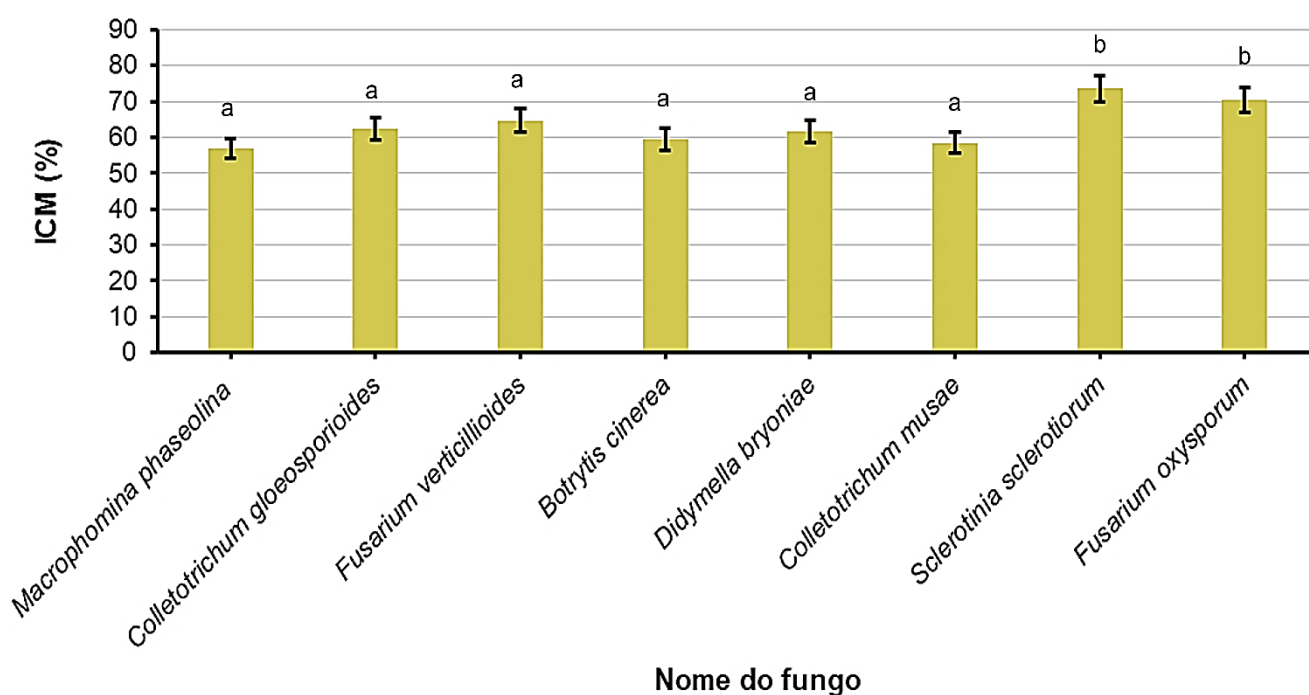


Figura 3. Porcentagem de inibição do crescimento micelar (ICM). Valores com letras iguais não diferem significativamente. As barras pretas representam o erro percentual.

Vários estudos relatam a função de biocontrole da *Burkholderia* spp. contra fungos patogênicos de plantas, por exemplo, Meng et al., (2023) relataram o efeito inibitório da bactéria endofítica *Burkholderia vietnamiensis* C12 contra nove fungos fitopatogênicos, incluindo *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium moniliforme* e duas formas especiais de *Fusarium oxysporum* (*niveum* e *lycopersico*); atividade semelhante observada para a *Burkholderia gladioli* KRS027, mostrando taxas de inibição acima de 50% contra sete dos fungos filamentosos de plantas mais comuns, como *Verticillium dahliae*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium oxysporum* (D. Wang et al., 2023b). Essa função de amplo espectro, também relatada em outros trabalhos (Elshafie et al., 2012; Li et al., 2019; Tagele et al., 2019), é observada no presente estudo; além disso, a porcentagem obtida por *Burkholderia* JBC02 sobre *M. phaseolina* 707 (57%), *B. cinerea* (59%), *Fusarium* spp. (70%) e *S. sclerotiorum* (74%), foi maior do que a relatada por Yang et al. (2020), Sarli et al. (2021) e Heo et al. (2022b) bem como, poucos são os trabalhos que informam o efeito antagônico de *Burkholderia* spp. contra *Dydimella* spp.

3.4.2.2. Efeito de VOCs no crescimento micelar

Um dos mecanismos relatados nos agentes de controle biológico é a produção de compostos voláteis (Almeida et al., 2023; Brilli et al., 2019; Carmona-Hernandez et al., 2019); assim, optou-se por avaliar se a *Burkholderia* JBC02 apresentava esse mecanismo, para o qual o isolado bacteriano foi confrontado com *Fusarium oxysporum* usando placas sobrepostas (Figura 4A), obtendo como resultado uma inibição de 33% do crescimento fúngico, bem como uma mudança na cor do micélio (Figura 4B). Esse mecanismo também foi evidenciado em quatro cepas de *Burkholderia gladioli* pv. *agricola*, mostrando 30-40% de inibição sobre *F. oxysporum* e *R. solani* (Elshafie et al., 2012), da mesma forma, Garbeva et al. (2014) observaram que as cepas *Burkholderia sediminicola* AD003, *Burkholderia cepacia* P44 e *Burkholderia* sp. afetaram forte/moderadamente o crescimento de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* e *Fusarium solani* por meio da liberação de compostos voláteis.



Figure 4. Efeito antifúngico de VOCs liberados pela *Burkholderia* JBC02: **A** – Esquematização de placas sobrepostas (“sandwich model”) para avaliar o efeito dos VOCs; **B** – Redução do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Além, decidiu-se avaliar se os VOCs liberados por *Burkholderia* JBC02 tinham o mesmo efeito quando os fungos infestavam o tecido vegetal (patogenicidade ativa). Ao inocular discos de fungos fitopatogênicos em crescimento ativo em folhas de soja no estágio V3, o desenvolvimento e o progresso das doenças causadas por *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Macrophomina phaseolina* foram inibidos com eficácia pelos VOCs produzidos pela *Burkholderia* JBC02 (Figure 5).

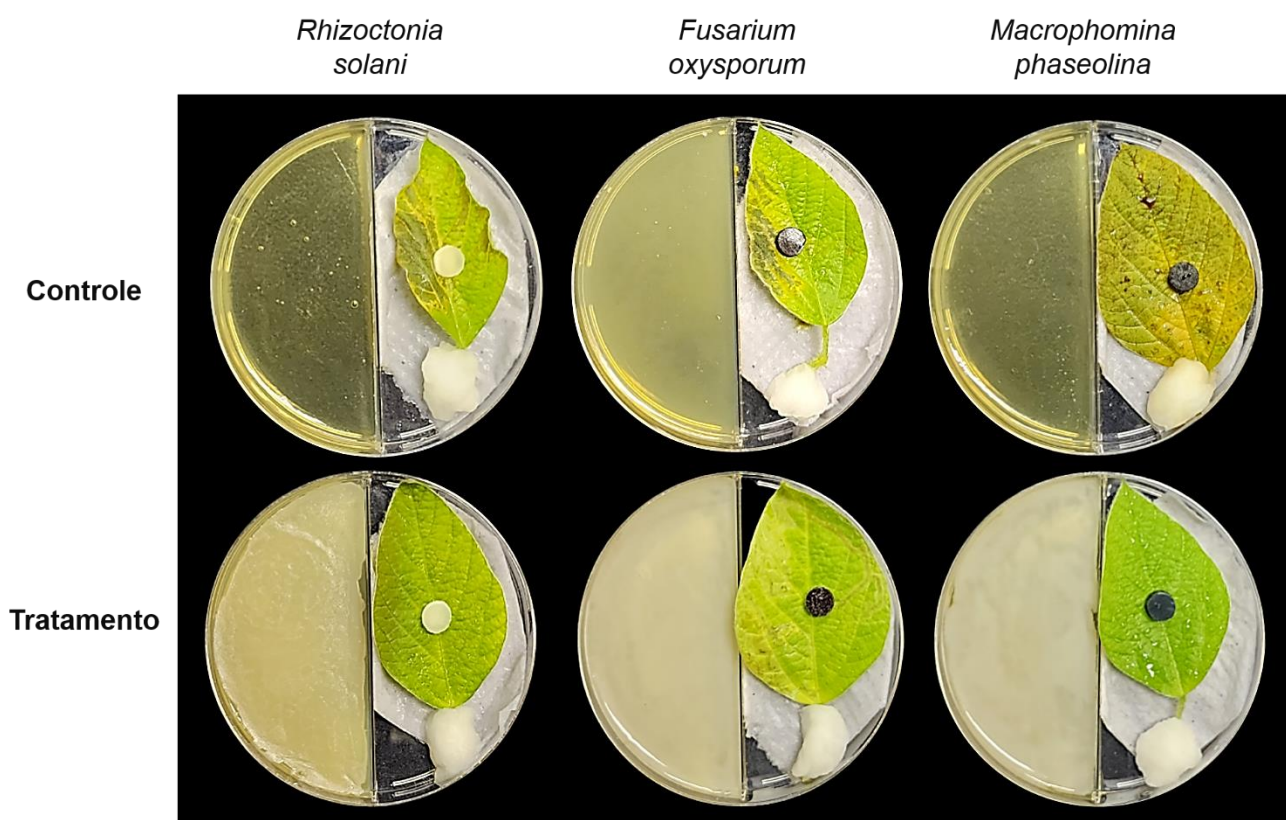


Figura 5. Efeito antagônico de VOCs produzidos por *Burkholderia* JB02 no desenvolvimento de sintomas de podridão radicular, podridão vermelha da raiz e podridão carbonácea em folhas de soja.

Como mostra a Figura 6, a *Burkholderia* JBC02 apresentou uma redução expressiva no desenvolvimento de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Macrophomina phaseolina*, ao não apresentar sinais das doenças nas folhas do tratamento, situação diferente da visualizada nas folhas do controle, com lesões médias de 418 mm², 370 mm² e 589 mm² para *R. solani*, *F. oxysporum* e *M. phaseolina*, respectivamente; além disso, a

aplicação do JBC02 apresentou diferença significativa no controle de cada um dos fungos fitopatogênicos. A área das lesões, quando convertida em valores percentuais, foi de 33,6% em *R. solani*, 28,8% em *F. oxysporum* e 28,9% em *M. phaseolina*, sendo que essas duas últimas porcentagens mostram alta similaridade, pois as folhas, apesar de estarem no mesmo estágio de desenvolvimento, variaram em área.

Em *Burkholderia* vários compostos orgânicos voláteis têm sido relatados com atividade antifúngica, por exemplo, antranilato de metila, salicilato de metila, benzoato de metila, propionato de benzila, acetato de benzila, 3,5-Di-tert-butilfenol, éter alilbenzílico, benzoato de benzila, trissulfeto de dimetila, ácido nonanóico, 2-pentadecanona, 3-hexen-1-ol, benzoato, (Z), dissulfeto de dimetila, 2,5-dimetilfurano, ácido acético, hexadecanoato de metila, éter isobutílico, tolueno, tetracloroetileno, metilciclohexano, valerato de etila, D-limoneno etc. (A. Liu et al., 2020; Rodríguez-Cisneros et al., 2023; Tenorio-Salgado et al., 2013a); assim, presume-se que alguns dos compostos mencionados acima sejam responsáveis pela inibição dos patógenos fúngicos das plantas neste estudo; no entanto, são necessários estudos de extração em fase sólida (EFS) e cromatografia gasosa para determinar os VOCs produzidos pela *Burkholderia* JBC02, também é importante levar em consideração que a produção/liberação, os tipos e a eficácia dos VOCs podem ser influenciados pelo tempo de incubação ou pelo estágio de desenvolvimento bacteriano (Misztal et al., 2018; M. Yang et al., 2019), pela temperatura e umidade (Jeleń, 2002; Misztal et al., 2018) e pelo tipo e consistência do meio de cultura (Morita et al., 2019; Qadri et al., 2015).

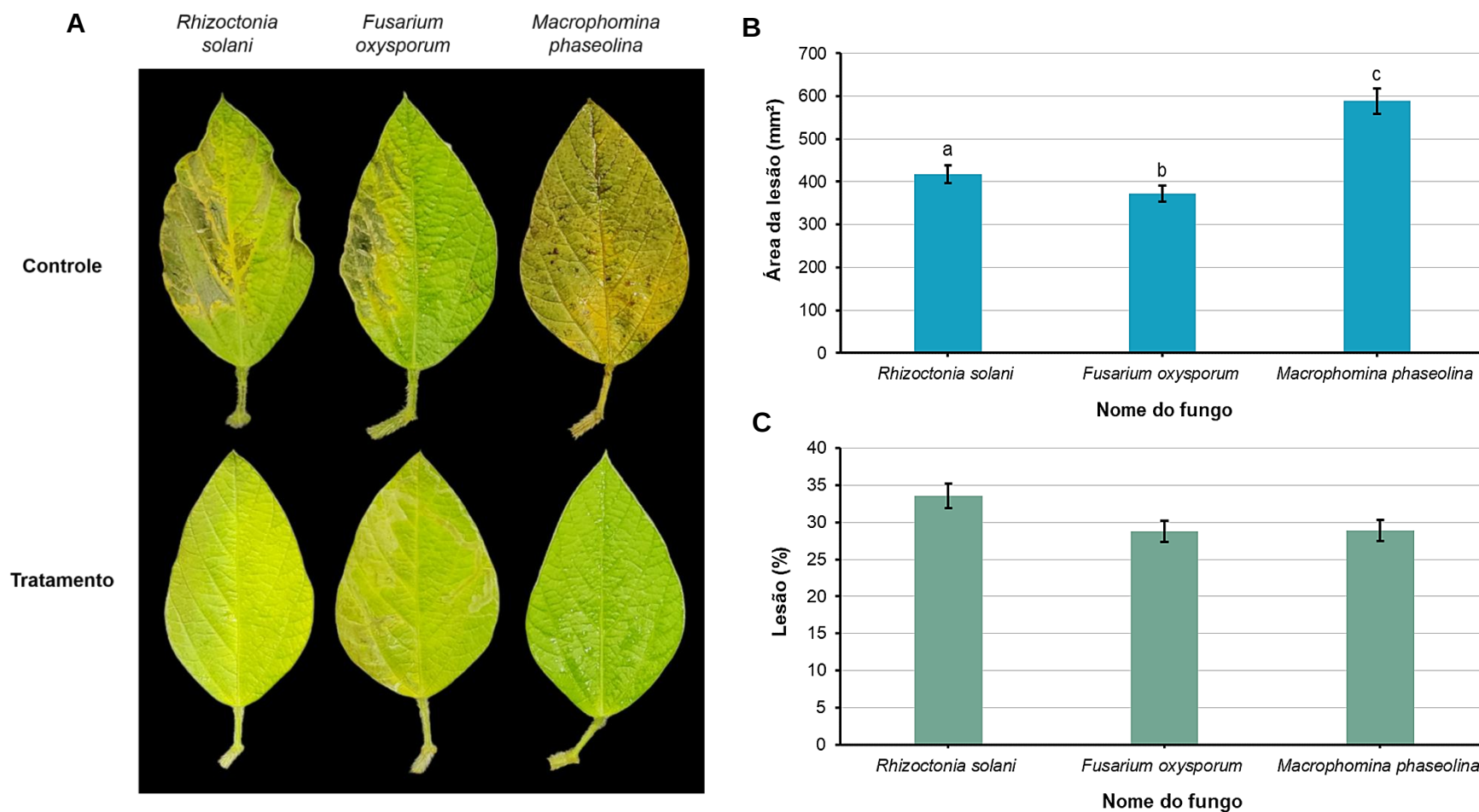


Figura 6. Efeito fungitóxico de VOCs no teste de folha manchada: **A** – Áreas com necrose e sem clorofila em folhas expostas à *Burkholderia* JBC02; **B** – Medição de lesões nas folhas e **C** – Cálculo da porcentagem de lesões. Valores com letras iguais não diferem significativamente. As barras pretas representam o erro percentual.

3.4.3. Análise por MEV das estruturas fúngicas

Para visualizar as alterações dos micélios fúngicos expostos à *Burkholderia* JBC02, fragmentos do meio de cultura de placas de confronto duplo foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nas placas tratadas, foram evidenciadas hifas flácidas, desidratadas, com superfície irregular, enrugadas e colapsadas (setas vermelhas, Figura 7). Presume-se que essas alterações resultem do aumento da peroxidação lipídica em fungos, induzindo a uma diminuição da fluidez da membrana e ao aumento da permeabilidade de íons, como H^+ e K^+ , desencadeando o encolhimento da célula ou a perda de turgor e, portanto, a ruptura da célula (Kaddes et al., 2019); além disso, a alteração do conteúdo de ergosterol da membrana fúngica pode inibir a atividade de pectinases e celulasas, enzimas importantes na integridade da membrana celular (Zhou et al., 2019). Adicionalmente, essas alterações podem influenciar a morfologia dos apressórios, afetando a infectividade dos fungos (Xing et al., 2018; Zhou et al., 2019).

Em relação aos danos estruturais de fungos fitopatogênicos quando expostos a isolados bacterianos, resultados semelhantes foram descritos por Tenorio-Salgado et al. (2013), ao co-culturarem *Fusarium oxysporum* e *Fusarium culmorum*, com *Burkholderia tropica* cepa MTo431, onde foram observadas alterações morfológicas como hifas inchadas na forma de balões, agregações no citoplasma e protoplasma, degradação das paredes fúngicas e ruptura celular causando liberação de substâncias intracelulares; Também *Magnaporthe oryzae* mudou sua conformação ao interagir com *Burkholderia gladioli* BBB-01, evidenciando um micélio fragmentado (Lin et al., 2021). Uma situação semelhante foi relatada por Wang et al. (2023), que viram hifas de *Botrytis cinerea* com uma superfície áspera e enrugada em comparação com o controle quando tratadas com *Burkholderia gladioli* KRS027, e a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) mostrou distorção e colapso de organelas intracelulares.

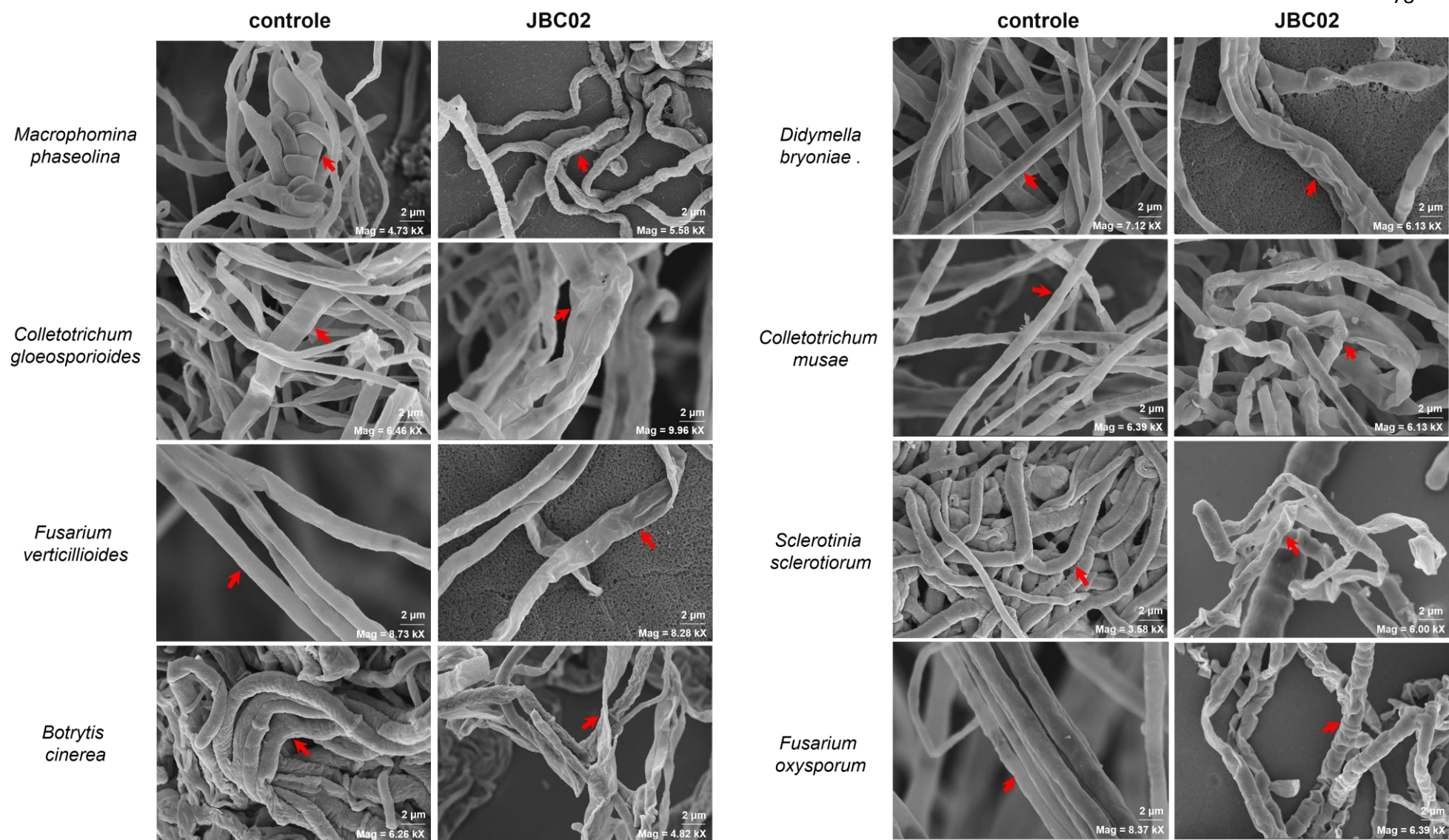


Figura 7. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) do efeito de *Burkholderia* JBC02 na morfologia dos fungos paragênicos de plantas. Linhas vermelhas indicam diferenças estruturais.

Além das alterações morfológicas, também foi registrada a zona de inibição máxima da cultura de duplo confronto (Figura 8), onde podemos observar a área de transição entre o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum musae* e *Sclerotinia sclerotiorum* e a região de inibição gerada pelas substâncias produzidas por *Burkholderia* JBC02 e difundidas no meio de cultura. Essa zona também foi relatada por (Wang et al. (2023) ao confrontar *B. gladioli* KRS027 com *Botrytis cinerea*, e por Baptista et al. (2022), quando avaliaram o efeito antifúngico do sobrenadante livre de células de *Bacillus velezensis* CMRP 4489 sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* e *Botrytis cinerea*.

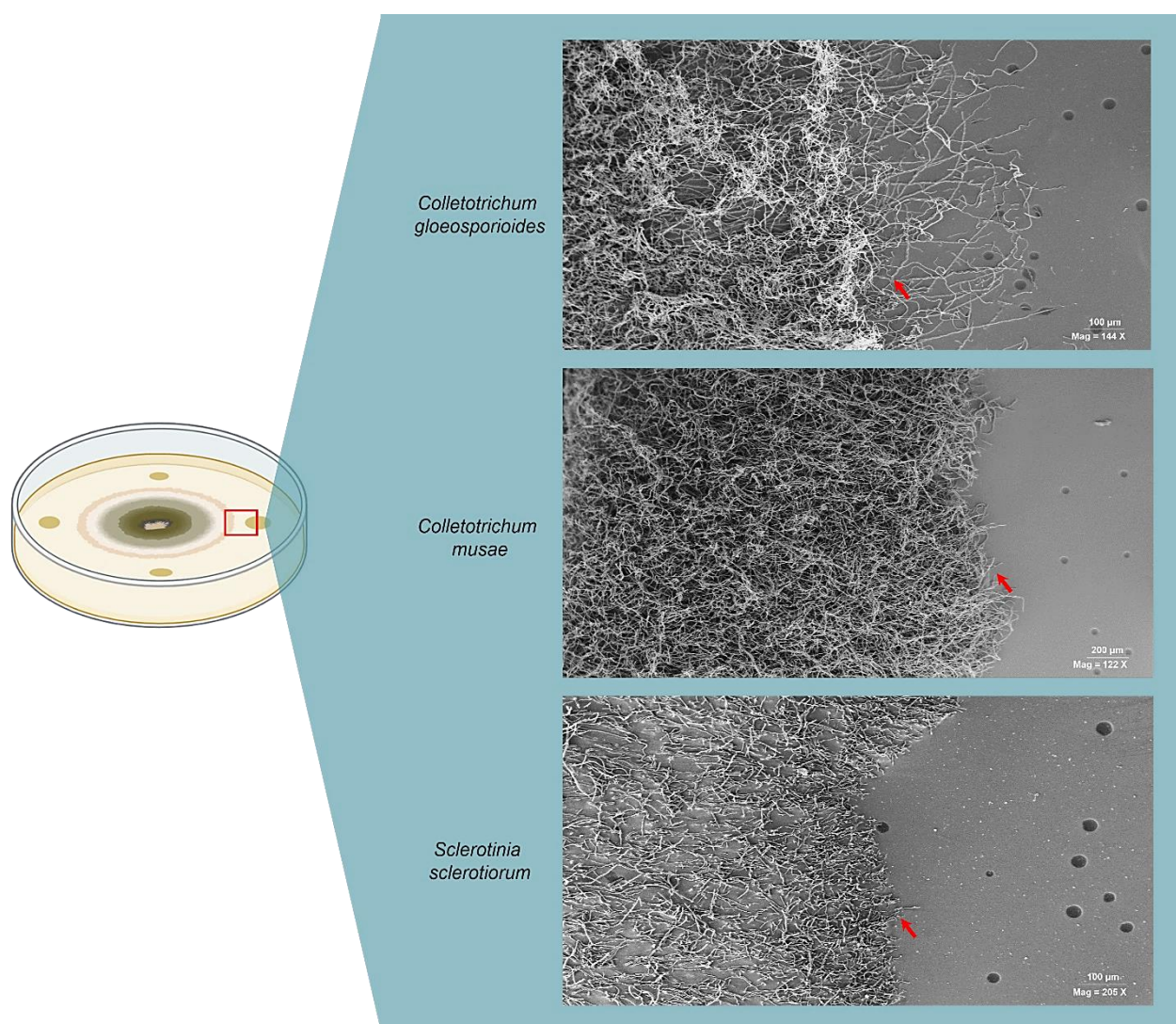


Figura 8. Registro por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da zona de inibição do crescimento micelial por substâncias difusíveis liberadas por *Burkholderia* JBC02. As setas vermelhas indicam o limite de crescimento do fungo.

As alterações ultraestruturais nos permitem corroborar a função antagônica da *Burkholderia* JBC02 quando co-inoculada com fungos fitopatogênicos (Figura 2), destacando seu potencial como agente de controle biológico.

3.5. Conclusão

Os resultados *in vitro* do confronto entre a *Burkholderia* JBC02 e diversos fungos fitopatogênicos sugerem que o isolado bacteriano apresenta dois mecanismos de ação, por um lado, há a produção de moléculas ativas difundidas no meio e, por outro, a liberação de compostos orgânicos voláteis (VOCs), classificando o isolado bacteriano como multivalente e tornando-se um recurso promissor para o desenvolvimento específico de bioinsumos baseados nessa cepa.

Referências

- Alam, K., Islam, M. M., Gong, K., Abbasi, M. N., Li, R., Zhang, Y., & Li, A. (2022). In silico genome mining of potential novel biosynthetic gene clusters for drug discovery from Burkholderia bacteria. **Computers in Biology and Medicine**, *140*, 105046.
- Almeida, O. A. C., de Araujo, N. O., Dias, B. H. S., de Sant'Anna Freitas, C., Coerini, L. F., Ryu, C. M., & de Castro Oliveira, J. V. (2023). The power of the smallest: The inhibitory activity of microbial volatile organic compounds against phytopathogens. **Frontiers in Microbiology**, *13*, 951130.
- Ansari, I., El-Kady, M. M., Arora, C., Sundararajan, M., Maiti, D., & Khan, A. (2021a). A review on the fatal impact of pesticide toxicity on environment and human health. **Global Climate Change**, 361–391.
- Baccari, C., Antonova, E., & Lindow, S. (2019). Biological control of Pierce's disease of grape by an endophytic bacterium. **Phytopathology**, *109*(2), 248–256.
- Bach, E., Passaglia, L. M. P., Jiao, J., & Gross, H. (2022). Burkholderia in the genomic era: from taxonomy to the discovery of new antimicrobial secondary metabolites. **Critical Reviews in Microbiology**, *48*(2), 121–160.
- Baker, B. P., Green, T. A., & Loker, A. J. (2020). Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. **Biological Control**, *140*, 104095.
- Baptista, J. P., Teixeira, G. M., de Jesus, M. L. A., Bertê, R., Higashi, A., Mosela, M., da Silva, D. V., de Oliveira, J. P., Sanches, D. S., Brancher, J. D., Balbi-Peña, M. I., de Padua Pereira, U., & de Oliveira, A. G. (2022). Antifungal activity and genomic characterization of the biocontrol agent *Bacillus velezensis* CMRP 4489. **Scientific Reports** **2022** *12*:1, *12*(1), 1–13.
- Berg, G., Zachow, C., Müller, H., Philipps, J., & Tilcher, R. (2013). Next-Generation Bio-Products Sowing the Seeds of Success for Sustainable Agriculture. **Agronomy** **2013**, Vol. 3, Pages 648-656, *3*(4), 648–656.
- Bonatterra, A., Badosa, E., Daranas, N., Francés, J., Roselló, G., & Montesinos, E. (2022). Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. **Microorganisms** **2022**, Vol. 10, Page 1759, *10*(9), 1759.
- Boukaew, S., Yossan, S., Cheirsilp, B., & Prasertsan, P. (2022). Impact of environmental factors on *Streptomyces* spp. metabolites against *Botrytis cinerea*. **Journal of Basic Microbiology**, *62*(5), 611–622.
- Brilli, F., Loreto, F., & Baccelli, I. (2019). Exploiting plant volatile organic compounds (VOCs) in agriculture to improve sustainable defense strategies and productivity of crops. **Frontiers in Plant Science**, *10*, 1–8.

- Carmona-Hernandez, S., Reyes-Pérez, J. J., Chiquito-Contreras, R. G., Rincon-Enriquez, G., Cerdan-Cabrera, C. R., & Hernandez-Montiel, L. G. (2019). Biocontrol of Postharvest Fruit Fungal Diseases by Bacterial Antagonists: A Review. **Agronomy** 2019, Vol. 9, Page 121, 9(3), 121.
- Carrión, V. J., Perez-Jaramillo, J., Cordovez, V., Tracanna, V., De Hollander, M., Ruiz-Buck, D., Mendes, L. W., van Ijcken, W. F. J., Gomez-Exposito, R., Elsayed, S. S., Mohanraju, P., Arifah, A., van der Oost, J., Paulson, J. N., Mendes, R., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Raaijmakers, J. M. (2019). Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. **Science**, 366(6465), 606–612.
- Chen, J. H., Xiang, W., Cao, K. X., Lu, X., Yao, S. C., Hung, D., Huang, R. S., & Li, L. B. (2020). Characterization of Volatile Organic Compounds Emitted from Endophytic Burkholderia cenocepacia ETR-B22 by SPME-GC-MS and Their Inhibitory Activity against Various Plant Fungal Pathogens. **Molecules** 2020, Vol. 25, Page 3765, 25(17), 3765.
- Chen, J., Wei, X., Lu, X., Ming, R., Huang, D., Yao, Y., Li, L., & Huang, R. (2022). Burkholderia cenocepacia ETR-B22 volatile organic compounds suppress postharvest grey mould infection and maintain aroma quality of tomato fruit. **LWT**, 165, 113715.
- Cui, G., Yin, K., Lin, N., Liang, M., Huang, C., Chang, C., Xi, P., & Deng, Y. Z. (2020). Burkholderia gladioli CGB10: A Novel Strain Biocontrolling the Sugarcane Smut Disease. **Microorganisms** 2020, Vol. 8, Page 1943, 8(12), 1943.
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, 13(4), 414–430.
- Deng, P., Wang, X., Baird, S. M., Showmaker, K. C., Smith, L., Peterson, D. G., & Lu, S. (2016). Comparative genome-wide analysis reveals that Burkholderia contaminans MS14 possesses multiple antimicrobial biosynthesis genes but not major genetic loci required for pathogenesis. **MicrobiologyOpen**, 5(3), 353–369.
- Depoorter, E., Bull, M. J., Peeters, C., Coenye, T., Vandamme, P., & Mahenthiralingam, E. (2016). Burkholderia: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. **Applied Microbiology and Biotechnology** 2016 100:12, 100(12), 5215–5229.
- Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., & Sharon, A. (2017). Plant Pathogenic Fungi. **Microbiology Spectrum**, 5(1).
- Eberl, L., & Vandamme, P. (2016). Members of the genus Burkholderia: good and bad guys. *F1000Research*, 5.

Elshafie, H. S., & Camele, I. (2021). An Overview of Metabolic Activity, Beneficial and Pathogenic Aspects of Burkholderia Spp. **Metabolites** 2021, Vol. 11, Page 321, 11(5), 321.

Elshafie, H. S., Camele, I., Racioppi, R., Scrano, L., Iacobellis, N. S., & Bufo, S. A. (2012). In Vitro Antifungal Activity of Burkholderia gladioli pv. agaricola against Some Phytopathogenic Fungi. **International Journal of Molecular Sciences** 2012, Vol. 13, Pages 16291-16302, 13(12), 16291–16302.

Esmaeel, Q., Jacquard, C., Sanchez, L., Clément, C., & Ait Barka, E. (2020). The mode of action of plant associated Burkholderia against grey mould disease in grapevine revealed through traits and genomic analyses. **Scientific Reports** 2020 10:1, 10(1), 1–14.

Garbeva, P., Hordijk, C., Gerards, S., & de Boer, W. (2014). Volatiles produced by the mycophagous soil bacterium Collimonas. **FEMS Microbiology Ecology**, 87(3), 639–649.

Giovannoni, M., Gramegna, G., Benedetti, M., & Mattei, B. (2020). Industrial Use of Cell Wall Degrading Enzymes: The Fine Line Between Production Strategy and Economic Feasibility. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 8, 529626.

Guevara-Avendaño, E., Bravo-Castillo, K. R., Monribot-Villanueva, J. L., Kiel-Martínez, A. L., Ramírez-Vázquez, M., Guerrero-Analco, J. A., & Reverchon, F. (2020). Diffusible and volatile organic compounds produced by avocado rhizobacteria exhibit antifungal effects against Fusarium kuroshium. **Brazilian Journal of Microbiology**, 51(3), 861–873.

Heo, A. Y., Koo, Y. M., & Choi, H. W. (2022a). Biological Control Activity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Burkholderia contaminans AY001 against Tomato Fusarium Wilt and Bacterial Speck Diseases. **Biology**, 11(4), 619.

Hossain, T. J., Chowdhury, S. I., Mozumder, H. A., Chowdhury, M. N. A., Ali, F., Rahman, N., & Dey, S. (2020). Hydrolytic Exoenzymes Produced by Bacteria Isolated and Identified From the Gastrointestinal Tract of Bombay Duck. **Frontiers in Microbiology**, 11, 573523.

Hu, F. P., & Young, J. M. (1998). Biocidal activity in plant pathogenic Acidovorax, Burkholderia, Herbaspirillum, Ralstonia and Xanthomonas spp. **Journal of Applied Microbiology**, 84(2), 263–271.

Jeleń, H. H. (2002). Volatile Sesquiterpene Hydrocarbons Characteristic for Penicillium roqueforti Strains Producing PR Toxin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(22), 6569–6574.

- Kaddes, A., Fauconnier, M. L., Jijakli, M. H., Sassi, K., & Nasraoui, B. (2019). Antifungal Properties of Two Volatile Organic Compounds on Barley Pathogens and Introduction to Their Mechanism of Action. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 2019, Vol. 16, Page 2866, 16(16), 2866.
- Kandel, S. L., Firrincieli, A., Joubert, P. M., Okubara, P. A., Leston, N. D., McGeorge, K. M., Mugnozsa, G. S., Harfouche, A., Kim, S. H., & Doty, S. L. (2017). An in vitro study of bio-control and plant growth promotion potential of salicaceae endophytes. **Frontiers in Microbiology**, 8(MAR), 227635.
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, 10, 454982.
- Kong, W.-L., Li, P.-S., Wu, X.-Q., Wu, T.-Y., & Sun, X.-R. (2020). *Diffusible and Volatile Antifungal Compounds Produced by Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca ST-TJ4 against Various Phytopathogenic Fungi*.
- Kong, W. L., Ni, H., Wang, W. Y., & Wu, X. Q. (2022). Antifungal effects of volatile organic compounds produced by *Trichoderma koningiopsis* T2 against *Verticillium dahliae*. **Frontiers in Microbiology**, 13, 1013468.
- Legein, M., Smets, W., Vandenheuvel, D., Eilers, T., Muysshondt, B., Prinsen, E., Samson, R., & Lebeer, S. (2020). Modes of Action of Microbial Biocontrol in the Phyllosphere. **Frontiers in Microbiology**, 11, 544057.
- Lim, S. M., Yoon, M. Y., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Shin, T. S., Park, H. W., Yu, N. H., Kim, Y. H., & Kim, J. C. (2017). Diffusible and Volatile Antifungal Compounds Produced by an Antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against Various Phytopathogenic Fungi. **The Plant Pathology Journal**, 33(5), 488.
- Lin, Y. T., Lee, C. C., Leu, W. M., Wu, J. J., Huang, Y. C., & Meng, M. (2021). Fungicidal Activity of Volatile Organic Compounds Emitted by *Burkholderia gladioli* Strain BBB-01. **Molecules** 2021, Vol. 26, Page 745, 26(3), 745.
- Liu, A., Zhang, P., Bai, B., Bai, F., Jin, T., & Ren, J. (2020). Volatile Organic Compounds of Endophytic *Burkholderia pyrrocinia* Strain JK-SH007 Promote Disease Resistance in Poplar. **Plant Disease**, 104(6), 1610–1620.
- Li, X., Li, Y., Wang, R., Wang, Q., & Lu, L. (2019). Toxoflavin produced by *Burkholderia gladioli* from *Lycoris aurea* is a new broad-spectrum fungicide. **Applied and Environmental Microbiology**, 85(9).
- Magalhães, V. C., Barbosa, L. de O., Andrade, J. P., Soares, A. C. F., de Souza, J. T., & Marbach, P. A. S. (2017). *Burkholderia* isolates from a sand dune leaf litter display biocontrol activity against the bole rot disease of *Agave sisalana*. **Biological Control**, 112, 41–48.

- Maluin, F. N., Hussein, M. Z., Yusof, N. A., Fakurazi, S., Idris, A. S., Hilmi, N. H. Z., & Daim, L. D. J. (2019). Preparation of Chitosan–Hexaconazole Nanoparticles as Fungicide Nanodelivery System for Combating Ganoderma Disease in Oil Palm. **Molecules** 2019, Vol. 24, Page 2498, 24(13), 2498.
- Meng, X. J., Galileya Medison, R., Cao, S., Wang, L. qin, Cheng, S., Tan, L. tao, Sun, Z. xiang, & Zhou, Y. (2023). Isolation, identification, and biocontrol mechanisms of endophytic Burkholderia vietnamiensis C12 from Ficus tikoua Bur against Rhizoctonia solani. **Biological Control**, 178, 105132.
- Misztal, P. K., Lympieropoulou, D. S., Adams, R. I., Scott, R. A., Lindow, S. E., Bruns, T., Taylor, J. W., Uehling, J., Bonito, G., Vilgalys, R., & Goldstein, A. H. (2018). Emission Factors of Microbial Volatile Organic Compounds from Environmental Bacteria and Fungi. **Environmental Science and Technology**, 52(15), 8272–8282.
- Morita, T., Tanaka, I., Ryuda, N., Ikari, M., Ueno, D., & Someya, T. (2019). Antifungal spectrum characterization and identification of strong volatile organic compounds produced by Bacillus pumilus TM-R. **Heliyon**, 5(6).
- Parnell, S., Van Den Bosch, F., & Gilligan, C. A. (2007). Large-Scale Fungicide Spray Heterogeneity and the Regional Spread of Resistant Pathogen Strains. **Phytopathology**, 96(5), 549–555.
- Pretscher, J., Fischkal, T., Branscheidt, S., Jäger, L., Kahl, S., Schlander, M., Thines, E., & Claus, H. (2018). Yeasts from Different Habitats and Their Potential as Biocontrol Agents. **Fermentation** 2018, Vol. 4, Page 31, 4(2), 31.
- Qadri, M., Deshidi, R., Shah, B. A., Bindu, K., Vishwakarma, R. A., & Riyaz-Ul-Hassan, S. (2015). An endophyte of Picrorhiza kurroa Royle ex. Benth, producing menthol, phenylethyl alcohol and 3-hydroxypropionic acid, and other volatile organic compounds. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 31(10), 1647–1654.
- Ramnath, L., Sithole, B., & Govinden, R. (2017). Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to Eucalyptus wood species for application in the pulping industry. **Biotechnology Reports**, 15, 114–124.
- Rodríguez-Cisneros, M., Morales-Ruíz, L. M., Salazar-Gómez, A., Rojas-Rojas, F. U., & Estrada-de los Santos, P. (2023). Compilation of the Antimicrobial Compounds Produced by Burkholderia Ssensu Stricto. **Molecules**, 28(4), 1646.
- Sarli, D. A., Sánchez, L. A., & Delgado, O. D. (2021). Burkholderia gladioli MB39 an Antarctic Strain as a Biocontrol Agent. **Current Microbiology**, 78(6), 2332–2344.
- Spadaro, D., & Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends in Food Science & Technology**, 47, 39–49.

Strange, R. N., & Scott, P. R. (2005). Plant disease: a threat to global food security. **Annual review of phytopathology**, 43, 83–116.

Tagele, S. B., Kim, S. W., Lee, H. G., & Lee, Y. S. (2019). Potential of Novel Sequence Type of Burkholderia cenocepacia for Biological Control of Root Rot of Maize (Zea mays L.) Caused by Fusarium temperatum. **International Journal of Molecular Sciences** 2019, Vol. 20, Page 1005, 20(5), 1005.

Tenorio-Salgado, S., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., Caballero-Mellado, J., & Perez-Rueda, E. (2013b). Identification of volatile compounds produced by the bacterium Burkholderia tropica that inhibit the growth of fungal pathogens. **Bioengineered**, 4(4), 236–243.

Tsai, S. H., Hsiao, Y. C., Chang, P. E., Kuo, C. E., Lai, M. C., & Chuang, H. W. (2023). Exploring the Biologically Active Metabolites Produced by Bacillus cereus for Plant Growth Promotion, Heat Stress Tolerance, and Resistance to Bacterial Soft Rot in Arabidopsis. **Metabolites** 2023, Vol. 13, Page 676, 13(5), 676.

Wang, D., Luo, W.-Z., Zhang, D.-D., Li, R., Kong, Z.-Q., Song, J., Dai, X.-F., Alkan, N., & Chen, J.-Y. (2023a). Insights into the Biocontrol Function of a Burkholderia gladioli Strain against Botrytis cinerea. **Microbiology Spectrum**.

Wohlgemuth, R., Twardowski, T., & Aguilar, A. (2021). Bioeconomy moving forward step by step – A global journey. **New Biotechnology**, 61, 22–28. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2020.11.006>

Xing, M., Zheng, L., Deng, Y., Xu, D., Xi, P., Li, M., Kong, G., & Jiang, Z. (2018). Antifungal Activity of Natural Volatile Organic Compounds against Litchi Downy Blight Pathogen Peronophythora litchii. **Molecules** 2018, Vol. 23, Page 358, 23(2), 358.

Yang, M., Lu, L., Pang, J., Hu, Y., Guo, Q., Li, Z., Wu, S., Liu, H., & Wang, C. (2019). Biocontrol activity of volatile organic compounds from Streptomyces alboflavus TD-1 against Aspergillus flavus growth and aflatoxin production. **Journal of Microbiology**, 57(5), 396–404.

Yang, X., Chen, X., Song, Z., Zhang, X., Zhang, J., & Mei, S. (2020). Antifungal, plant growth-promoting, and mycotoxin detoxication activities of Burkholderia sp. strain XHY-12. **3 Biotech**, 10(4), 1–9.

Zaman, N. R., Chowdhury, U. F., Reza, R. N., Chowdhury, F. T., Sarker, M., Hossain, M. M., Akbor, M. A., Amin, A., Islam, M. R., & Khan, H. (2021). Plant growth promoting endophyte Burkholderia contaminans NZ antagonizes phytopathogen Macrophomina phaseolina through melanin synthesis and pyrrolnitrin inhibition. **PLOS ONE**, 16(9), e0257863.

Zehra, A., Raytekar, N. A., Meena, M., & Swapnil, P. (2021). Efficiency of microbial bio-agents as elicitors in plant defense mechanism under biotic stress: A review. **Current Research in Microbial Sciences**, 2, 100054.

Zhou, M., Li, P., Wu, S., Zhao, P., & Gao, H. (2019). *Bacillus subtilis* CF-3 Volatile Organic Compounds Inhibit *Monilinia fructicola* Growth in Peach Fruit. **Frontiers in Microbiology**, *10*, 470637.

Zhu, L., Huang, J., Lu, X., & Zhou, C. (2022). Development of plant systemic resistance by beneficial rhizobacteria: Recognition, initiation, elicitation and regulation. **Frontiers in Plant Science**, *13*, 952397.