

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**POTENCIAL DE ISOLADOS DO GÊNERO
BURKHOLDERIA SP. PARA O CONTROLE DA *Diatraea
saccharalis* (FABRICIUS, 1794), *Spodoptera frugiperda*
(JE SMITH, 1797) E DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Aparecida Gomes Feitosa

Engenheira Agrônoma

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**POTENCIAL DE ISOLADOS DO GÊNERO
BURKHOLDERIA SP. PARA O CONTROLE DA *Diatraea
saccharalis* (FABRICIUS, 1794), *Spodoptera frugiperda*
(J.E. SMITH, 1797) E DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Aparecida Gomes Feitosa

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

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)

F311p

Feitosa, Aparecida Gomes

Potencial de isolados do gênero *Burkholderia* sp. para o controle da *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794), *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) e de fungos fitopatogênicos / Aparecida Gomes Feitosa. -- Jaboticabal, 2022

35 p.

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

Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

1. Controle biológico. 2. Bioinseticida. 3. Biofungicida. 4. Composto ativo. 5. Análise filogenética. I. Título.

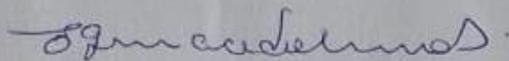
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: POTENCIAL DE ISOLADOS DO GÊNERO BURKHOLDERIA SP. PARA O CONTROLE DA *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1794), *Spodoptera frugiperda* (JE SMITH, 1797) E DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

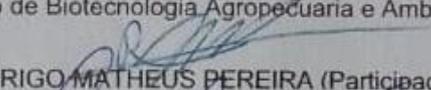
AUTORA: APARECIDA GOMES FEITOSA

ORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

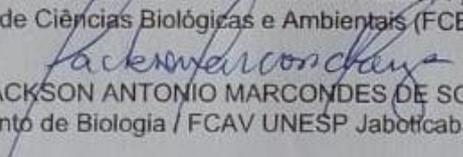
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela Comissão Examinadora:



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



Prof. Dr. RODRIGO MATHEUS PEREIRA (Participação Virtual)
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA/UFGB) / Dourados/MS



Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 05 de outubro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Aparecida Gomes Feitosa, nasceu no município de Humaitá – AM, no dia 12 de novembro de 1994. Iniciou a graduação em novembro de 2013 na Universidade Federal do Amazonas – UFAM no curso de Agronomia. Como aluna de graduação foi bolsista de iniciação científica CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) nesta defendeu o trabalho de conclusão de curso intitulado “Desempenho agrônômico de cultivares de milho (*Zea mays*, L.) no município de Humaitá, AM”. Obteve o título de Engenheira Agrônoma em 2019. No início de agosto ainda no mesmo ano ingressou no curso de Pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), nível Mestrado, pela UNESP/FCAV, sendo bolsista CAPES, onde desenvolveu a presente dissertação, sob orientação do Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Sueli e João, e a todos que me incentivaram nessa
carreira acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da agência de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, pelo aceite de orientação, por me receber em seu laboratório, pelo apoio no decorrer deste trabalho. É admirável a sua determinação e conhecimento.

Ao técnico Dr. João Carlos Campanharo, por seus ensinamentos no laboratório.

Ao Dr. Renato Farinácio por compartilhar seus ensinamentos no início deste trabalho.

A técnica Dra. Camila Cesário Fernandes, por todo o apoio dado nas análises na área de biologia molecular.

A doutoranda Michelli Inácio Gonçalves Funicelli, por todo apoio dado, principalmente na área da bioinformática, em especial na edição e construção da árvore filogenética.

A doutoranda Cinara Sales, por todo apoio, amizade e pela colaboração na montagem dos bioensaios.

Ao técnico André Maurício Múscari pelo fornecimento de posturas de *Spodoptera frugiperda*.

A todos os membros do laboratório de Bioquímica de Microrganismos de Plantas do Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental da Faculdade pela ajuda em diversas etapas deste trabalho.

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

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

A Hortência Kardec, Jessica Andrade, Paula Klotz pelo apoio e amizade. E a todos os demais que, direta ou indiretamente, colaboraram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Revisão de literatura.....	2
1.1.1. <i>Spodoptera frugiperda</i>	2
1.1.2. <i>Diatraea saccharalis</i>	2
1.1.3. Fungos fitopatogênicos.....	3
1.1.4. Métodos de controle.....	3
1.1.5. Controle biológico.....	4
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
2.1. Local dos experimentos.....	5
2.2. Coleta de solo.....	5
2.3. Infecção das lagartas.....	5
2.4. Obtenção dos isolados.....	6
2.5. Triagem da atividade inseticida	6
2.6. Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	7
2.7. Curva de crescimento.....	7
2.8. Análise filogenética do gene 16S rRNA.....	8
2.9. Triagem da atividade fungicida.....	8
2.10. Forma de análise dos dados.....	9
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
3.1. Triagem da atividade inseticida.....	9
3.2. Bioensaio da atividade inseticida.....	10
3.3. Curva de crescimento.....	12
3.4. Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	13
3.5. Triagem da Atividade fungicida.....	14

3.6. Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	14
3.7. Curva de crescimento.....	15
3.8. Bioensaio da atividade fungicida.....	16
3.9. Análise filogenética do gene 16S rRNA	18
4. CONCLUSÃO.....	20
5. REFERÊNCIAS.....	20

POTENCIAL DE ISOLADOS DO GÊNERO *BURKHOLDERIA* SP. PARA O CONTROLE DA *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1794), *Spodoptera frugiperda* (JE SMITH, 1797) E DE FUNGOS FITOPATÓGENICOS

RESUMO – O presente trabalho teve como finalidade a prospecção por outras fontes de controle que possam minimizar o ataque de pragas e fitopatógenos causadores de doenças nas plantas. Sendo assim, obtidos um total de 26 isolados bacterianos a partir de amostras, vegetal, solo de área de rio e solo de área de floresta. Avaliados quanto a sua atividade inseticida frente as lagartas neonatas de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda*. Os 26 isolados também foram testados quanto a atividade fungicida aos fitopatógenos *Didymella* sp. *Colletotrichum* sp. e *Fusarium* sp. Após os testes foram selecionados dois isolados, sendo o primeiro, “isolado 06”, que após sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foi possível identifica-lo como sendo do gênero *Burkholderia*, se aproximando da espécie *Burkholderia thailandensis*, este apresentou atividade inseticida, foi notado que as lagartas tratadas com esse isolado apresentaram redução no seu peso e/ou crescimento quando comparadas as do controle, mas esta atividade não foi vista nas lagartas que foram tratadas com sobrenadante aquecido do isolado. O isolado que apresentou atividade aos fungos fitopatogênicos, “isolado 26”, que após sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foi possível identifica-lo como sendo também do gênero *Burkholderia*, apresentou halo de inibição ao crescimento dos fungos *Didymella* sp. *Colletotrichum* sp. e *Fusarium* sp., mas não foi observada esta atividade nas placas que estavam com alíquotas do sobrenadante aquecido do isolado. Portanto, notado que em ambos experimentos, na avaliação térmica, a atividade bioinseticida e biofungicida não se mantiveram o que sugerimos preliminarmente tratar-se de um composto sensível ao calor podendo ser uma proteína produzida pelos isolados.

Palavras-chave: Bioinseticida, biofungicida, extratos celulares e composto ativo.

POTENTIAL OF ISOLATES OF THE GENDER *BURKHOLDERIA* SP. FOR THE CONTROL OF *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1794), *Spodoptera frugiperda* (JE SMITH, 1797) AND PHYTOPATOGENIC FUNGI

ABSTRACT – The purpose of this work was to search for other sources of control that can minimize the attack of pests and phytopathogens that cause diseases in plants. Therefore, *Spodoptera frugiperda* caterpillars were used as “baits” in the soil, obtaining a total of 26 bacterial isolates and these were evaluated for their insecticidal activity against the neonatal caterpillars of *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. The 26 isolates were also tested for fungicidal activity against the phytopathogens *Didymella* sp. *Colletotrichum* sp. and *Fusarium* sp. After the tests, two isolates were selected, the first being “isolate 06”, which after partial sequencing of the 16S rRNA gene it was possible to identify it as belonging to the genus *Burkholderia*, approaching the species *Burkholderia thailandensis*, this showed insecticidal activity, it was noticed that the caterpillars treated with this isolate had a reduction in their weight and/or growth when compared to the control, but this activity was not seen in the caterpillars that were treated with the warmed supernatant of the isolate. The isolate that showed activity to the phytopathogenic fungi, “isolate 26”, which after partial sequencing of the 16S rRNA gene it was possible to identify it as being also of the *Burkholderia* genus, showed a halo of inhibition to the growth of the *Didymella* sp. *Colletotrichum* sp. and *Fusarium* sp., but this activity was not observed in the plates that had aliquots of the warmed supernatant of the isolate. Therefore, in both experiments, it was seen that in the thermal evaluation, the bioinsecticide and biofungicide activity were not maintained, which we suggest preliminarily, that it is a heat-sensitive compound, which may be a protein produced by the isolates.

Keywords: Bioinsecticide, biofungicide, cellular extracts and active compound

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem lugar de destaque na produção agrícola mundial, principalmente, com as culturas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* (Alves et al, 2021)), soja (*Glycine max* L. (Neves e Da Silva, 2021)) e milho (*Zea mays* L. (Silva, 2020)), o que as torna de grande importância para economia do país. Porém, a produção agrícola defronta-se com uma série de problemas fitossanitários, que inclui a incidência de pragas e doenças (Sharma, Kooner e Arora, 2017). O ataque de pragas e doenças está entre os principais fatores que comprometem o rendimento e a qualidade da produção destas culturas. Uma das formas mais usadas para controlar esse problema é baseado em defensivos químicos. Entretanto, o uso contínuo juntamente com um manejo inadequado traz desvantagens ao meio ambiente, segurança do homem e favorece a evolução de resistência nos insetos e patógenos causadores de doenças nas plantas. Para contornar essa situação muitos produtores fazem uso de inseticidas, porém casos de resistência já foram documentados, o que encarece mais o custo de produção (Sparks et al., 2020), a esta constante preocupação é fundamental investigar outras alternativas de controle. Na agricultura moderna os pesquisadores têm focado em fontes microbianas como fontes de novos compostos, logo a triagem pode levar a descoberta de uma variedade de moléculas ou compostos ativos promissores para o uso na biotecnologia (Van moll et al., 2021). A prospecção por novas moléculas e ou compostos proteicos é uma importante ferramenta para reduzir o aparecimento de resistência nos insetos e fungos fitopatogênicos. Assim, objetivou-se no presente trabalho a obtenção de isolados bacterianos que tenha efeito bioinseticida aos insetos *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis* e efeito biofungicida aos fitopatógenos *Colletotrichum* sp, *Didymella* sp e *Fusarium* sp.

1.1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1. *Spodoptera frugiperda*

Perdas econômicas decorrentes de pragas agrícolas tem impacto no rendimento da produção agrícola brasileira (Horikoshi et al., 2022). Entre as principais pragas a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797)) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada uma espécie de praga devastadora por causar grandes danos nas lavouras de milho e soja (Gebreziher, 2020; Huang, 2021). É um inseto polífago, considerado praga, principalmente na sua fase jovem, onde seu hábito alimentar é voraz nas folhas e brotos das plantas hospedeiras o que leva prejuízos econômicos aos produtores, possui também característica migratória e adaptativa, presente em diversas culturas, podendo atuar em vários estágios da planta, sua alimentação chega a se apresentar nas lavouras de forma destrutiva, causa perdas significativas, principalmente nas culturas do milho, soja, sorgo e arroz (Jamil, Saiful Zaimi et al., 2021; Suganthi et al., 2022). Diante desse cenário de perdas produtivas cresce o uso indevido e massivo de agrotóxico e a isto surge efeitos indesejáveis tanto para o meio ambiente como também para a saúde humana, contribuindo na evolução de resistência do inseto (Paredes-sánchez et al., 2021).

1.1.2. *Diatraea saccharalis*

A broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794)) (Lepidoptera: Crambidae) é uma das principais pragas que afeta o cultivo da cana-de-açúcar (Duarte et al., 2007). Causador de efeitos indesejáveis a esta cultura, efeitos que quando de forma direta cria aberturas no colmo da planta, e na forma indireta as aberturas são fontes de acesso para entrada de fitopatógenos que por sua vez também tem sua parcela de culpa, reduz a qualidade e rendimento da produção. Geralmente este inseto praga é controlado por agroquímicos e parasitoides (Reis et al., 2022). Além desses, um outro método de controle explorado no cultivo da cana é a tecnologia Bt, que faz uso de genes de *Bacillus thuringiensis* que expressa toxinas inseticidas. O controle deste inseto é crescente das últimas

décadas, porém também vem sendo relatado o desenvolvimento de resistências e adaptação aos inseticidas, e tecnologia Bt (Jurat-fuentes., 2021), tornando -se necessário a busca por novas estratégias que controle.

1.1.3. Fungos fitopatogênicos

Os fitopatógenos por sua vez, assim como os insetos praga também são responsáveis por causarem prejuízos nas lavouras agrícolas, neste cenário destacamos os fungos fitopatogênicos *Fusarium* sp, *Colletotrichum* sp.e *Didymella* sp . O *Fusarium* sp. tem seu destaque nas perdas agrícolas, apresenta uma ampla diversidade de plantas hospedeiras, com sintomas de podridão na raiz e murcha vascular (Ploetz, 2006; Yuan et al., 2020). O *Colletotrichum* sp., já foi associado a antracnose na cultura da soja, com aparecimento de manchas escuras, levando a um mal desenvolvimento das vagens (Bouffleur et al., 2021). Outro fungo de importância econômica é o *Didymella* sp., patógeno que afeta a família das cucurbitáceas, principalmente melão, pepino e melancia, e responsável pela gomosa do caule com formação de cancrios nos diferentes órgãos aéreos das plantas. (Hassan et al., 2018).

1.1.4. Métodos de controle

Os métodos de controle são abordagens que tem por finalidade minimizar as ações das pragas e fitopatógenos nas lavouras. Nos últimos anos o método amplamente explorado no controle de insetos considerados pragas agrícolas é o uso da tecnologia Bt, considerado um método bem eficiente, onde é utilizada a bactéria, *Bacillus thuringiensis* (Bt) que tem capacidade de sintetizar toxinas (Daquila et al., 2021). Essas toxinas são usadas nas culturas transgênicas e estas passam a controlar pragas.

O método de controle frequentemente utilizado por muitos produtores para controlar pragas e fitopatógenos tem sido a utilização de agroquímicos. Estes a pesar de ajudarem manter alta produção agrícola, apresentam algumas desvantagens quando manejados de forma prolongada e massiva (Mantzoukas e Eliopoulos, 2020). Entre as desvantagens está o risco de contaminação por seus resíduos ao meio ambiente, causando desequilíbrio nos ecossistemas e

trazendo riscos à saúde humana. Também favorece a evolução da resistência de insetos praga o que compromete o controle efetivo dessas pragas (Foerster in: Parra 2002; LI, Xiaodan et al., 2019). Já foi relatado que o controle de insetos lepidópteros com uso de produtos químicos e toxinas bacterianas impôs a pressão de seleção que de forma rápida favoreceu evolução da resistência dos insetos aos inseticidas convencionais (Tay et al., 2015).

Além dos métodos de controle já mencionados, um outro método que vem crescendo é o uso do controle biológico, que consiste no uso de inimigos naturais como os patógenos que fazem o controle da população dos insetos praga (Martins, 2016), tem essa finalidade de manter as pragas abaixo dos níveis de dano econômico e com características bem vantajosas quando comparado ao método que faz uso dos agroquímicos, pois são menos agressivos ao meio ambiente (Viera-arroyo et al., 2020). Porém, mesmo diante dessas alternativas ainda é presente a evolução da resistência dos insetos o que dificulta as estratégias de manejo.

1.1.5. Controle biológico

No controle biológico muitos trabalhos vêm relatando o potencial de bactérias e uso de suas moléculas como agentes de controle, entre essas as mais destacadas são do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* sp. O microrganismo *Bacillus thuringiensis* (Bt) produz proteínas que tem atividade inseticida. As plantas transgênicas carregam o gene responsável pela síntese das proteínas do Bt é uma alternativa muito usada em plantas de importância econômica, principalmente as que sofrem danos pelos lepidópteros, porém tem surgido populações resistentes (Machado, 2020). Espécies do gênero *Burkholderia* já foram relatadas em outros trabalhos como atuantes em processos de biorremediação, biodegradação, promotoras de crescimento, e como agente de controle biológico (Mano, Emy Tiyo, 2011). Assim, o controle biológico é uma alternativa ao uso de agroquímicos para o manejo dessas pragas e a prospecção por outros organismos e novas moléculas e ou compostos proteicos são fundamentais para controle biológico, pois os isolados que tem potencial podem ser empregados para o controle dos insetos praga.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local dos experimentos

Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas no Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV.

2.2. Coleta do solo

As coletas de solo foram feitas em duas áreas no interior do estado do Amazonas, mais precisamente na área de floresta, entre as coordenadas 7°35'07" S e 63°02'55" W e a outra na margem esquerda de rio Madeira, entre as coordenadas 7°30'59" S e 63°0'59" W, coletadas na profundidade dos primeiros 0-5 cm do solo, amostras simples, estas armazenadas em sacos plásticos.

2.3. Infecção das lagartas

O isolamento foi realizado com base na infecção da *S. frugiperda* (posturas obtidas do Laboratório de Ecologia Aplicada – FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP) foram criadas em dieta artificial desenvolvida por Greene; Leppla e Dickerson (1976) até atingir o 4 instar. Para a infecção as lagartas de *S. frugiperda*, foram colocadas em placas de Petri com as amostras de solo, sendo 2 lagartas por placa. As placas foram monitoradas por 8 dias, no decorrer desse período foram selecionadas as que estavam mortas e que apresentavam coloração escura e de aspecto amolecido, estas foram submetidas ao processo de isolamento bacteriano. No terceiro e quarto dia de observação foram coletadas 2 lagartas mortas e de aspecto enegrecido do solo de rio. Para o solo de floresta foram coletadas, no sétimo dia, uma lagarta morta e uma pupa enegrecida, respectivamente.

2.4. Obtenção dos isolados

As lagartas coletadas passaram por assepsia superficial por meio de várias lavagens com hipoclorito de sódio 1% por 3 min, álcool 70% por 1 min, seguida de imersões com água estéril, após esse processo, foram maceradas em microtubos com solução salina a 0,85% de NaCl estéril. Este homogeneizado foi então usado para isolamento bacteriano, que foi realizado por meio de sucessivas diluições 1:10 em NaCl 0,85% e plaqueamento de 100 µL em placas de petri contendo meio Luria Bertani (LB) sólido e mantidas em B.O.D (Bio-Oxygen Demand) 30°C até aparecimento das colônias. Essas colônias foram coletadas individualmente de acordo com seus aspectos morfológicos, em seguida crescidas em meio LB líquido e plaqueadas para confirmar sua pureza, as colônias puras, foram novamente cultivadas em meio LB líquido, transferidas para microcubos contendo glicerol na proporção de 20% e armazenadas em ultra freezer -80°C. Um total de 6 isolados foram obtidos a partir de extrato das lagartas que estavam em contato com solo de rio, 10 isolados das lagartas que estavam em contato com solo de floresta e 10 isolados foram obtidos de amostra vegetal da cultura do amendoim, está cedida pelo pesquisador Fernando Belezini.

2.5. Triagem da atividade inseticida

Para esta avaliação do efeito inseticida, os isolados foram crescidos em meio LB no shaker a 30°C a 150 rpm por 48h. Em placas de poliestireno de 128 poços (Cell Wells, Corning Glass Works) foi adicionado aproximadamente 1 mL de dieta por poço. Para esse teste foi utilizado dieta artificial desenvolvida por Greene; Leppla e Dickerson (1976) para lagartas *S. frugiperda* e dieta artificial de Hensley & Hammond (1968) recomendada por Macedo (2000) para *D. saccharalis*. Posteriormente 60 µL do cultivo bacteriano foi aplicado na superfície da dieta de cada poço da placa, que possui área de 2 cm². As bandejas foram acondicionadas em capela de fluxo laminar por 40 minutos para secagem e em seguida uma lagarta neonata de *D. saccharalis* (posturas cedidas por uma Usina na região de Pradópolis-SP) foi colocada em cada poço da placa e seladas com adesivo assim, também foi feito para as lagartas *S. frugiperda*. Cada parcela foi

representada por 16 poços, as bandejas foram acondicionadas a 27 °C, com fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro. Decorridos sete dias foram verificadas quanto ao desenvolvimento e mortalidade das lagartas. Para validação do ensaio foi utilizada como testemunha o meio LB estéril (controle negativo), mantido sob as mesmas condições dos isolados testados.

2.6. Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

A identificação dos isolados que apresentaram atividade foi realizada por meio sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, afim de se identificar o gênero e obter aproximação de espécie. Para isso, foi feito a extração do DNA total seguindo o protocolo do kit da qiagen Dnaeasy mini kit, análise de qualidade dos DNAs por eletroforese em gel de agarose e quantificação por nanodrop (NanoDrop 1000 Spectrophotometer – Thermo Scientific). Posteriormente, foi feita amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene 16S rRNA, fD1 (5'-CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G - 3') e rD1 (5'-CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC - 3') (Weisburg et al., 1991), os produtos amplificados foram então sequenciados utilizando o kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing no sequenciador modelo 3130xl – Genetic Analyzer. As sequências obtidas foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos no banco de dados GenBank acessado através do “site” do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”), por meio da ferramenta BLAST local - “Basic Local Alignment Search Tools”.

2.7. Curva de crescimento

O pré-inóculo bacteriano foi inoculado em frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 100µl do isolado e 50 mL de meio LB líquido e incubado a 30 °C e 150 rpm por 24 horas no shaker. Após o período de incubação do pré-inóculo, alíquotas foram transferidas para frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio LB até atingir a DO (Densidade Óptica) de 0,03, este foi considerado o ponto zero da curva. E com intervalos de 8 horas foram coletadas alíquotas de 1 mL do meio crescido e realizado o procedimento da mensuração de

absorbância a 600 nm. A determinação da UFC/mL foi efetuada por meio de diluições seriadas, dessas diluições foram retiradas 100µl e feito plaqueadas em meio LB sólido, com posterior contagem das colônias formadas.

2.8. Análise filogenética do gene 16S rRNA

As sequências dos genes 16S do rRNA dos isolados e sequências representativas de espécies de *Burkholderia* de acordo com List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – LPSN (Euzéby, J.P., 1997) estão disponíveis no banco de dados do GenBank (Savers et al, 2021). As sequências obtidas no sequenciamento foram alinhadas globalmente com T-COFFEE (v.12.00.7fb08c2) (Notredame et al, 2000) usando o modo *mcoffee* (Wallace et al, 2006). As extremidades foram aparadas e os gaps externos foram preenchidos com Ns. A inferência filogenética usando a abordagem máxima verossimilhança foi realizada com o programa IQ-TREE (v.1.5.5) (Nguvent et al., 2015), configurando as opções *-m TEST -alrt 1000 -bb 1000000*. A árvore foi visualizada e editada com programa iTOL (Letunic et al, 2021).

2.9. Triagem da atividade fungicida

Foi feito um teste inicial com todos os isolados adquiridos no isolamento bacteriano. Para avaliação da atividade fungicida, foram usados 3 tipos de fungos, um do gênero *Fusarium*, um do gênero *Colletotrichum* e um outro do gênero *Didymella*. Esses fitopatógenos foram cultivados em placas de petri contendo meio BDA (Batata – Dextrose – Ágar) sólido. Para o teste de bioensaio fúngico foram utilizadas placas de petri contendo meio BDA sólido, um disco do fungo de 5mm foi centralizado na placa e 10µl do cultivo dos isolados coletados estes com o tempo de cultivo de 48 h, foram colocados nas extremidades da placa. O tratamento controle, foi a placa contendo apenas fungo centralizado. O momento de avaliação do halo de inibição, foi estabelecido pelo tempo necessário para que o micélio do patógeno, sem a presença do isolado bacteriano, crescesse sobre toda a superfície da placa. As placas foram incubadas em B.O.D. a 27 °C, 12 horas de fotoperíodo, a atividade fungicida foi confirmada por meio de aparecimento de halo de inibição. O isolado 26 foi

selecionado e este seguiu para mais bioensaios testando os diferentes extratos do isolado. O extrato 1 foi chamado de “controle” este tinha apenas o meio LB estéril, considerado como controle negativo; No extrato 2 isolado crescido em meio LB; 3. Sobrenadante aquecido a 80°C por 30 minutos em banho-maria para a inativação das células viáveis; 4. Sobrenadante filtrado em membrana de 0,22 µm afim de reter células e vírus; 5. O “pellet” obtido a partir de células lisadas oriundas de centrifugação da cultura bacteriana, com ruptura celular por meio de sonicação e ressuspensão foi levado ao volume original com meio LB. Após a obtenção desses extratos foi realizado os bioensaios com os fungos a fim de determinar em qual extrato estaria a atividade.

2.10. Forma de análise dos dados

A seleção inicial de isolados foi realizada com duas repetições, a quantificação da atividade inseticida dos isolados selecionados com duas (cada repetição constituída de 16 lagartas) e a curva de crescimento com quatro repetições. A determinação da DO e UFC do cultivo bacteriano foram realizadas em triplicata. Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado e os resultados analisados pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Scott-knott a 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Triagem da atividade inseticida

Inicialmente os 26 isolados foram testados por meio de bioensaios (Fig. 1), nesse primeiro teste o parâmetro avaliado foi a mortalidade, mas à alta taxa de sobrevivência foi observada em todos os tratamentos. Porém a parcela que estava sendo tratada com isolado 6 foi observado uma redução no tamanho das lagartas quando comparada com as parcelas dos outros isolados testados.

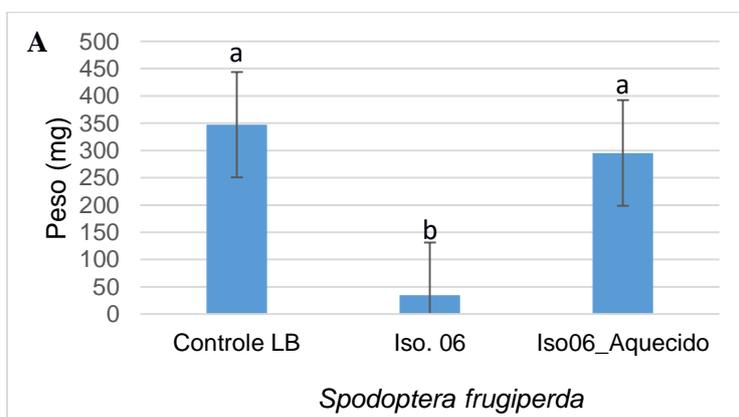


Figura 1. (a) Montagem do bioensaio com utilização dos extratos dos isolados e uso de dieta artificial; (b) figura que ilustra a sobrevivência das lagartas pós 7 dias do bioensaio, não foi apresentada taxa de mortalidade nas lagartas.

Apesar de não haver mortalidade (Fig. 1. (b)), foi observado nos tratamentos que quase todos os isolados se assemelharam ao controle negativo, foi visto que dos 26 isolados trabalhados nos bioensaios apenas um, isolado 06, teve um efeito no desenvolvimento das lagartas tratadas com esse isolado, estas se apresentaram com um tamanho reduzido quando comparada ao controle. Sendo assim, foi escolhido o isolado 06 para prosseguir com mais avaliações.

3.2. Bioensaio da atividade inseticida

Após a seleção do isolado no bioensaio inicial, foi feito um segundo bioensaio (Fig. 2). Nesse ensaio foi realizada a pesagem de cada tratamento para verificar o quanto esse isolado estava inibindo o crescimento das lagartas quando comparado ao seu respectivo controle.



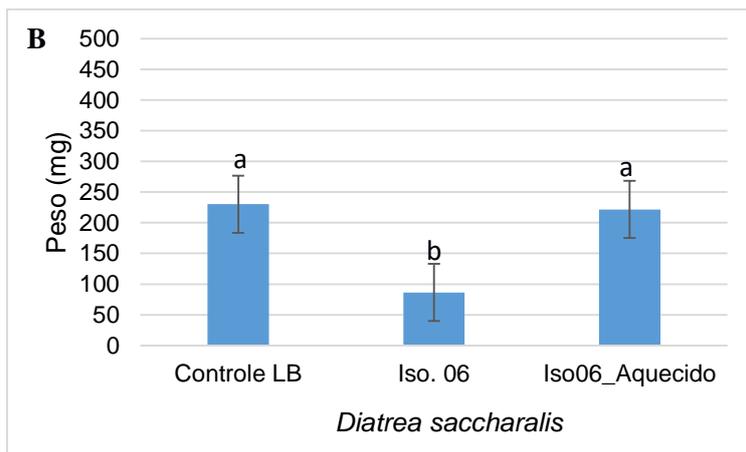


Figura 2. Valores da média do peso em miligramas das lagartas **A.** *D. saccharalis* e **B.** *S. frugiperda*, após o período de avaliação do bioensaio com o uso de dieta artificial e dos extratos: controle (LB); isolado (Iso.06) e o sobrenadante aquecido.

Como demonstrado na Fig. 2, o isolado identificado como *B. thailandensis* foi capaz de reduzir peso das lagartas de *D. saccharalis* e de *S. frugiperda*. O potencial de espécies do gênero *Burkholderia* como agente no controle biológico já foram relatados. Martins, M. R. et al, (2016) relatou em seus resultados que o extrato bacteriano de *Burkholderia* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* com o qual trabalhavam apresentou mortalidade de larvas de percevejo, porém os níveis de mortalidade não foram altos (>53%), sendo assim, os efeitos foram subletais, afetando o desenvolvimento das larvas de percevejo. Nos nossos resultados não foi observado mortalidade, mas sim um subdesenvolvimento nas lagartas que estavam sendo tratadas com o isolado 06. Recentemente em sua tese de doutorado Farinacio (2020) relatou em seus resultados que um isolado bacteriano pertencente ao gênero *Burkholderia* causou 100% de mortalidade em lagartas de *S. frugiperda*. Além disso, em seu estudo, revelou-se que a toxina responsável pela atividade era secretada para o meio de cultivo e que a atividade permanecia mesmo em temperaturas elevadas, com isso, não era necessária a presença de células bacterianas viáveis para que ocorresse a atividade inseticida. Entretanto, nos nossos resultados não houve mortalidade das lagartas e que lagartas que foram tratadas com o sobrenadante do isolado aquecido se assemelharam aos resultados do controle negativo e visto também que não foi observado efeito nas lagartas, o que nos levar a inferir que para que ocorra o

efeito inseticida nas lagartas há a necessidade de adição de células bacterianas viáveis e visto também a perda da atividade em presença de temperatura elevada sugerimos que o componente ativo do isolado 26 é de natureza proteica.

3.3. Curva de crescimento

Observando as primeiras horas de crescimento bacteriano (Figura 2), na fase de latência, onde a bactéria está se adaptando ao meio de cultivo, foi de forma breve o crescimento celular. Notamos que a UFC/mL atingiu $7,27 \times 10^9$ UFC/mL com 56 horas de cultivo. Além disso, foram acompanhados pela turvação do meio de cultivo ao longo do tempo, e a fase exponencial constante, foi sendo registrada pela medição da absorvância. A essa turvação constante na leitura da Densidade Óptica (DO_{600}) pode ser atribuída a substâncias e compostos produzidos no decorrer do tempo do cultivo e por células mortas que vão se acumulando ao meio. Devido a fase de crescimento exponencial ser a que apresenta maior atividade metabólica da célula, a construção da curva de crescimento foi para otimizar o recurso bacteriano em sua maior produção para um maior efeito.

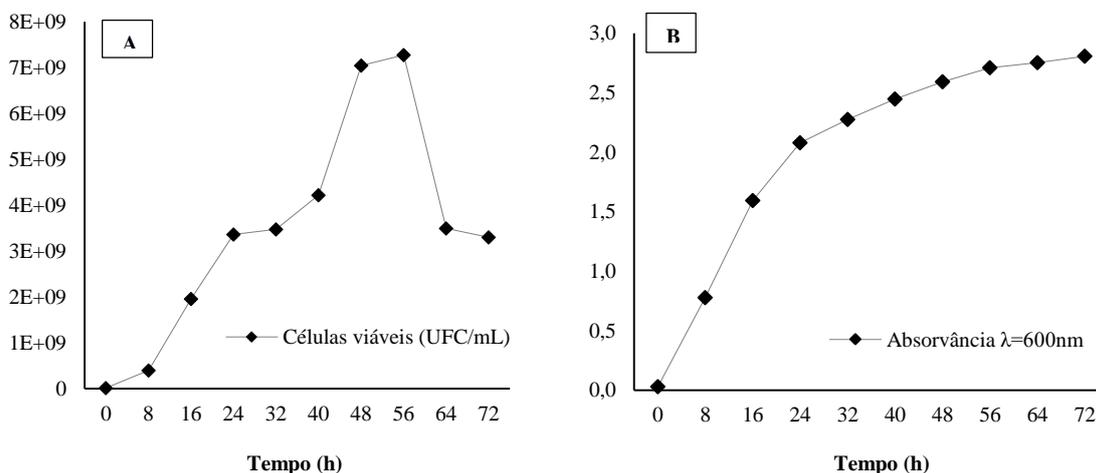


Figura 3. Curva de crescimento pela Unidade Formadoras de Colônias por mililitro do isolado (UFC/mL) foi feita em triplicata. a) Curva de crescimento do isolado 6; b) Acompanhamento por meio de leitura da Densidade Óptica (DO_{600}) da DO_{600} ao longo de tempo de 72 horas de cultivo.

3.4. Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

O isolado que apresentou atividade contra as lagartas foi selecionado para prosseguir ao sequenciamento. As sequências obtidas, a partir do sequenciamento parcial do gene 16S do isolado 06 foram submetidas a ferramenta BlastN para identificação da similaridade com outras hospedadas no banco de dados do GenBank, sendo assim, possível chegar ao gênero *Burkholderia*, apresentando similaridade com a espécie *B. thailandensis*. (Figura 4). As sequências do gene 16S rRNA foram submetidas ao GenBank e receberam o número de acesso OP810447.



select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Burkholderia thailandensis strain FDAARGOS_238 chromosome 2, complete sequence	Burkholderia thailandensis	2734	2734	99%	0.0	100.00%	2940845	CP020391.1
Burkholderia thailandensis strain FDAARGOS_238 chromosome 1, complete sequence	Burkholderia thailandensis	2734	8202	99%	0.0	100.00%	3827809	CP020392.1
Burkholderia thailandensis strain 2002721121 chromosome 2, complete sequence	Burkholderia thailandensis	2734	2734	99%	0.0	100.00%	2940149	CP013410.1
Burkholderia thailandensis strain 2002721121 chromosome 1, complete sequence	Burkholderia thailandensis	2734	8202	99%	0.0	100.00%	3827782	CP013409.1

Figura 4. Figura tirada do site do GenBank (blast.ncbi.nlm.nih.gov), mostrando similaridade da sequência do gene 16S rRNA do isolado 06 (acesso: OP810447), com as que já estavam registradas no banco GenBank.

holderia thailandensis são bactéria gram-negativas, anaeróbicas facultativas, organismo modelo, por ser menos patogênica é muito usada em laboratório para substituir a *B. pseudomallei*, podendo ser encontrada em ambientes comuns de solos (Egbo, et al 2021; Janesomboon, et al 2021). Muitas espécies do gênero *Burkholderia* tem características benéficas como atuantes na fixação biológica de nitrogênio das plantas, e serem promissoras no biocontrole de muitos fitopatógenos como fonte de novos antibióticos e metabolitos secundários (Elshafie & Camele, 2021).

3.5. Triagem da atividade fungicida

No teste inicial foi observado que dos 26 isolados testados, apenas um, isolado 26, apresentou efeito sobre o crescimento dos fungos *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., e *Didymella* sp. O isolado 26 foi selecionado para um segundo bioensaio para melhor visualização na placa de que houve halo de inibição aos fungos testados (Figura 5).

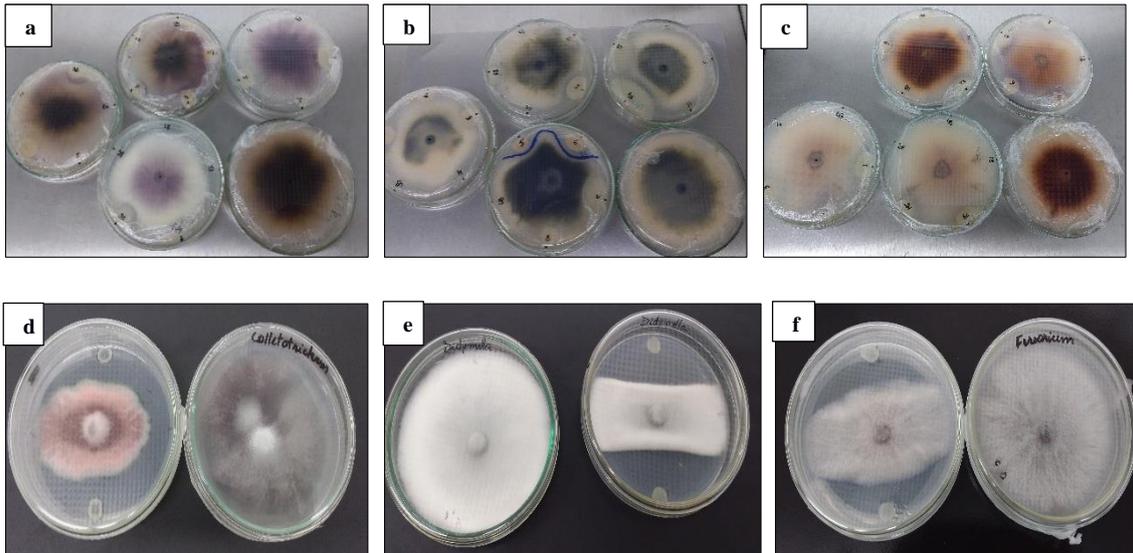


Figura 5. Figuras que ilustram os bioensaios, triagem dos isolados e as posições dos fungos nas placas de Petri. Nas Fig. (d, e, f) foi observado halo de inibição no crescimento dos fungos *Colletotrichum* sp., *Didymella* sp. e (c) *Fusarium* sp. na presença do isolado 26.

3.6. Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

O isolado que demonstrou atividade fungicida, foi selecionado para prosseguir ao sequenciamento. As sequências obtidas a partir do sequenciamento parcial do gene 16S foram submetidas a ferramenta BlastN para identificação da similaridade com outras hospedadas no banco de dados do NCBI, sendo assim foi possível identificar o isolado como pertencendo ao gênero *Burkholderia* sp. (Figura 6). As sequências do gene 16S rRNA foram submetidas ao GenBank e receberam o número de acesso OP810448.

select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Burkholderia sp. 2352 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Burkholderia sp...	2647	2647	100%	0.0	99.79%	1560	JX174229.1
<input checked="" type="checkbox"/> Burkholderia cenocepacia strain VC12802 chromosome 1, complete sequence	Burkholderia ce...	2641	13148	99%	0.0	99.86%	6339862	CP019670.1
<input checked="" type="checkbox"/> Burkholderia sp. strain ASDP2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Burkholderia sp.	2641	2641	99%	0.0	99.86%	1533	OM924031.1
<input checked="" type="checkbox"/> Burkholderia contaminans strain XL73 chromosome 3, complete sequence	Burkholderia co...	2636	10539	99%	0.0	99.79%	3643456	CP046609.1

Figura 6. Figura tirada do site do NCBI - GenBank, mostrando similaridade da sequência do gene 16S rRNA do isolado 26 (acesso: OP810448), com as sequências do banco de dados 16S rRNA.

3.7. Curva de crescimento

O isolado atingiu $3,95 \times 10^9$ UFC/mL também com 6 horas de cultivo, além disso, foram acompanhados pela turvação do meio de cultivo ao longo do tempo. Devido a fase de crescimento exponencial ser a que apresenta maior atividade metabólica da célula, a construção da curva de crescimento foi para otimizar o recurso bacteriano em sua maior produção para um maior efeito.

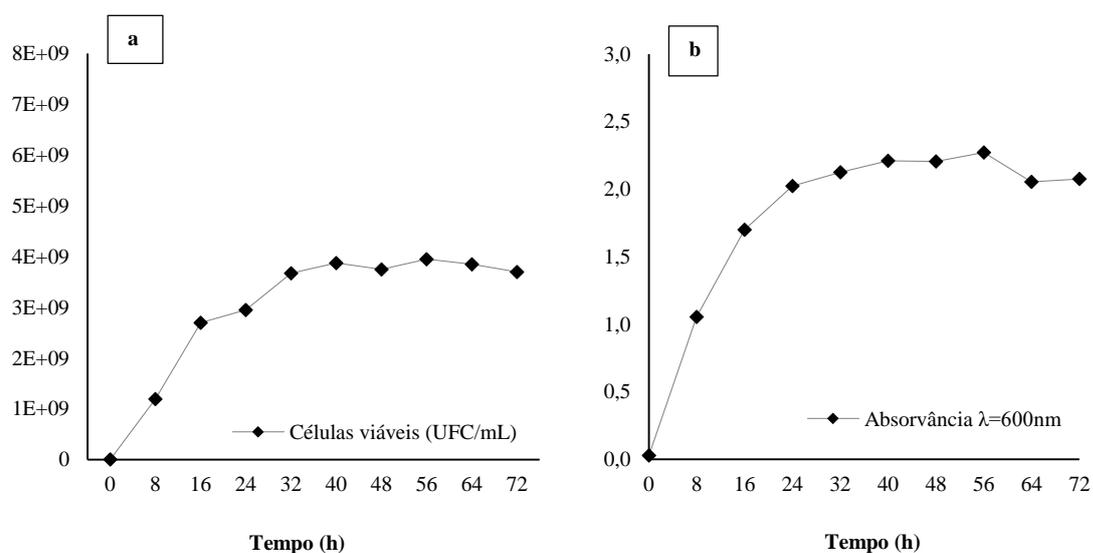


Figura 7. Curva de crescimento pela Unidade Formadoras de Colônias por mililitro do isolado (UFC/mL) e a leitura da Densidade Óptica (DO_{600}). a) Curva de crescimento do isolado 26; b) Acompanhamento da DO_{600} ao longo de tempo de 72 horas de cultivo.

3.8. Bioensaio da atividade fungicida

Como verificado na triagem o isolado 26 mostrou atividade, na forma de inibição do crescimento fúngico quando comparado com outros isolados testados. Sendo assim, foi escolhido para prosseguir com os testes. Na (Fig. 8) é apresentado os resultados da avaliação dos extratos celulares do isolado selecionado.

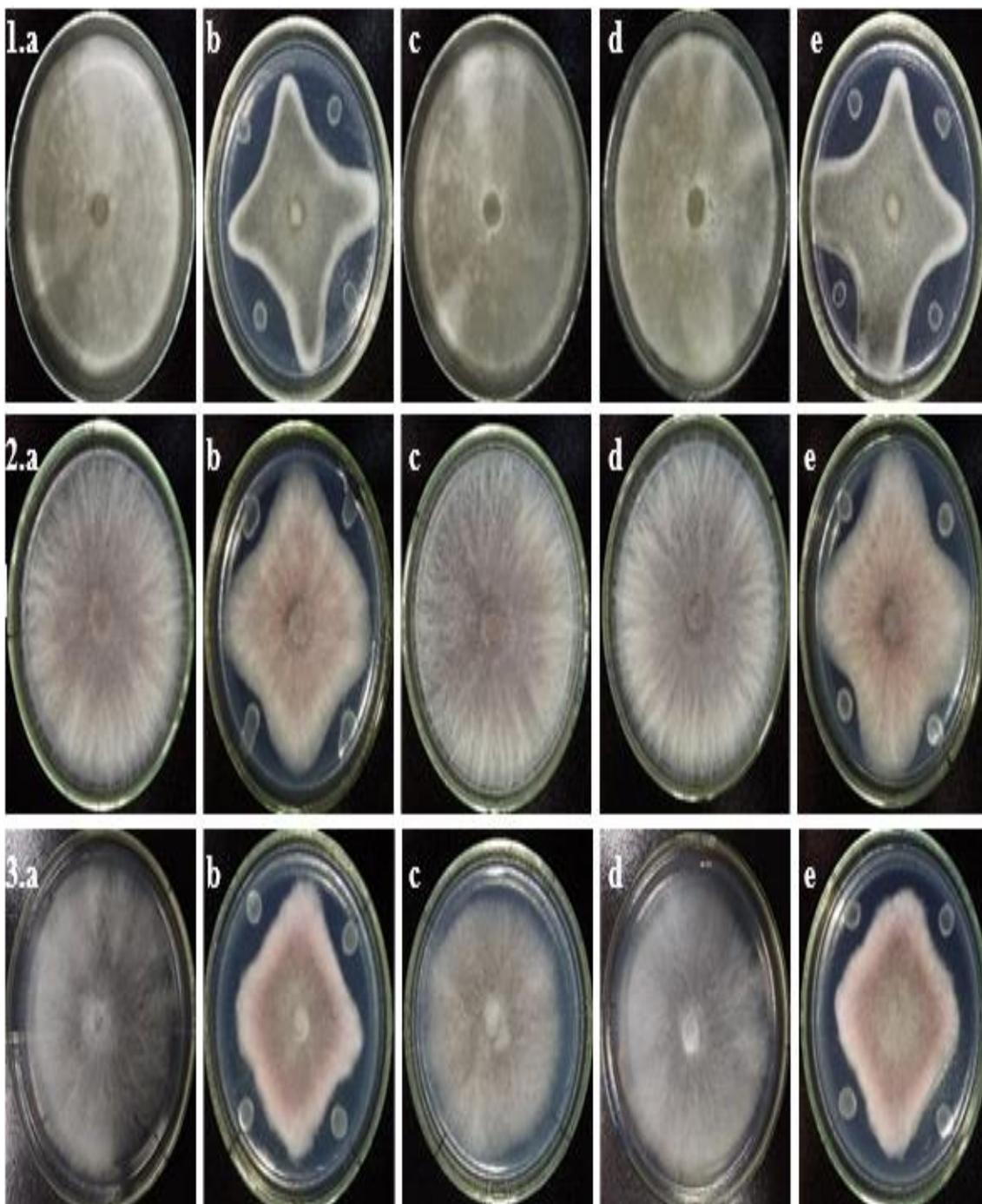


Figura 8. Bioensaios para verificação de atividade fungicida nos diferentes extratos do isolado 26. Nas Fig.8.1. Foram avaliados o fungo *Didymella* sp. (a. controle LB; b. isolado 26; c. aquecido; d. filtrado; e. pellet.). Nas Fig.8.2. Avaliados o *Fusarium* sp. (a. controle LB; b. isolado 26; c. aquecido; d. filtrado; e. pellet.). Nas Fig.8.3. O *Colletotrichum* sp. (a. controle LB; b. isolado 26; c. aquecido; d. filtrado; e. pellet.)

Nesta avaliação observa-se que o meio completo aquecido por 30 min a 80°C em banho-maria não apresentou atividade. Já nas placas contendo o extrato “pellet” observa-se que houve inibição do crescimento dos fungos, provavelmente devido a presença de células vivas do isolado no "pellet". O isolado se aproximou a espécie *B. contaminans*. Segundo Lu et al. (2009) expos em seu trabalho que o microrganismo isolado do solo com o qual trabalhavam, *Burkholderia contaminans* MS14, produzia um composto, um antifúngico que atuava inibindo o crescimento de patógenos. O que nos nossos resultados com a *B. contaminans* se assemelha quanto a atividade de inibição do crescimento dos fungos aqui testados. Um trabalho semelhante a este foi o de Bourscheidt et al. (2021), onde identificaram isolados bacterianos que apresentaram atividade antagônica a fungos do gênero *Fusarium* spp., nos seus resultados o maior número de bactérias antagônicas ao *Fusarium* encontrados nas amostras que pertenciam ao gênero *Burkholderia*, seguida por *Bacillus* e outros, sendo essas capazes de controlar o *Fusarium* spp. Já em nosso trabalho a bactéria *B. contaminans* apresentou efeito inibitório no crescimento de três fungos *Didymella* sp., *Fusarium* sp. e *Colletotrichum* sp. Entretanto, nos nossos resultados foi visto que as placas que estavam com sobrenadante aquecido se assemelharam ao controle negativo no bioensaio fúngico, desta forma não foi observado aparecimento de halo nas placas que tinham alíquotas de sobrenadante aquecido do cultivos bacteriano mostrando que o efeito nos fungos aqui estudados provavelmente deve-se a um composto sensível ao calor. Sugerimos que o componente ativo do isolado 26 também trata-se de um componente de natureza proteica.

3.9. Análise filogenética do gene 16S rRNA

A construção da árvore (Fig. 9) foi para fazer inferência taxonômica. Os resultados indicaram que os isolados 06 e 26 estão mais filogeneticamente relacionados com as espécies do gênero *Burkholderia*.

Tree scale: 0.01

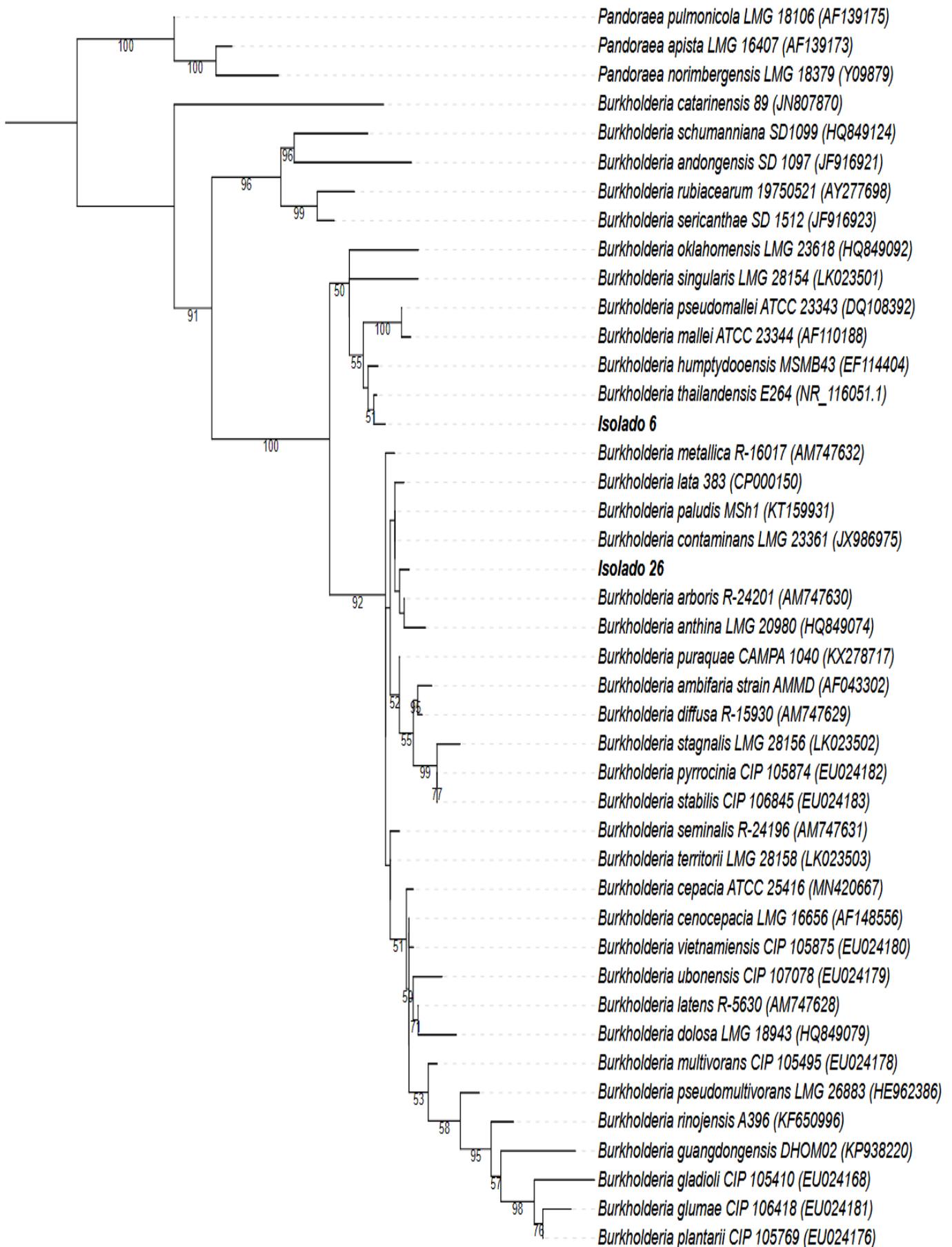


Figura 9. Árvore filogenética do gene 16S rRNA: Mostrando a relação filogenética entre trinta e oito isolados do gênero *Burkholderia* depositados no banco de dados NCBI com um grupo externo do gênero *Pandoraea*.

Após análise filogenética utilizando o sequenciamento do gene 16S rRNA, e a consulta de similaridade com outras espécies depositadas no banco de dados GenBank nos possibilitou, observar que as sequências dos isolados estudados possuem maior similaridade com espécies do gênero *Burkholderia*. Na Fig. 9 os resultados sugerem uma relação filogenética do Isolado 26 ser mais próximo filogeneticamente as espécies *Burkholderia arboris* e *Burkholderia antina*.

4. CONCLUSÃO

Portanto, os isolados bacterianos 06 e 26 ambos do gênero *Burkholderia* revelaram ter atividade de biocontrole as lagartas de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* e atividade contra os fitopatógenos *Colletotrichum* sp, *Didymella* sp e *Fusarium* sp. Além disso, as atividades de biocontrole avaliadas mostraram-se ausentes na presença de temperatura elevada (80°C), o que nos leva a sugerir que o componente ativo desses isolados são de natureza proteica. Sendo assim, os isolados têm potencial para serem mais explorados em estudos na área do controle biológico.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, Kira Figueredo et al. Caracterização física de diferentes ordens de solo cultivados com cana-de-açúcar no Cerrado Maranhense Physical characterization of different soil orders cultivated with sugarcane in the Maranhense Cerrado. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 56132-56141, 2021.

BOUFLEUR, Thais R. et al. Soybean anthracnose caused by *Colletotrichum* species: Current status and future prospects. **Molecular Plant Pathology**, v. 22, n. 4, p. 393-409, 2021.

BOURSCHEIDT, Maira Laís Both et al. Biodiversidade de bactérias antagônicas a fungos associados à síndrome da morte do capim-marandu (*Brachiaria brizantha*). 2021. <https://doi.org/10.31413/nativa.v9i5.12666>

DAQUILA, Bruno V. et al. Bioactivity of *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) on *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) eggs. **Pest Management Science**, v. 77, n. 4, p. 2019-2028, 2021.

DUARTE, Jair M. et al. Eficácia de híbridos de milho Bt11 no controle de lepidópteros-praga em condições de campo sob infestação natural. 2007. 2009.

EGBO, Timothy E. et al. Interaction of Soil Microbes with Organoclays and their Impact on the Immobilization of Hg under Aerobic Conditions. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 232, n. 4, p. 1-9, 2021.

ELSHAFIE, Hazem S.; CAMELE, Ippolito. An Overview of Metabolic Activity, Beneficial and Pathogenic Aspects of *Burkholderia* Spp. **Metabolites**, v. 11, n. 5, p. 321, 2021.

EUZÉBY, Jean Paul. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 590-592, 1997.

FARINACIO, Renato. **Obtenção de eventos transgênicos de cana-de-açúcar portando os genes *bar* e *vip3Aa* e identificação e análise da atividade inseticida de *Burkholderia* sp. contra *Spodoptera frugiperda***. 2019, Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista-UNESP, 2020.

FOERSTER, L. A. Seletividade de inseticidas a predadores e parasitóides. In: PARRA, J. R. P. et al. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, v. 1. 2002.

GEBREZIHHER, Haftay Gebreyesus. Review on management methods of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* JE Smith) in Sub-Saharan Africa. **Int. J. Entomol. Res**, v. 5, n. 2, p. 9-14, 2020.

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of economic entomology**, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

HASSAN, Md Zahid et al. Resistência à ferrugem gomosa do caule em melão: padrão de herança e desenvolvimento de marcadores moleculares. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 10, pág. 2914, 2018.

HORIKOSHI, Renato J. et al. MON 95379 Bt maize as a new tool to manage sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*) in South America. **Pest Management Science**, 2022.

HUANG, Fangneng. Resistance of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, to transgenic *Bacillus thuringiensis* Cry1F corn in the Americas: lessons and implications for Bt corn IRM in China. **Insect Science**, v. 28, n. 3, p. 574-589, 2021.

JAMIL, Saiful Zaimi et al. First incidence of the invasive fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) attacking maize in Malaysia. **BiolInvasions Record**, v. 10, n. 1, 2021.

JANESOMBOON, Sujintana et al. Detection and differentiation of *Burkholderia* species with pathogenic potential in environmental soil samples. **Plos one**, v. 16, n. 1, p. e0245175, 2021.

JURAT-FUENTES, Juan Luis; HECKEL, David G.; FERRÉ, Juan. Mechanisms of resistance to insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Annu. Rev. Entomol**, v. 66, p. 121-140, 2021.

LETUNIC, Ivica; BORK, Peer. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Nucleic acids research**, v. 49, n. W1, p. W293-W296, 2021.

LI, Xiaodan et al. Toxoflavin produced by Burkholderia gladioli from Lycoris aurea is a new broad-spectrum fungicide. **Applied and environmental microbiology**, v. 85, n. 9, p. e00106-19, 2019.

LU, Shi-En et al. Occidiofungin, a unique antifungal glycopeptide produced by a strain of Burkholderia contaminans. **Biochemistry**, v. 48, n. 35, p. 8312-8321, 2009.

MACHADO, Eduardo P. et al. Cross-crop resistance of Spodoptera frugiperda selected on Bt maize to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac and Cry1F proteins in Brazil. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2020.

MANTZOUKAS, Spiridon; ELIOPOULOS, Panagiotis A. Endophytic entomopathogenic fungi: A valuable biological control tool against plant pests. **Applied Sciences**, v. 10, n. 1, pág. 360. 2020.

MARTINS, Paulo Geovani Silva. **Prospecção de proteínas e genes de isolados de *Bacillus thuringiensis* associados ao desenvolvimento do controle biológico de praga em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 2016. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Pernambuco.

NEVES, Fernando Willian; DA SILVA, Rosemeire Alves. Primeiro registro de *Argyrotaenia sphaleropa* (Lepidoptera: Tortricidae) na cultura da soja no Estado do Mato Grosso. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 1, p. 60-66, 2021.

NGUYEN, Lam-Tung et al. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular biology and evolution**, v. 32, n. 1, p. 268-274, 2015.

NOTREDAME, Cédric; HIGGINS, Desmond G.; HERINGA, Jaap. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **Journal of molecular biology**, v. 302, n. 1, p. 205-217, 2000.

PAREDES-SÁNCHEZ, Francisco A. et al. Advances in Control Strategies against *Spodoptera frugiperda*. A Review. **Molecules**, v. 26, n. 18, p. 5587, 2021.

PLOETZ, Randy C. Fusarium-induced diseases of tropical, perennial crops. **Phytopathology**, v. 96, n. 6, p. 648-652, 2006.

REIS, Manoely Abreu et al. Why is oral-induced RNAi inefficient in *Diatraea saccharalis*? A possible role for DsREase and other nucleases. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 186, p. 105166, 2022.

SAYERS EW, Cavanaugh M, Clark K, Pruitt KD, Schoch CL, Sherry ST, Karsch-Mizrachi I. GenBank. **Nucleic acids research**. Jan 8;49(D1) D92-6. 2021.

SCHLINDWEIN, Sandro Luis et al. Agricultural land use dynamics in the Brazilian part of La Plata Basin: From driving forces to societal responses. **Land Use Policy**, v. 107, p. 105519, 2021.

SHARMA, Smriti; KOONER, Rubaljot; ARORA, Ramesh. Insect pests and crop losses. In: **Breeding insect resistant crops for sustainable agriculture**. Springer, Singapore, 2017. p. 45-66. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6056-4_2. 2017.

SILVA, Luiz Eduardo Bezerra et al. Desenvolvimento da cultura do milho (*Zea mays* L.): revisão de literatura. **Diversitas Journal**, v. 5, n. 3, p. 1636-1657, 2020.

SPARKS, Thomas C. et al. Insecticides, biologics and nematicides: Updates to IRAC's mode of action classification-a tool for resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 167, p. 104587, 2020.

SUGANTHI, A. et al. Bioefficacy, persistent toxicity, and persistence of translocated residues of seed treatment insecticides in maize against fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797). **Crop Protection**, v. 154, p. 105892, 2022.

TAY, Wee Tek et al. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab is conferred by mutations in an ABC transporter subfamily A protein. **PLoS genetics**, v. 11, n. 11, p. e1005534, 2015.

VAN MOLL, Laurence et al. Microbial symbionts of insects as a source of new antimicrobials: A review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 562-579, 2021.

VIERA-ARROYO, William Fernando et al. Biological Control: A tool for sustainable agriculture, a point of view of its benefits in Ecuador. **Journal of the Selva Andina Biosphere**, v. 8, n. 2, p. 128-149, 2020.

WALLACE, Iain M. et al. M-Coffee: combining multiple sequence alignment methods with T-Coffee. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 6, p. 1692-1699, 2006.

WENZEL, I. M.; Giometti, F. H. C.; Almeida, J. E. M. pathogenicity of ibcb 66 strain of *beauveria bassiana* to the sugar cane weevil *diatraea saccharalis* under laboratory conditions. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, p. 259-261, 2022.

YUAN, Jun et al. Predicting disease occurrence with high accuracy based on soil macroecological patterns of *Fusarium* wilt. **The ISME journal**, v. 14, n. 12, p. 2936-2950, 2020.