

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 18/11/2021.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**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***

Renato Farinacio
Engenheiro Agrônomo

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**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***

Discente: Renato Farinacio

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Coorientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

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

2019

F225o

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* / Renato Farinacio. -- Jaboticabal, 2020
57 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Coorientadora: Janete Aparecida Desidério

1. Controle biológico. 2. Moléculas inseticidas. 3. Glufosinato de amônio. 4. *Saccharum* spp.. 5. Transgênico. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: 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*

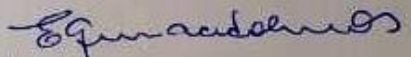
AUTOR: RENATO FARINACIO

ORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

COORIENTADORA: JANETE APPARECIDA DESIDERIO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

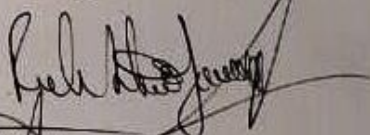
Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



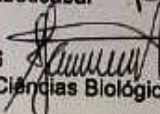
Pesquisador Dr. EDUARDO FERMINO CARLOS
Instituto Agrônomo do Paraná-IAPAR / Londrina/PR

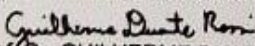


Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. ANDREA SOARES DA COSTA FUENTES
Departamento de Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde-UFSCAR / São Carlos/SP




Prof. Dr. GUILHERME DUARTE ROSSI
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 18 de novembro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Renato Farinacio, nasceu no município de Grandes Rios-PR, em 25 de maio de 1991, onde residiu até o início da graduação em 2009 no curso de Agronomia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em Curitiba-PR, nesta defendeu o trabalho de conclusão de curso intitulado “Estimativa do vigor de sementes de soja e de trigo por meio de testes baseados no crescimento de plântulas”, iniciou em 2013 a Especialização em Agronegócio - Ênfase em Análise de Mercados pela UFPR, com trabalho de conclusão de curso intitulado “Análise de viabilidade do cultivo de tomate em ambiente protegido na microrregião de Ivaiporã – município de Grandes Rios – Paraná”, em 2014 ingressou no curso de mestrado em Agricultura Conservacionista na área de concentração de Genética, Melhoramento e Biotecnologia Vegetal do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), onde defendeu a dissertação intitulada “Aumento de prolina em citrumelo Swingle transgênico (RD29A-P5CSF129A) contribuiu na tolerância ao déficit hídrico”. Neste período, no ano de 2014 trabalhou como monitor nível superior na Associação Regional das Casas Familiares Rurais do Sul (ARCAFAR-SUL) e atuou em 2015 como professor no Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL), posteriormente, em 2016 iniciou o doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista (FCAV-Unesp), onde desenvolveu a presente tese.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Aparecido e Cleonice, e avós (*in memorian*), aos quais certamente jamais serei capaz retribuir todo o apoio, incentivo e ensinamentos transmitidos no decorrer de minha formação pessoal e acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, pela orientação no decorrer deste trabalho, apoio, ensinamentos e amizade. Sempre entusiasmada para o desenvolvimento de novas pesquisas e na busca da excelência de suas produções, sem se abalar pelas adversidades enfrentadas. Certamente a tenho como uma referência a ser seguida.

A Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério, pela co-orientação, por ser sempre muito atenciosa, amiga e disposta a colaborar, em nossas conversas continuamente surgiram excelentes conselhos, e por toda a transmissão de seus conhecimentos em aulas que tive a oportunidade participar.

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, pelo generoso compartilhamento de seu vasto conhecimento em vários assuntos pertinentes ao desenvolvimento deste trabalho, uma referência de qualidade de ensino e pesquisa.

Ao técnico Dr. João Carlos Campanharo, por todo o apoio e colaboração, sem dúvidas um mentor nos aspectos práticos da microbiologia necessários a execução deste trabalho, além de toda amizade no decorrer destes anos.

A técnica Dra. Camila Cesário Fernandes, por todo o apoio dado em assuntos relacionados à área de biologia molecular, em especial ao desenvolvimento da técnica de PCR em tempo real. Tenho grande admiração por sua competência.

Ao Dr. Renato Fernandes Galdiano Junior, grande amigo e instrutor nas técnicas de micropropagação, essenciais ao início deste trabalho.

A Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza por me receber em seu laboratório e possibilitar o desenvolvimento das técnicas relacionadas a transformação genética de cana-de-açúcar, sempre muito disposta e atenciosa na transmissão de seus conhecimentos e execução das atividades. Uma referência na área.

A Dra. Larissa Mara Andrade por todo apoio no desenvolvimento da transformação genética, sempre muito atenciosa e competente.

Ao Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi e ao doutorando Ciro Pedro Guidotti Pinto por todo apoio e colaboração na montagem dos bioensaios com *Diatraea saccharalis*.

A Usina São Martinho pelo fornecimento das posturas de *Diatraea saccharalis*.

Ao Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes e ao técnico André Maurício Múscari pelo fornecimento de posturas de *Spodoptera frugiperda*, sempre muito atenciosos.

A todos os membros do Laboratório de Bioquímica de Microrganismo e Plantas pela ajuda em diversas etapas deste trabalho, e principalmente, por toda a amizade e companheirismo no decorrer destes anos.

A Dra. Sylvia Moraes de Sousa Tinoco e a analista Ma. Meire de Cassia Alves da Embrapa Milho e Sorgo pelo intermédio na obtenção do vetor pMCG1005, desenvolvido e gentilmente cedido pelo Dr. Vicki Chandler da Universidade do Arizona.

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, conhecimentos transmitidos e crescimento profissional e pessoal oferecido.

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

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

Aos autores citados neste trabalho, entre outros, os quais, através de suas publicações forneceram embasamento prático e teórico para elaboração, desenvolvimento e interpretação deste trabalho.

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

SUMÁRIO

	Página
1. CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	1
1.1. Introdução.....	1
1.2. Revisão de literatura.....	3
1.2.1. Transformação genética de cana-de-açúcar para resistência a pragas...	3
1.2.1.1. Cana-de-açúcar e <i>Diatraea saccharalis</i>	3
1.2.1.2. Transgenia em cana-de-açúcar para resistência a pragas	4
1.2.1.3. Tolerância a glufosinato de amônio por transgenia.....	5
1.2.2. <i>Pseudomonas</i> e <i>Burkholderia</i> no controle de pragas agrícolas	6
1.2.2.1. Controle biológico.....	6
1.2.2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> como biopesticida e fonte de genes inseticidas...	7
1.2.2.3. <i>Pseudomonas</i> no controle de pragas.....	8
1.2.2.4. <i>Burkholderia</i> no controle de pragas.....	9
1.3. Referências	10
2. CAPÍTULO 2 – Obtenção de eventos de cana-de-açúcar tolerantes ao herbicida glufosinato de amônio e expressão da toxina Vip3Aa para controle de <i>Diatraea saccharalis</i>	16
2.1. Resumo	16
2.2. Introdução.....	17
2.3. Materiais e Métodos	18
2.3.1. Síntese e montagem do gene <i>vip3Aa</i> no vetor de expressão pMCG1005.....	18
2.3.2. Transformação de <i>A. tumefaciens</i> por eletroporação.....	19
2.3.3. Transformação via <i>A. tumefaciens</i> , seleção e regeneração de plantas transgênicas	20
2.3.4. Extração de DNA genômico e confirmação da inserção dos genes	21
2.3.5. Teste de resistência a <i>Diatraea saccharalis</i>	22
2.3.6. Acúmulo amônio em discos foliares causado pelo herbicida glufosinato de amônio	22

2.3.7.	Quantificação da expressão dos genes <i>vip3Aa</i> e <i>bar</i> por PCR em tempo real em cana-de-açúcar.....	23
2.3.8.	Forma de análise dos dados	24
2.4.	Resultados e Discussão	24
2.4.1.	Transformação genética e confirmação de eventos transgênicos.....	24
2.4.2.	Teste de resistência a <i>Diatraea saccharalis</i>	26
2.4.3.	Acúmulo amônio em discos foliares causado pelo herbicida glufosinato de amônio	28
2.4.4.	Expressão gênica.....	29
2.5.	Conclusões.....	32
2.6.	Referências	32
3.	Capítulo 3 – Atividade inseticida contra <i>Spodoptera frugiperda</i> do sobrenadante livre células de alta estabilidade térmica produzido por <i>Burkholderia</i> sp.	37
3.1.	Resumo	37
3.2.	Introdução.....	38
3.3.	Materiais e métodos	40
3.3.1.	Isolados e condições de cultura	40
3.3.2.	Bioensaios com <i>Spodoptera frugiperda</i>	40
3.3.3.	Sequenciamento parcial do gene rRNA 16S	41
3.3.4.	Curva de crescimento e atividade inseticida	41
3.3.5.	Identificação da atividade inseticida nos extratos.....	42
3.3.6.	Caracterização inicial da molécula ativa.....	43
3.3.7.	Eletroforese em SDS-PAGE corado com nitrato de prata.....	44
3.4.	Resultados e discussão.....	44
3.4.1.	Atividade inseticida dos isolados e confirmação de gênero	44
3.4.2.	Caracterização da curva de crescimento	45
3.4.3.	Identificação de atividade inseticida nos extratos.....	46
3.4.4.	Caracterização inicial da molécula ativa.....	49
3.5.	Conclusões.....	53
3.6.	Referências	54

**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***

RESUMO – O ataque de insetos-praga e a competição com plantas daninhas em cultivos agrícolas estão entre as principais causas de perdas de rendimento. Entre as alternativas disponíveis para a redução destas perdas, são preferíveis as que apresentem menores custos, sejam eficazes e seguras. Adicionalmente, estão ocorrendo sucessivos casos de evolução da resistência em populações de pragas e plantas daninhas, isso torna necessária a avaliação dos meios de controle disponíveis para este fim, além da prospecção de novos métodos e moléculas. Neste sentido, a tese foi dividida em três capítulos, o Capítulo 1 abrange as considerações gerais a respeito do tema e os Capítulos 2 e 3 relatam os experimentos científicos desenvolvidos, que tiveram os seguintes objetivos: Capítulo 2, obtenção e avaliação de plantas transgênicas de cana-de-açúcar, variedade SP80-3280, resistentes a *Diatraea saccharalis* e ao herbicida glufosinato de amônio, por meio, respectivamente, da inserção dos genes *vip3Aa* e *bar*, via *Agrobacterium tumefaciens*; e, Capítulo 3, prospecção e caracterização de novos isolados bacterianos pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia* com atividade inseticida contra *Spodoptera frugiperda* e início da caracterização de suas moléculas ativas. No Capítulo 2, obteve-se por meio da transformação genética de cana-de-açúcar 48 eventos PCR positivos, estes foram submetidos a avaliação de resistência à *Diatraea saccharalis*, principal praga da cultura da cana-de-açúcar no Brasil, que resultou na não detecção de eventos resistentes. Enquanto na avaliação de resistência ao glufosinato de amônio foram obtidos eventos transgênicos que não foram afetados pelas concentrações utilizadas deste herbicida. Ao analisar a expressão gênica do gene *bar* e *vip3Aa* por PCR em tempo real, foi observado que o gene *vip3Aa* sob controle do promotor da ubiquitina 1 apresentou níveis de expressão inferiores aos obtidos pelo gene *bar* sob o controle do promotor 4xCaMV35S. Isso pode ter ocorrido pela presença do intron *adh1* acoplado ao promotor ubiquitina 1. Outra possibilidade sugerida é a atuação de mecanismos de silenciamento gênico, ambas as hipóteses têm potencial para limitar a produção da toxina. Entre os eventos obtidos para o gene *bar*, os com menores níveis de expressão foram afetados pelo herbicida, enquanto os que apresentaram maiores níveis não se detectou nenhum efeito, demonstrando-se eficientes. No Capítulo 3, entre os isolados avaliados, destacou-se o B2 (*Burkholderia* sp. isolado 2) com 91% de mortalidade, o qual foi utilizado para as análises posteriores. Obteve-se que a partir de 24 horas de cultivo do isolado em meio líquido houve 100% de mortalidade de *S. frugiperda*. Na avaliação dos extratos celulares, destacaram-se o meio completo, sobrenadante e meio completo aquecido a 60 °C por 2 horas, todos resultaram em 100% de mortalidade das lagartas. Desta forma, não há necessidade de adição à dieta de células bacterianas viáveis para que ocorra o efeito, encontrando-se a atividade inseticida predominantemente presente no meio de cultivo. O componente ativo do sobrenadante demonstrou possuir estabilidade frente a enzima pronase E, ao tratamento de 100°C por 30 min, a autoclave por 20 min e permaneceu no sobrenadante durante a extração proteica com acetona, o que indica não se tratar de uma molécula proteica. Diante dos promissores resultados obtidos

com o isolado B2, futuros esforços serão empregados na identificação da molécula ativa, do espectro de insetos-praga controlado, entre outros testes pertinentes, a fim de determinar seu potencial uso como biopesticida.

Palavras-chave: controle biológico, entomopatógenos, glufosinato de amônio, moléculas inseticidas, *Saccharum* spp., transgênico

**OBTAINING SUGARCANE TRANSGENIC EVENTS WITH THE *bar* AND *vip3Aa*
GENES AND IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF INSECTICIDAL ACTIVITY OF
Burkholderia sp. AGAINST *Spodoptera frugiperda***

ABSTRACT – Pest insect attack and competition with weeds in agricultural crops are among the main causes of yield losses. Among the alternatives available to reduce these losses, those with lower costs, effective and safe, are preferable. In addition, successive cases of resistance evolution are occurring in pest and weed populations, which makes it necessary to evaluate the means of control available for this purpose, as well as the prospection of new methods and molecules. In this sense, the thesis was divided into three chapters, Chapter 1 covers the general considerations on the theme and Chapters 2 and 3 report the scientific experiments developed, which had the following objectives: Chapter 2, obtaining and evaluation of transgenic sugarcane plants, variety SP80-3280, resistant to *Diatraea saccharalis* and ammonium glufosinate herbicide, by respectively, inserting the *vip3Aa* and *bar* genes via *Agrobacterium tumefaciens*; and, Chapter 3, prospecting and characterization of new bacterial isolates belonging to the genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* and beginning of the characterization of their active molecules. In Chapter 2, 48 positive PCR events were obtained through the genetic transformation of sugarcane. They were submitted to control evaluation of the *Diatraea saccharalis*, the main pest of sugarcane crop in Brazil, which resulted in no detection of resistant events. While in the evaluation of resistance to ammonium glufosinate were obtained transgenic events that were not affected by the used concentrations of this herbicide. By analyzing the gene expression of *bar* and *vip3Aa* gene by real-time PCR, it was observed that the *vip3Aa* gene under ubiquitin 1 promoter control showed lower levels of expression than *bar* gene under control of 4xCaMV35S promoter. This may have occurred due to the presence of the ubiquitin 1 promoter coupled intron *adh1*. Another possibility suggested is the action of gene silencing mechanisms, both hypotheses have the potential to limit toxin production. Among the events obtained for the *bar* gene, those with the lowest expression levels were affected by the herbicide, while those with the highest levels did not detect any effect, being considered efficient. In Chapter 3, among the isolates evaluated, B2 (*Burkholderia* sp. isolated 2) stood out with 91% mortality, which was used for further analysis. After 24 h of culture of the isolate in liquid medium, there was 100% mortality of *S. frugiperda*. In the evaluation of cell extracts, the complete medium, supernatant and complete medium heated at 60 °C for 2 h, all resulted in 100% mortality of the caterpillars. Thus, there is no need to add viable bacterial cells to the diet for the effect to occur and the insecticidal activity it is predominantly present in the culture medium. The active component of the supernatant was shown to have stability against the pronase E enzyme, treatment of 100 °C for 30 min, autoclave for 20 min and remained active in the supernatant during protein extraction with acetone, indicating that it was not a protein molecule. From the promising results obtained with the B2 isolate, future efforts will have to be carried out to identify the active molecule, the controlled spectrum insect pest, among other pertinent tests, to determine its potential use as a biopesticide.

Keywords: biological control, entomopathogens, glufosinate ammonium, insecticidal molecules, *Saccharum* spp, transgenic

1. CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1. Introdução

O ataque de insetos-praga é uma das principais causas de perdas de produtividade em cultivos agrícolas no mundo, embora haja várias alternativas a serem empregadas em seu controle é preferível o uso de medidas mais seguras ao homem e ao meio ambiente, eficazes e específicas contra o alvo. No desenvolvimento de métodos baseados em manipulação genética e em biopesticidas, são necessários aprofundados estudos das moléculas inseticidas já conhecidas sobre a praga alvo, além da prospecção de novas moléculas que poderão vir a ser implementadas no manejo integrado de pragas.

A transformação genética de plantas com genes de *Bacillus thuringiensis* Berliner tem sido um grande sucesso comercial, com diversas culturas fazendo uso de seus benefícios (CTNBio, 2019). No entanto, para a cana-de-açúcar, pesquisas e lançamentos comerciais progrediram em um ritmo mais lento, apesar de publicações desde 1997 mostrarem o potencial de uso dos genes de *B. thuringiensis* em cana-de-açúcar (Arencibia et al., 1997). Somente em 2017 houve a primeira liberação comercial no Brasil, de cana-de-açúcar transgênicas, enquanto para o algodão, a primeira liberação para resistência a pragas ocorreu em 2005 (CTNBio, 2019). Outro destaque neste sentido, é que para a cana-de-açúcar ainda não há relatos do uso do gene *vip3Aa* na transformação genética, sabe-se que este apresenta potencial de controle da *Diatraea saccharalis* (Lemes et al., 2014), principal praga da cultura, e distingue-se por possuir mecanismo de ação diferente dos genes *cry* já utilizados comercialmente (Sena et al., 2009; Lemes et al., 2017).

No entanto, a contínua utilização das moléculas inseticidas já descobertas não é sustentável a longo prazo, visto que seu uso, seja por meio da expressão em cultivos transgênicos ou da aplicação via pulverização, estão sucessivamente sendo superadas pela evolução da resistência de pragas, o que ocorre em consequência da massiva utilização de um reduzido número de moléculas inseticidas. Uma alternativa para o controle destas populações resistentes é a prospecção de novas

moléculas que possam ser agregadas nos programas de manejo integrado pragas (Farias et al., 2014; Glare et al., 2017; Labreuche et al., 2017).

A prospecção de moléculas a partir de microrganismos bacterianos tem propiciado um grande sucesso ao longo de décadas, desde as obtidas a partir de *B. thuringiensis*, até as recentes descobertas em outros gêneros bacterianos, como *Pseudomonas* e *Burkholderia* (Cordova-Kreylos et al., 2013; Melo et al., 2016; Wei et al., 2018), trabalhos estes que se iniciaram com a identificação de isolados com atividade inseticida e por meio de sucessivos procedimentos desvendaram as moléculas envolvidas.

Em cultivos agrícolas, assim como na cana-de-açúcar, outro fator de grande impacto na produtividade é a competição com plantas daninhas. O controle destas pode ser facilitado pela introdução na cultura de genes de resistência a herbicida por transgenia, uma importante ferramenta de manejo que pode ser agregada. Esta estratégia já é utilizada comercialmente em diversas culturas por vários anos, mas ainda encontra-se inexplorada comercialmente em cana-de-açúcar no Brasil (Gonzalez et al., 2018; CTNBio, 2019).

Diante do exposto, foram propostos dois objetivos principais:

Obter e avaliar plantas transgênicas de cana-de-açúcar, variedade SP80-3280, resistentes a *D. saccharalis* e ao herbicida glufosinato de amônio, por meio, respectivamente, da inserção dos genes *vip3Aa* e *bar*, via *Agrobacterium tumefaciens*.

Prospectar e caracterizar novos isolados bacterianos pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia* com atividade inseticida contra *Spodoptera frugiperda*, e início da caracterização de suas moléculas ativas.

3.5. Conclusões

Burkholderia B2 foi efetivo no controle da *S. frugiperda*, com taxa de mortalidade de 100%. O componente ativo encontra-se secretado no sobrenadante e demonstrou possuir alta estabilidade térmica, não foi afetado pela enzima proteolítica pronase E e permaneceu no sobrenadante durante a extração proteica com acetona, características que indicam não se tratar de uma molécula proteica. Diante dos promissores resultados obtidos com o isolado B2 esforços estão sendo realizados na identificação da molécula ativa, do espectro controlado de insetos-

praga, entre outros testes pertinentes, a fim de determinar seu potencial uso como biopesticida.

3.6. Referências

Arthurs S, Dara SK (2019) Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. **Journal of Invertebrate Pathology** 165:13–21.

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** 8:93–99.

Braverman M (2010) United States. In.: Kabaluk JT, Svircev AM, Goette MS I, Woo SG (Eds.) **The Use and Regulation of Microbial Pesticides in Representative Jurisdictions Worldwide**. IOBC Global, p. 74–88.

Bravo A, Gill SS, Soberón M (2005) *Bacillus Thuringiensis*: Mechanisms and Use. In.: Lawrence I. G (Ed.) **Comprehensive Molecular Insect Science**. Elsevier, p. 175–205.

Campbell RJ (2007) *Burkholderia* Diversity and Versatility: An Inventory of the Extracellular Products. **J. Microbiol. Biotechnol.** 17:1407–1429.

Chattopadhyay P, Banerjee G, Mukherjee S (2017) Recent trends of modern bacterial insecticides for pest control practice in integrated crop management system. **3 Biotech** 7:1–11.

Chen WJ, Hsieh FC, Hsu FC, Tasy YF, Liu JR, Shih MC (2014) Characterization of an Insecticidal Toxin and Pathogenicity of *Pseudomonas taiwanensis* against Insects. **PLoS Pathogens** 10:1–14 .

Cordova-Kreylos AL, Fernandez LE, Koivunen M, Yang A, Flor-Weiler L, Marrone PG (2013) Isolation and Characterization of *Burkholderia rinojensis* sp. nov., a Non-*Burkholderia cepacia* Complex Soil Bacterium with Insecticidal and Miticidal Activities. **Applied and Environmental Microbiology** 79:7669–7678.

Damalas CA, Koutroubas SD (2018) Current status and recent developments in biopesticide use. **Agriculture** 8: 1-6.

DunhamTrimmer (2018) **Biological Products Markets Around the World**. Disponível em: <<http://www.bpia.org/wp-content/uploads/2018/03/Biological-Products-Markets-Around-The-World.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2019.

Duong-Ly KC, Gabelli SB (2014) Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. In.: Lorsch J (Ed.) **Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C**. Elsevier Inc., p. 85-94.

Eberl L, Vandamme P (2016) Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. **F1000Research** 5:1–10.

Eroglu C, Cimen H, Ulug D, Karagoz M, Hazir S, Cakmak I (2019) Acaricidal effect of cell-free supernatants from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Journal of Invertebrate Pathology** 160:61–66.

Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, Santos AC dos, Omoto C (2014) Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection** 64:150–158.

Flury P, Aellen N, Ruffner B, Péchy-Tarr M, Fataar S, Metla Z, Dominguez-Ferreras A, Bloemberg G, Frey J, Goesmann A, Raaijmakers JM, Duffy B, Höfte M, Blom J, Smits THM, Keel C, Maurhofer M (2016) Insect pathogenicity in plant-beneficial pseudomonads: Phylogenetic distribution and comparative genomics. **ISME Journal** 10:2527–2542.

Flury P, Vesga P, Péchy-Tarr M, Aellen N, Dennert F, Hofer N, Kupferschmied KP, Kupferschmied P, Metla Z, Ma Z, Siegfried S, Weert S, Bloemberg G, Höfte M, Keel CJ, Maurhofer M (2017) Antimicrobial and insecticidal: Cyclic lipopeptides and hydrogen cyanide produced by plant-beneficial *Pseudomonas* strains CHA0, CMR12a, and PCL1391 contribute to insect killing. **Frontiers in Microbiology** 8:1–15.

Gassmann AJ, Petzold-Maxwell JL, Keweshan RS, Dunbar MW (2011) Field-Evolved Resistance to Bt Maize by Western Corn Rootworm. **PLoS ONE** 6:1–7.

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** 30:250–258.

Glare TR, Jurat-Fuentes JL, O’Callaghan M (2017) Basic and Applied Research: Entomopathogenic Bacteria. In.: Lawrence LA (Ed.) **Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice**. Elsevier Inc., pp. 47–67.

Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA (1976) Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium. **Journal of Economic Entomology** 69:487–488.

Hsu CH, Nguyen AD, Chen YW, Wang SL (2014) Tyrosinase inhibitors and insecticidal materials produced by *Burkholderia cepacia* using squid pen as the sole carbon and nitrogen source. **Research on Chemical Intermediates** 40:2249–2258.

LAEMMLI UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature** 227:680–685.

Liang TW, Chen CH, Wang SL (2015) Production of insecticidal materials from *Pseudomonas tamsuii*. **Research on Chemical Intermediates** 41:7965–7971.

Lim DJ, Yang SY, Noh MY, Lee CW, Kim JC, Kim IS (2017) Identification of lipopeptide xantholysins from *Pseudomonas* sp.DJ15 and their insecticidal activity against *Myzus persicae*. **Entomological Research** 47:337–343.

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

Loper JE, Henkels MD, Rangel LI, Olcott MH, Walker FL, Bond KL, Kidarsa TA, Hesse CN, Sneh B, Stockwell VO, Taylor BJ (2016) Rhizoxin analogs, orfamide A and chitinase production contribute to the toxicity of *Pseudomonas protegens* strain Pf-5 to *Drosophila melanogaster*. **Environmental Microbiology** 18:3509–3521.

Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. **Journal of Molecular Biology** 3:208–218.

Marrone Bio Innovations (2019) **Venerate® XC Bioinsecticide Improves Insect Control**. Disponível em: <<https://marronebio.com/products/venerate/>>. Acesso em: 18 jun. 2019.

Parte AC (2018) LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 68:1825–1829.

Péchy-Tarr M, Bruck DJ, Maurhofer M, Fischer E, Vogne C, Henkels MD, Donahue KM, Grunder J, Loper JE, Keel C (2008) Molecular analysis of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of *Pseudomonas fluorescens*. **Environmental Microbiology** 10:2368–2386.

Pierce (2004) **Acetone precipitation of proteins - TR0049.0. TECHNICAL RESOURCE**. Disponível em: <http://www.bidmcmassspec.org/uploads/Acetone_precipitation.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2019.

Rangel LI, Henkels MD, Shaffer BT, Walker FL, Davis EW, Stockwell VO, Bruck D, Taylor BJ, Loper JE (2016) Characterization of toxin complex gene clusters and insect toxicity of bacteria representing four subgroups of *Pseudomonas fluorescens*. **PLoS ONE** 11:1–22.

Rensburg JBJ Van (2007) First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (fuller) to bt-transgenic maize. **South African Journal of Plant and Soil** 24:147–151.

Ruffner B, Péchy-Tarr M, Ryffel F, Hoegger P, Obrist C, Rindlisbacher A, Keel C, Maurhofer M (2013) Oral insecticidal activity of plant-associated pseudomonads. **Environmental Microbiology** 15:751–763.

Ruiu L (2015) Insect pathogenic bacteria in integrated pest management. **Insects** 6:352–367.

Salazar-Gutiérrez JD, Castelblanco A, Rodríguez-Bocanegra MX, Teran W, Sáenz-Aponte A (2017) *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* SL0708 pathogenicity in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology** 20:1112–1121.

Schellenberger U, Oral J, Rosen BA, Wei J-Z, Zhu G, Xie W, McDonald MJ, Cerf DC, Diehn SH, Crane VC, Sandahl GA, Zhao J-Z, Nowatzki TM, Sethi A, Liu L, Pan Z, Wang Y, Lu AL, Wu G, Liu L (2016) A selective insecticidal protein from *Pseudomonas* for controlling corn rootworms. **Science** 354:634–637.

Storer NP, Babcock JM, Schlenz M, Meade T, Thompson GD, Bing JW, Huckaba RM (2010) Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of economic entomology** 103:1031–8.

Wei JZ, O'Rear J, Schellenberger U, Rosen BA, Park YJ, McDonald MJ, Zhu G, Xie W, Kassa A, Procyk L, Perez Ortega C, Zhao JZ, Yalpani N, Crane VC, Diehn SH, Sandahl GA, Nelson ME, Lu AL, Wu G, Liu L (2018) A selective insecticidal protein from *Pseudomonas mosselii* for corn rootworm control. **Plant Biotechnology Journal** 16:649–659.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology** 173:697–703.

Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, 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** 36:1251–1275.

Yalpani N, Altier D, Barry J, Kassa A, Nowatzki TM, Sethi A, Zhao JZ, Diehn S, Crane V, Sandahl G, Guan R, Poland B, Ortega CP, Nelson ME, Xie W, Liu L, Wu G (2017) An *Alcaligenes* strain emulates *Bacillus thuringiensis* producing a binary protein that kills corn rootworm through a mechanism similar to Cry34Ab1/Cry35Ab1. **Scientific Reports** 7:1–10.