

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

**CARACTERIZAÇÃO INTEGRAL DO GENE *16S rRNA* DE
BACTÉRIAS NÃO ESPORULANTES E SUA AÇÃO CONTRA
Anticarsia gemmatalis HÜBNER 1818 (LEPIDOPTERA,
NOCTUIDAE)**

Higor de Oliveira Alves

Biólogo

2020

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

**CARACTERIZAÇÃO INTEGRAL DO GENE *16S rRNA* DE
BACTÉRIAS NÃO ESPORULANTES E SUA AÇÃO CONTRA
Anticarsia gemmatalis HÜBNER 1818 (LEPIDOPTERA,
NOCTUIDAE)**

Higor de Oliveira Alves

Orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

A474c	<p data-bbox="438 1393 667 1417">Alves, Higor de Oliveira</p> <p data-bbox="438 1435 1182 1541">Caracterização integral do gene 16S rRNA de bactérias não esporulantes e sua ação contra <i>Anticarsia gemmatalis</i> HÜBNER 1818 (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE) / Higor de Oliveira Alves. -- Jaboticabal, 2021</p> <p data-bbox="461 1554 705 1579">54 f. : tabs., fotos, mapas</p> <p data-bbox="438 1632 1198 1700">Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p data-bbox="461 1713 943 1738">Orientador: Jackson Antônio Marcondes de Souza</p> <p data-bbox="461 1792 896 1816">1. Microbiologia. 2. Bacteria. 3. Soja. I. Título.</p>
-------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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.

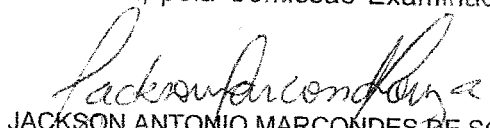
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO INTEGRAL DO GENE 16S rRNA DE BACTÉRIAS NÃO ESPORULANTES E SUA AÇÃO CONTRA *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER, 1818 (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)

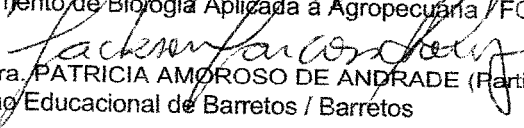
AUTOR: HÍGOR DE OLIVEIRA ALVES

ORIENTADOR: JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


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


Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. PATRICIA AMOROSO DE ANDRADE (Participação Virtual)
Fundação Educacional de Barretos / Barretos

Jaboticabal, 20 de novembro de 2020

DADOS CURRÍCULARES DO AUTOR

Higor de Oliveira Alves, nascido dia 18 de junho de 1996 na cidade de Miguelópolis – SP. Técnico em Agropecuária pela E.T.E.C Laurindo Alves de Queiroz (2013). Licenciado em Biologia pelo Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – UNIFEB (2017). Durante a graduação participou do projeto interdisciplinar do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação à Docência – PIBID, trabalhando com projetos voltados a Física e Biologia, na ocasião, na escola Benedito Pereira Cardoso Professor (2016 – 2017). Atualmente é mestrando no programa de Microbiologia Agropecuária, com dedicação exclusiva, na Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal (UNESP - FCAV), atuando na linha de pesquisa Genética Molecular de Microrganismos. Tem experiência na área de microbiologia geral. Atualmente desenvolve pesquisas na área de Microbiologia Agropecuária, atuando principalmente nos seguintes temas: controle biológico de grandes pragas e prospecção de microrganismos entomopatogênicos.

“Tudo tem começo e meio. O fim só existe para quem não percebe o recomeço.”

(Luiz Gasparetto)

Dedico este trabalho a minha mãe Raquel e minha avó Laide, que nunca mediram esforços para que eu conseguisse alcançar meus objetivos, sempre me amparando e dando forças para continuar em todos os momentos.

Dedico a todos os meus amigos que jamais me deixaram desistir e sempre acreditaram na minha capacidade e força de vontade.

Dedico a todos aqueles que por algum motivo não tiveram a mesma oportunidade de estar aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora por estarem ao meu lado sempre.

A minha mãe Raquel que, com muito empenho, sempre se sacrificou para que os meus sonhos fossem realizados.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza pela paciência durante os momentos de orientação, pelas risadas e boas conversas.

Aos meus melhores amigos por sempre me darem suporte em qualquer circunstância.

Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária pelo suporte durante a realização do projeto de mestrado.

Ao pessoal do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, que tornaram essa caminhada mais alegre. Obrigado por todos os momentos de alegria e descontração vividos.

Ao Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, a Prof^a. Dra. Janete Aparecida Desidério e ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos por me concederem a estrutura e materiais utilizados durante a realização do projeto.

Ao Departamento de Fitossanidade e ao Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk pelo suporte e materiais utilizados durante a realização do projeto.

À Universidade Estadual Paulista - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, por toda sua estrutura.

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

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Aos amigos que fiz.

RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de Soja (*Glycine max*), uma leguminosa extremamente importante devido a sua fonte de proteínas e óleos essenciais para humanos e animais, além de suas aplicações nos diversos ramos da indústria. A lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) é uma grande praga que acomete essa cultura, e que, atualmente, é controlada através de defensivos agrícolas químicos e também biológicos a base *Bacillus thuringiensis*. O objetivo deste trabalho foi realizar uma prospecção de microrganismos do solo, caracteriza-los por meio do gene *16S rRNA* e realizar bioensaios para analisar a capacidade de letalidade ou subletalidade desses isolados contra as larvas de *A. gemmatalis*. O sequenciamento do gene marcador foi completo, abrangendo todas as regiões conservadas do mesmo para determinar a posição filogenética dos isolados. Em relação aos bioensaios, não foram notadas capacidade de letalidade e até mesmo de subletalidade que fossem consideradas significantes, tanto para as bactérias esporulantes, quanto para as bactérias não esporulantes testadas. Apesar das bactérias testadas neste trabalho não possuírem efeitos significativos de controle da praga estudada, elas possuem outras características importantes para serem estudadas e prospectadas biotecnologicamente nos diversos setores industriais.

Palavras-chave: Bioensaio. Controle biológico. Lagarta-da-soja.

ABSTRACT

Brazil is the world largest producer of Soy (*Glycine max*), an extremely important legume due to its source of proteins and essential oils for humans and animals, in addition to its applications in the various branches of industry. The velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) is a great pest that affects this crop, and which, currently, is controlled by chemical and also biological pesticides based on *Bacillus thuringiensis*. The objective of this work was to prospect soil microorganisms, characterize them using the *16S rRNA* gene and perform bioassays to analyze the lethality or subletality of these isolates against *A. gemmatalis* larvae. The sequencing of the marker gene was complete, covering all conserved regions of it to determine the phylogenetic position of the isolates. Regarding the bioassays, no lethality or even subletality capacity was found that were considered significant, both for the sporulant bacteria and for the non-sporulant bacteria tested. Although the bacteria tested in this work do not have significant effects on the control of the studied pest, they have other characteristics that are worth studying and prospecting biotechnologically in the various industrial sectors.

Keywords: Bioassay. Biological control. Velvetbean caterpillar.

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR: Polymerase Chain Reaction

PVC: Policloreto de Vinila

TY: Yeast Triptone

LB: Luria Bertani

NaCl: Cloreto de Sódio

MgSO₄: Sulfato de Magnésio

FeSO₄: Sulfato Ferroso

ZnSO₄: Sulfato de Zinco

MnSO₄: Sulfato de Manganês

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Similaridade das sequências 16S <i>rRNA</i> de isolados bacterianos com base no GenBank, utilizando a ferramenta nucleotídeo BLAST (BLASTn). Onde os isolados LGA-V05_22, LGA-V20F, LGA-V05_6 e LGA-V20C estão presentes no filo Proteobacteria, enquanto o isolado LGA-V05_13 está presente no filo Firmicutes.....	30
Tabela 2 - Bioensaio do teste de mortalidade <i>Anticarsia gemmatalis</i> usando os isolados não esporulantes.....	34
Tabela 3 - Bioensaio do teste de mortalidade <i>Anticarsia gemmatalis</i> usando os isolados esporulantes.....	35
Tabela 4 - Peso das pupas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> sob efeito de inóculo em diversas concentrações de duas linhagens de isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Localização geográfica dos sítios de coleta na Fazenda Itaquere, Nova Europa/SP, Brasil. (A) Região correspondente a Usina Santa Fé S.A, com área de plantio. (B) Detalhe do canal mestre de distribuição de vinhaça.....22
- Figura 2 - Avaliação do DNA genômico extraído dos cinco isolados não esporulantes, por meio de eletroforese em gel de agarose 0.8%. Na canaleta: (P) padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®), 1: LGA-V05_22, 2: LGA-V20F, 3: LGA-V05_6, 4: LGA-V20C e 5:LGA- V05_13.....27
- Figura 3 - Avaliação do produto de PCR dos cinco isolados, por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%. Na canaleta: (P) padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®), 1:LGA-V05_22, 2: LGA-V20F, 3: LGA-V05_6, 4: LGA-V20C e 5: LGA-V05_13.....28
- Figura 4 - Detalhe do dendrograma que agrupa os isolados LGA-V05_6, LGA-V20C e LGA-V05_22, recortado do dendrograma original (Anexo 2).....32
- Figura 5 - Detalhe do dendrograma que agrupa o isolado LGA-V20F, recortado do dendrograma original (Anexo 2).....33
- Figura 6 - Detalhe do dendrograma que agrupa o isolado LGA-V05_13, recortado do dendrograma original (Anexo 3).....33
- Anexo 1 - Dendrograma evidenciando os isolados do solo parcialmente caracterizados por Almeida (2017) utilizando o método Neighbor-Joining com 1000 bootstrap. Onde os ramos correspondem a respectivamente aos gêneros: A) *Bacillus*; B) *Acinetobacter*, C) *Chromobacterium* e D) *Corynebacterium*, *Arthrobacter* e *Sinomonas*.....52
- Anexo 2 - Dendrograma original que corresponde aos isolados caracterizados pelo marcador 16S *rRNA* usando o método Neighbor-Joining e 1000 bootstrap.....53
- Anexo 3 - Dendrograma original que corresponde aos isolados caracterizados pelo marcador 16S *rRNA* usando o método Neighbor-Joining e 1000 bootstrap.....54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	Utilização de microrganismos no controle biológico.....	14
2.2	<i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner 1818 (Lepidoptera: Noctuidae).....	15
2.3	A cultura da soja (<i>Glycine Max</i>) (L. Merrill).....	16
2.4	O gene <i>16S rRNA</i>	17
3	OBJETIVOS.....	20
3.1	Objetivo geral.....	20
3.2	Objetivos específicos.....	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1	Origem e obtenção dos isolados bacterianos.....	21
4.2	Extração de DNA e amplificação do gene <i>16S rRNA</i>	22
4.3	Sequenciamento dos amplicons <i>16S rRNA</i>	23
4.4	Análise das assinaturas moleculares dos isolados bacterianos através de bioinformática.....	24
4.5	Criação e manutenção de <i>A. gemmatalis</i>	25
4.6	Bioensaios com isolados esporulantes e não esporulantes.....	25
4.7	Análise dos resultados dos bioensaios.....	26
5	RESULTADOS.....	27
5.1	Qualidade do DNA genômico.....	27
5.2	Qualidade da pureza do produto de PCR.....	27
5.3	Análise de isolados bacterianos por sequenciamento total do gene <i>16S rRNA</i>	28
5.4	Filogenia dos isolados com base no sequenciamento total do gene <i>16S rRNA</i>	31
5.5	Bioensaio de bactérias não esporulantes.....	34
5.6	Bioensaio de bactérias esporulantes.....	34
6	DISCUSSÃO.....	36
7	CONCLUSÃO.....	42
	REFERÊNCIAS.....	43
	ANEXOS.....	52

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é uma das leguminosas mais importantes do mundo, fornecendo uma abundante fonte de proteína e óleo para humanos e animais. Também fornece matéria-prima significativa para processos farmacêuticos e industriais. No entanto, a soja é severamente infectada por diversos patógenos que vão desde insetos-pragas até bactérias, fungos e vírus (DONG *et al.*, 2018; SIMONATO; GRIGOLLI; OLIVEIRA, 2014).

A lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) é uma entre as principais pragas da cultura da soja, que também acomete outras culturas como amendoim, alfafa, feijão, ervilha, arroz e trigo, acarretando grandes perdas e ocasionando queda na produtividade dos grãos. Encontra-se desde a região central dos Estados da América até a Argentina. Ela é encontrada em todo o Brasil, em maior frequência na região Sul. Sua forma imatura, a lagarta, é quem possui a maior importância diante da espécie, se alimenta por meio das folhas da planta e, por isso, o seu prejuízo está ligado ao desfolhamento da cultura quando presente em grandes populações, decorrente da destruição do limbo e nervuras (FIGUEIREDO, 2013; HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2003; GALLO *et al.*, 2002; FIAZ *et al.*, 2018).

O controle biológico na cultura da soja, desde décadas passadas se mostra efetivo, dados da safra de 1997/1998, mostram que, o *Baculovirus anticarsia*, um microrganismo entomopatogênico, foi utilizado em mais de 2 milhões de hectares de soja no Brasil, tornando-se o maior programa de controle biológico naquela ocasião (MOSCARDI *et al.*, 2011). O uso do mesmo impede que os insetos-praga consigam atingir níveis de prejuízo capazes de causar grandes danos econômicos, além de possuir algumas vantagens que se sobrepõem ao uso de defensivos agrícolas como ser atóxico ao homem, ambiente e ser prejudicialmente específico a esses insetos-praga (DONG *et al.*, 2018; SIMONATO; GRIGOLLI; OLIVEIRA, 2014).

O grande desafio para o uso de microrganismos entomopatogênicos no manejo de pragas como *Anticarsia gemmatalis*, é a seleção de populações resistentes devido ao uso contínuo de formulações biológicas compostas por proteínas Cry e Vip de *Bacillus thuringiensis*. Atualmente existem diversas proteínas que são sintetizadas devido à expressão desses dois genes, porém, devido à

amplitude em que a seleção de populações de pragas relacionadas a estas proteínas vem crescendo, fazem-se necessárias novas pesquisas no âmbito, para a prospecção de novas moléculas bioinseticidas capazes de combater ou auxiliar no manejo de *A. gemmatilis* (SOSA-GÓMEZ; MIRANDA, 2012).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Utilização de microrganismos no controle biológico

A população mundial cresce a cada dia mais, e com ela, a necessidade de se produzir mais em um menor espaço de terra e essa ação tem gerado cada vez mais o aumento do uso de defensivos agrícolas tradicionais para combater pragas. Os biopesticidas são ferramentas utilizadas no controle biológico de diversas culturas, visto que são compostos que não agredem o meio ambiente, como os defensivos agrícolas sintéticos que, além de poluição, causam diversas doenças aos seres humanos e estes fatores prejudiciais somados à resistência das pragas a estes defensivos sintéticos têm chamado a atenção de diversos produtores. Assim, no momento da aplicação, diminuem o uso de pesticidas sintéticos e incluem a utilização de biopesticidas, fazendo uma rotação de produtos durante o manejo de pragas, ou até mesmo, utilizam somente biopesticidas durante o manejo quando possível (GLARE *et al.*, 2012).

Existem, atualmente, diversos microrganismos que são utilizados no controle biológico de inseto-praga em diversas culturas, como o *B. thuringiensis*. Pertencente à família Baccilaceae, é uma bactéria gram-positiva, esporulante e, justamente por meio dessas esporulações, são formadas inclusões cristalinas, e tais cristais produzidos possuem uma notável ação entomopatogênica, conferindo sua importância como agente biológico no controle de insetos-praga. Seu mecanismo de ação se dá a partir da dissolução desses cristais e ativação da proteína Cry no mesêntero do inseto. Seus esporos são encontrados e isolados de diversos ambientes como rizosfera, solo, água fresca, crustáceos, anelídeos, mamíferos insetívoros e poeira de grãos e insetos. A maioria das estirpes de *B. thuringiensis* possuem a capacidade de produzir mais de um cristal, esses são produzidos por diferentes proteínas Cry, existem estirpes que produzem até cinco cristais diferentes. (MACEDO *et al.*, 2012; RAYMOND *et al.*, 2010; SEBASTIÃO, 2015).

Bacillus subtilis, uma bactéria onipresente, encontrada em diversos habitats e que não apresenta grau de patogenicidade contra humanos ou ambiente. Além de seu potencial contra insetos-pragas, também possui ação patogênica contra nematoides, mosquitos e fungos. Os compostos produzidos por *B. subtilis* possuem

ação diversificada, que surtem efeito desde inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos como *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Biopolaris sorokiniana*, como também a inibição de atividade patogênica de *Phytophthora capsici*; que causa enorme dano econômico em pepino, pimenta, tomate e feijão. *Bacillus amyloliquefaciens* está entre uma das bactérias das quais mais se fabricam biopesticidas, ela produz uma proteína ativa patogênica contra fungos fitopatogênicos que causam antracnose em diversas culturas. As *Pseudomonas* spp. estão entre os grupos mais heterogêneos e ecológicos do mundo. Algumas espécies possuem notável ação contra fungos, larvas e nematoides patogênicos. Possuem uma caracterizada diversidade de níveis metabólicos, devido ao seu sistema metabólico complexo (MNIF; GHRIBI, 2015).

2.2 *Anticarsia gemmatalis* Hübner 1818 (Lepidoptera: Erebidae)

Anticarsia gemmatalis, conhecida popularmente como lagarta-da-soja é uma das principais pragas desfolhadoras de soja no Brasil, sendo também a mais comum e encontrada em praticamente todas as regiões de cultivo. Causa danos de até 100% dependendo da localidade de incidência e do estágio de desenvolvimento em que se encontra a cultura. As lagartas são caracterizadas por possuírem cinco pares de falsas pernas abdominais e ainda podem apresentar diversas cores como totalmente verdes, preta com listras brancas ou pardo avermelhadas (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2000; SOSA-GÓMEZ *et al.*, 1993; MOSCARDI *et al.*, 2012).

O processo reprodutivo da mariposa ocorre à noite, incluindo o acasalamento e a oviposição. Durante o período de incubação, que dura cerca de três dias, a fêmea pode colocar até mil ovos, sendo cerca de 80% desses ovos depositados até os primeiros dez dias de vida da fêmea que possui longevidade de até 20 dias aproximadamente. Os ovos possuem coloração verde clara assim que depositados, porém, com o passar dos dias, sua cor pode se tornar de acinzentada a marrom escuro próximo a eclosão das larvas. Os ovos são depositados na parte inferior da folha, ramos, pecíolos e caule da planta (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2000).

O inseto passa por seis estádios larvais, podendo chegar a 40 mm e logo se transformam em pupas no solo. O ciclo do ovo ao adulto pode chegar a 27 dias

aproximadamente. Os estádios iniciais recebem o nome de estádios de fio, justamente porque as lagartas se locomovem de um local para o outro na planta por meio de um fio de seda. Nesta fase de fio, raspam o tecido foliar e, a partir do terceiro estádio consomem o limbo foliar e as nervuras, tendo como consequência a perda de massa foliar da planta e redução da taxa fotossintética, ocasionando em casos extremos, a perda total da folha. É válido ressaltar que a lagarta da soja ataca a planta não somente nas fases de desenvolvimento, como em todas as fases, causando prejuízos mediante de sua nutrição e perda de massa foliar, propiciando a morte do vegetal (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2000; SALVADOR, 2008).

O período de incubação da larva é de três dias, nos dois primeiros ínstaes, as larvas raspam o parênquima foliar e, a partir do terceiro, são capazes de perfurar as folhas, tornando o 4º, 5º e 6º ínstaes das fases larvais os mais responsáveis pelo consumo da folha, totalizando uma perda de massa foliar de até 96% (FIGUEIREDO, 2013).

2.3 A cultura da soja (*Glycine max*) (L.) Merrill)

A Soja cultivada é uma planta herbácea, está inserida na classe Magnoliopsida, que representa as dicotiledôneas, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, gênero *Glycine* L. Pode ser classificada de acordo com seu tempo de maturação em: precoce, semiprecoce, médio, semi-tardio e tardio. Apresenta dois estágios de desenvolvimento: um vegetativo, que corresponde ao período de emergência da plântula até o desenvolvimento das primeiras flores e o reprodutivo que marca o início da floração até o fim do ciclo da cultura. Seu tamanho pode variar de 0,60 cm a 1,50 cm e possui um ciclo de vai de 90 a 160 dias dependendo dos fatores e condições ambientais (DONG *et al.*, 2004; SEDIYAMA, 2009; SOUZA *et al.*, 2015; MIRANDA *et al.*, 2003; NEUMAIER, 2000; EMBRAPA, 2006).

A soja é uma das culturas mais importantes diante do cenário mundial, e sua importância está ligada à sua versatilidade na indústria, dela se produzem óleos, rações animais, alimentos e outros compostos químicos. É uma cultura originada e domesticada inicialmente na Ásia, e sua disseminação para o Ocidente se deu por

meio de navegações. No Brasil, o primeiro relato sobre o cultivo da soja se deu no estado da Bahia, em 1882, logo foi levada por imigrantes japoneses a São Paulo e, somente em 1914 tivemos sua introdução no Rio Grande do Sul, sendo o local onde as variedades trazidas dos Estados Unidos melhor se adaptaram (FREITAS, 2011).

Devido à realização de programas de melhoramento da soja no Brasil, foi possível a sua implementação e cultivo em regiões de baixas latitudes. Este avanço da cultura para estas áreas foi possível devido à inserção de genes que atrasam o florescimento, favorecendo a característica de período juvenil mais longo. O êxito na sua expansão também decorreu em detrimento de diversas variedades resistentes da cultura (FREITAS, 2011).

O Brasil é o maior produtor de soja em todo o mundo. A produção de soja no mundo todo na safra de 2019/2020 chegou a 337,298 milhões de toneladas, onde a produção do Brasil chegou a 124,845 milhões de toneladas. Em relação à produção no Brasil, o estado que mais produziu e produz soja é o Mato Grosso, com uma produção total de 35,885 milhões de toneladas. Entretanto, uma nova via se torna cada vez mais promissora para se cultivar soja no norte e nordeste do país, chamada de Mapitoba. Esta região do cerrado inclui o oeste baiano, sul do Piauí, sul do Maranhão e norte do Tocantins, possui condições edafoclimáticas favoráveis. A adoção de tecnologias no cultivo da cultura também reflete em sua alta produtividade nessas áreas (EMBRAPA, 2019; FREITAS, 2011).

Dentre todos os fatores responsáveis pela alta produção de soja, estão, principalmente, os níveis elevados de consumo mundial em relação ao crescente poder aquisitivo da população em países desenvolvidos, demandando diretamente uma elevada produção do grão (VENCATO *et al.*, 2010).

2.4 O gene 16S RNA

Os organismos são agrupados por meio da taxonomia, a área da ciência que estuda a classificação, que por sua vez faz parte da sistemática, a área da ciência que estuda a diversidade e as relações entre os organismos. A taxonomia dos procariotos é dividida em três áreas separadas que se inter-relacionam:

classificação, nomenclatura e caracterização. É de suma importância a identificação de microrganismos e, implicar um nome a uma cepa bacteriana, podendo distinguir se a bactéria é patogênica ou não, é um dos vários exemplos na qual podem ser utilizados os critérios de classificação, nomenclatura e caracterização (SENTAUSA; FOURNIER, 2013).

A classificação de microrganismos foi realizada durante vários anos apenas com o auxílio de características fenotípicas, porém, com o advento da biologia molecular e o avanço da genética, novas técnicas de classificação de microrganismos foram surgindo, como hibridação DNA-DNA, surgida no ano de 1980. Com o desenvolvimento da PCR, em 1980, e a caracterização de microrganismos por meio do gene *16S rRNA*, houve grandes mudanças na classificação de microrganismos procariontes. A caracterização por meio do gene *16S rRNA* já era amplamente aceita nos anos de 1990, contudo, somente alguns anos depois, em 2002, é que foi reconhecida como peça chave na classificação taxonômica (SENTAUSA; FOURNIER, 2013).

Os isolados bacterianos são caracterizados por meio da comparação de homologia do gene *16S rRNA* com sequências existentes em ferramentas de comparação como o BLAST e Seqmatch (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2011).

Os ribossomos bacterianos possuem duas subunidades, uma subunidade maior (50S) contendo os genes *23S* e *5S* e, uma subunidade menor (30S) contendo o gene *16S*, ambos os genes são conservados funcionalmente e evolutivamente. Esta classificação é denominada através de coeficiente de sedimentação obtido na centrifugação e derivado entre tamanho e densidade da molécula, chamado de Svedberg (S). Estes genes são seguidos por espaços que são chamados de regiões espaçadoras (ITS), onde também pode estar presente o gene tRNA. Cada um desses genes possui respectivamente 2905, 160 e 1542 nucleotídeos (INUI *et al.*, 2012; MENNA *et al.*, 2006; FIGUEIREDO; TOLEDO; MARCONDES, 2009).

Sabe-se, que baseado no genoma de *Escherichia coli*, uma bactéria de referência, o gene *16S* possui aproximadamente 1500 pares de base, que pode variar entre microrganismos. Esses pares de base são delimitados por meio de nove regiões conservadas, necessárias para o desenho dos primers, e nove regiões chamadas de hiper-variáveis, regiões consideradas como cronômetro molecular. É

através das regiões hiper-variáveis que é possível estimar o parentesco filogenético entre as diversas populações microbianas (WEISBURG *et al.*, 1991; NEEFS *et al.*, 1990; WANG; QIAN, 2009; FIGUEIREDO; TOLEDO; MARCONDES, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar a prospecção, seleção e caracterização de isolados bacterianos do solo quanto ao potencial entomopatogênico contra a praga da soja (*A. gemmatalis*).

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a criação de manutenção de *A. gemmatalis*;
- Preparar suspensões dos isolados do solo;
- Verificar a mortalidade de larvas de *A. gemmatalis* por meio de bioensaios e comparar com *Bacillus thuringiensis*.
- Caracterizar taxonomicamente os isolados promissores por meio do 16S *rRNA*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Origem e obtenção dos isolados bacterianos

O trabalho foi realizado utilizando dez isolados bacterianos não esporulantes, pertencentes ao Laboratório de Genética Aplicada (LGA), e duas cepas esporulantes de *Bacillus thuringiensis*, pertencentes ao Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), do Departamento de Biologia Aplicado à Agropecuária (FCAV/UNESP). Os microrganismos LGA utilizados foram isolados a partir de amostras do solo, da fazenda Itaquerê, Usina Santa Fé S.A (Nova Europa, São Paulo, Brasil) (Figura 1). As amostras foram coletadas de diferentes solos agrocoltiváveis em uma profundidade de 0-20 cm (OMORI *et al.*, 2016). Os isolados com a nomenclatura LGA-EV são referentes ao solo do canal mestre da vinhaça (o qual transporta a vinhaça da indústria ao campo, sob ação da gravidade) e os isolados com nomenclatura LGA-V são do solo com plantio de cana-de-açúcar e irrigação de vinhaça, previamente caracterizados parcialmente por Almeida (2017) (Anexo 1). Os isolados bacterianos foram obtidos após homogeneização e diluição seriada de 1 g de amostra dos solos em solução salina [NaCl 0.85% (p/v)], a 250 rpm por 30 min à temperatura ambiente. Diluições de 10^5 – 10^8 foram distribuídas em meio sólido de cultivo “PEG” [composto por (g/L): K₂HPO₄ (0,6), MgSO₄ (0,2), NaCl (0,1), Extrato de Levedura (1,0), Glicose (10,0), e Agar (9,0); pH 6,9], acrescido de cicloheximida (300 µg/mL) e incubadas por 15 dias a 28°C. Colônias distintas foram obtidas e cultivadas em meio PEG líquido, por 48 h a 28°C, 120 rpm, e estocadas em ultrafreezer a -80°C na presença de glicerol [20% (v/v)].

Figura 1 - Localização geográfica dos sítios de coleta na Fazenda Itaquerê, Nova Europa/SP, Brasil. (A) Região correspondente a Usina Santa Fé S.A, com área de plantio. (B) Detalhe do canal mestre de distribuição de vinhaça



Fonte: Google Earth, Wikipedia e Omori *et al.* (2016).

4.2 Extração de DNA e amplificação do gene *16S rRNA*

Cerca de 1 ml de cada cultura obtida em meio PEG, correspondente a 50 mg de células, foi sedimentado e lavado em solução salina [NaCl 0.85% (p/v)] para proceder-se a extração de DNA, baseado na adaptação do método desenvolvido para obtenção de DNA total de bactérias (MARMUR, 1961). A lise celular foi realizada por meio da adição de enzima lisozima (20 mg/mL), na presença de RNase (50 µg/mL). Em seguida, procedeu-se a dissociação do complexo DNA/proteínas por meio da desnaturação com 2,0 % (p/v) do detergente Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e aumento da força iônica com 1 M Acetato de Sódio, pH 5,2. A separação do DNA de outras macromoléculas aconteceu pela extração orgânica com um volume de Clorofórmio:Álcool Isoamílico [24:1 (v/v)] e a precipitação do DNA com 2 volumes de Etanol. As amostras tiveram o excesso de etanol evaporado em Concentrador Plus (Eppendorf), na opção D-AL e sem ajuste de temperatura. O DNA foi ressuscitado em 100 µL de TE (10:1) pH 8,0, a 4 °C.

Após caracterização eletroforética [Agarose 0,8 % (p/v)] e quantificação do DNA em aparelho Nanodrop 1000 Spectrophotometer (ThermoScientific – Uniscience), as amostras de DNA foram estocadas em freezer -20 °C. Foram obtidos

amplicons de 1,5 Kb a partir do gene *16S rRNA*, para determinação da assinatura molecular de cada isolado, por meio de PCR. Foram aplicados os oligonucleotídeos iniciadores (primers) universais fD1 (8-27) <5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'> e rD1 (1525-1541) <5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'> (WEISBURG *et al.*, 1991), descritos para as regiões alvo de *Escherichia coli* K12. A reação de amplificação consistiu em: 40,0 ng DNA molde; 7,5 pmol de cada primer universal; 1,75 mM MgCl₂; 0,2 mM de Desoxirribonucleotídeos Trifosfatos (dNTPs); 2,0 µl de Tampão 10X; 1U da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen); em um volume final de 20 µL. O programa de amplificação foi: 94°C/5 min; 35 ciclos a 94°C/30 s, 56°C/40 s, 72°C/90 s; 72°C/7 min, realizados em um termociclador PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.). O tamanho e pureza dos amplicons gerados foram verificados por eletroforese [Agarose 1,5 % (p/v)]. Foram processados amplicons para os isolados LGA-V05_13, LGA-V05_6, LGA-V20C, LGA-V20F e LGA-V05_22.

4.3 Sequenciamento dos amplicons *16S rRNA*

As sequências de DNA dos amplicons foram determinadas para identificação do gênero bacteriano afiliado. Dada à pureza das reações de PCR, reações de sequenciamento de DNA foram realizadas sem a necessidade de purificação adicional de amplicons. Para sequenciamento de DNA, além dos primers externos (fD1 e rD1), foram utilizados os primers internos à região *16S rRNA* (1,5 Kb), desenhados por L. M. Cruz e descritos por Menna *et al.* (2006): 362f (339–362) <5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG-3'>, 786f (764-786) (5'-CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG-3') e 1203f (1179-1203) (5'-GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC-3'). A cobertura concatenada do amplicon atinge em média até 1,3 Kb.

As reações de sequenciamento foram padronizadas para um volume final de 10 µl, utilizando os seguintes reagentes: 0,5 pmol de primer; tampão de sequenciamento 1X; 1,0 µl de enzima BigDye (Thermo Fisher Scientific); 7 ng de DNA total bacteriano (para os primers fD1 e rD1) ou 7 ng de amplicon *16S rRNA* (para os primers 362f, 786f e 1203f). O programa de amplificação foi: 96°C/2 min; 40 ciclos a 96°C/10 s, 52°C/20 s, 60°C/4 min. Cada reação de sequenciamento foi

precipitada com 80 µl de isopropanol 75% (v/v) e submetida a sucessivas lavagens em etanol 70% (v/v) gelado, para remoção dos dideoxinucleotídeos trifosfatos (ddNTPs) marcados não incorporados à reação. As amostras foram secas em fluxo laminar por 1 h, ressuspensas com 9,0 µl de Hi-Di Formamide (4311320 - ABI Prism) e desnaturadas a 95°C por 5 min. O sequenciamento dos amplicons foi realizado no sequenciador capilar modelo ABI 3100 Automated Sequencer (PerkinElmer).

4.4 Análise das assinaturas moleculares dos isolados bacterianos através de bioinformática

Os eletroferogramas gerados pelo sequenciador capilar foram avaliados quanto à qualidade (Phred \geq 20). O gene *16S rRNA* foi concatenado nos seus aproximadamente 1,5 Kb pelo pacote de programas Phred/Phrap/Consed (GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). Após a montagem dos contigs *16S rRNA*, as sequências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos contra o banco de dados de nucleotídeos (não redundante) do GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI), utilizando a ferramenta nucleotide BLAST (BLASTn) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

Para o alinhamento das sequências, utilizou-se o programa MAFFT v7.215 (KATOH *et al.*, 2002). A busca pela melhor matriz de substituição de nucleotídeos, para correção de taxas de mutações nos dados de alinhamento, foi realizada com o pacote Phangorn (SCHLIEP, 2011) no software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). A matriz de alinhamento e a matriz de substituição de nucleotídeos foram usadas no programa online IQTREE (TRIFINOPOULOS *et al.*, 2016) para construção da árvore filogenética baseada em Maximum Likelihood (ML). Foram usadas as opções de otimização das frequências de nucleotídeos ML, análise de bootstrap Ultrafast e 1.000 repetições para os testes de bootstrap e SH-aLRT branch.

4.5 Criação e manutenção de *A. gemmatalis*

As larvas foram mantidas com dieta artificial adaptada por Greene, Leppla e Dickerson (1976), e eram depositadas duas lagartas em cada pote de 70 ml, permanecendo até a fase de pupa. Em seguida, 20 -25 pupas foram depositadas em potes de 1 litro com forro de papel. Após isso, os potes foram tampados e as pupas permaneceram até chegarem à fase adulta. Os adultos foram colocados em gaiolas feitas de tubos de PVC (30,0 cm de altura x 28 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel sulfite branco nas laterais e mantidos com uma dieta líquida à base de cerveja 2,5% e mel 10%. Os ovos eram coletados a cada oviposição dos adultos e colocados em potes de um litro com dieta artificial no fundo e tampados.

4.6 Bioensaios com isolados esporulantes e não esporulantes

Isolados não esporulantes: Foram utilizados 10 isolados não esporulantes. Além dos LGA-V05_13, LGA-V05_6, LGA-V20C, LGA-V20F e LGA-V05_22, foram utilizados aqueles processados por Miranda (2020), a saber, LGA-V05D, LGA-EV05, LGA-EV08, LGA-V20B e LGA-V20G. Cada um dos isolados foram cultivados em meio TY líquido (conteúdo para 1 L: 5,0 g de Triptona, 3,0 g de extrato de levedura e 0,87 g de NaCl; pH 7,0) em um pré-inóculo de 25 ml sob agitação de 120 rpm à 27°C, por 24 hs (Shaker Incubador Modelo G25 New Scientific). Após este período, o pré-inóculo foi vertido em um inóculo de 75 ml, onde ficou sob agitação a 200 rpm, 27°C por 48 h. A dieta utilizada nos bioensaios foi a padronizada por Greene, Leppla e Dickerson (1976) com modificações, sem adição de Nipagin e Tetraciclina (Fungicida e Bactericida, respectivamente). A dieta foi colocada em até 1/3 dos potes de acrílico (29 mm de altura x 20 mm de diâmetro) e, após secagem da mesma, foram pipetados 75 µl do caldo de cultivo bacteriano. Posteriormente a secagem do caldo, foi depositada uma lagarta em cada pote. Cada tratamento com um respectivo isolado consistiu de 50 repetições, seguido de um tratamento com a testemunha (H₂O), totalizando 11 tratamentos. O bioensaio foi avaliado após 10 dias de montagem do experimento.

Isolados esporulantes: Cada um dos isolados de *B. thuringiensis*, designados LGBBA-1304 e LGBBA-1355, foram cultivados em meio LB líquido contendo sais

(conteúdo para 1L: Glicose 1,0 g; Caldo Nutritivo 8,0 g; Extrato de Levedura 5,0 g; MgSO₄ 0,3 g; Triptona 10,0 g; FeSO₄ 0,02 g; ZnSO₄ 0,02 g; MnSO₄ 0,02 g; NaCl 5,0 g; pH 7,5) em um pré-inóculo de 62,5 ml sob agitação 120 rpm à 27°C por 24 h. Após esse período, o pré-inóculo foi vertido em 187,5 ml, onde ficou sob agitação 200 rpm à 27°C, por 48 h. A dieta utilizada nos bioensaios foi a padronizada por Greene, Leppla e Dickerson (1976). A dieta foi colocada em até 1/3 dos potes de acrílico (29 mm de altura x 20 mm de diâmetro). Após secagem da dieta, foram pipetados 75 µl do caldo de cultivo e, posteriormente à secagem do caldo, foi depositada uma lagarta em cada pote. Para o caldo de cultivo contendo esporos, foram delimitadas seis concentrações para cada isolado: 3×10^4 , 3×10^5 , 3×10^6 , 3×10^7 , 3×10^8 e 3×10^9 . Cada concentração consistia de um tratamento de 30 repetições, seguido de um tratamento com testemunha (H₂O) e um tratamento com o produto comercial Dipel®, onde foram utilizados 16, 80 g do produto dissolvido em 0,5 L de água, totalizando 8 tratamentos. O bioensaio foi avaliado após 7 dias de montagem do experimento.

4.7 Análise dos resultados dos bioensaios

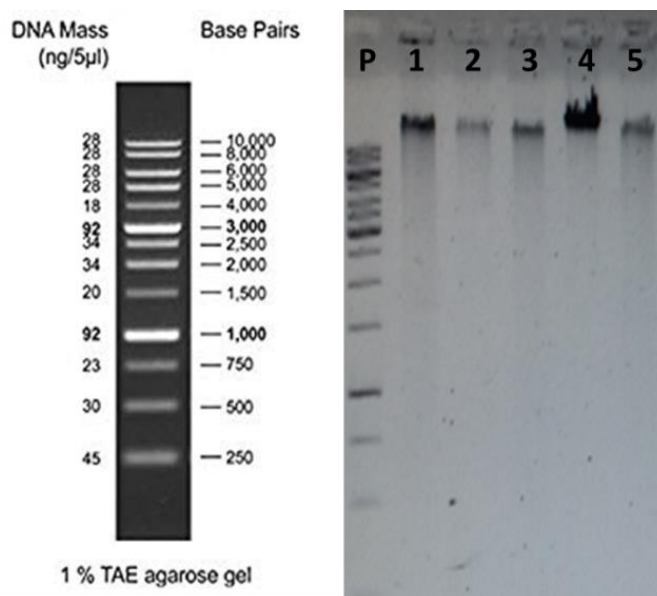
Os resultados dos bioensaios foram obtidos por meio de análise no software R com teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS

5.1 Qualidade do DNA genômico

Foi relatado um perfil de qualidade na extração do DNA genômico devido ao aparecimento de uma única banda de alto peso molecular. Foi utilizado o padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®) como padrão de tamanho molecular. O DNA extraído foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 2).

Figura 2 - Avaliação do DNA genômico extraído dos cinco isolados não esporulantes, por meio de eletroforese em gel de agarose 0.8%. Na canaleta: (P) padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®), 1: LGA-V05_22, 2: LGA-V20F, 3: LGA-V05_6, 4: LGA-V20C e 5: LGA-V05_13

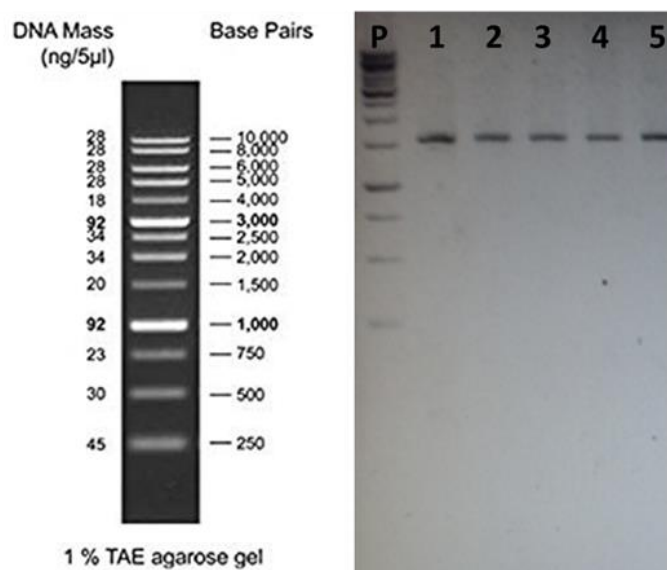


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Qualidade da pureza do produto de PCR

A qualidade do produto da amplificação da PCR foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando o padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®) como padrão de tamanho molecular. O aparecimento de uma banda de forte intensidade na posição de 1500 pb indica o amplicon de 16S *rRNA* esperado (Figura 3).

Figura 3 - Avaliação do produto de PCR dos cinco isolados, por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%. Na canaleta: (P) padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®), 1:LGA-V05_22, 2: LGA-V20F, 3: LGA-V05_6, 4: LGA-V20C e 5: LGA-V05_13



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Análise de isolados bacterianos por sequenciamento total do gene *16S rRNA*

Cinco tipos diferentes de seqüências de gene *16S rRNA* foram encontradas para as bactérias analisadas. As seqüências correspondem a praticamente o gene completo (1540 Kb), determinado pela sobreposição de seqüências contíguas que foram produzidas por amplicons de diferentes reações. O tamanho concatenado das seqüências *16S rRNA* envolvidas no alinhamento variou de 777 a 1477, sendo o menor para o isolado V05_13 e o maior para V05_22. Independente desta variação, o percentual de cobertura das seqüências geradas para os isolados pelo alinhamento com seqüências do banco correspondeu a 100% para todos os isolados, exceto V20C que atingiu a marca de 99% (Tabela 1).

Nesta análise, o mais alto percentual de identidade, ou identidade máxima, para as seqüências de cada alinhamento correspondeu a 99%. A consulta de similaridade é correspondente ao grau em que os nucleotídeos estão relacionados, expressos no percentual de identidade entre as seqüências. A identidade entre as seqüências mostra uma medida em que duas seqüências de nucleotídeos apresentam os mesmos resíduos na mesma posição de alinhamento.

Os resultados foram altamente corroborados pelo alto nível de similaridade entre as sequências (mínimo de 99%). A ferramenta BLASTn utilizada serve para busca com sequências de consulta mais curtas e comparação cruzada de espécies. As sequências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos contra o banco de dados de nucleotídeos não redundante [Nucleotide collection (nr/nt)], que é uma coleção de sequências de várias fontes, incluindo todo GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), DDBJ (DNA Data Bank of Japan), e PDB (Protein Data Bank).

Após consulta de similaridade com sequências disponíveis no banco de dados, os isolados bacterianos foram classificados e distribuídos em dois filos distintos: Proteobacteria e Firmicutes. Os isolados do solo sob cultivo de cana-de-açúcar, fertirrigado com vinhaça (V), obtiveram representantes dos dois filos, com predomínio em Proteobacteria. Os gêneros de cada um dos cinco isolados diferenciaram entre si, não havendo nenhuma igualdade. Em nível de espécie os isolados também diferenciaram entre si, não havendo nenhuma repetição, ficando a maior predominância de espécies no filo Proteobacteria.

Tabela 1 – Similaridade das sequências 16S rRNA de isolados bacterianos com base no GenBank, utilizando a ferramenta nucleotídeo BLAST (BLASTn). Onde os isolados LGA-V05_22, LGA-V20F, LGA-V05_6 e LGA-V20C estão presentes no filo Proteobacteria, enquanto o isolado LGA-V05_13 está presente no filo Firmicutes

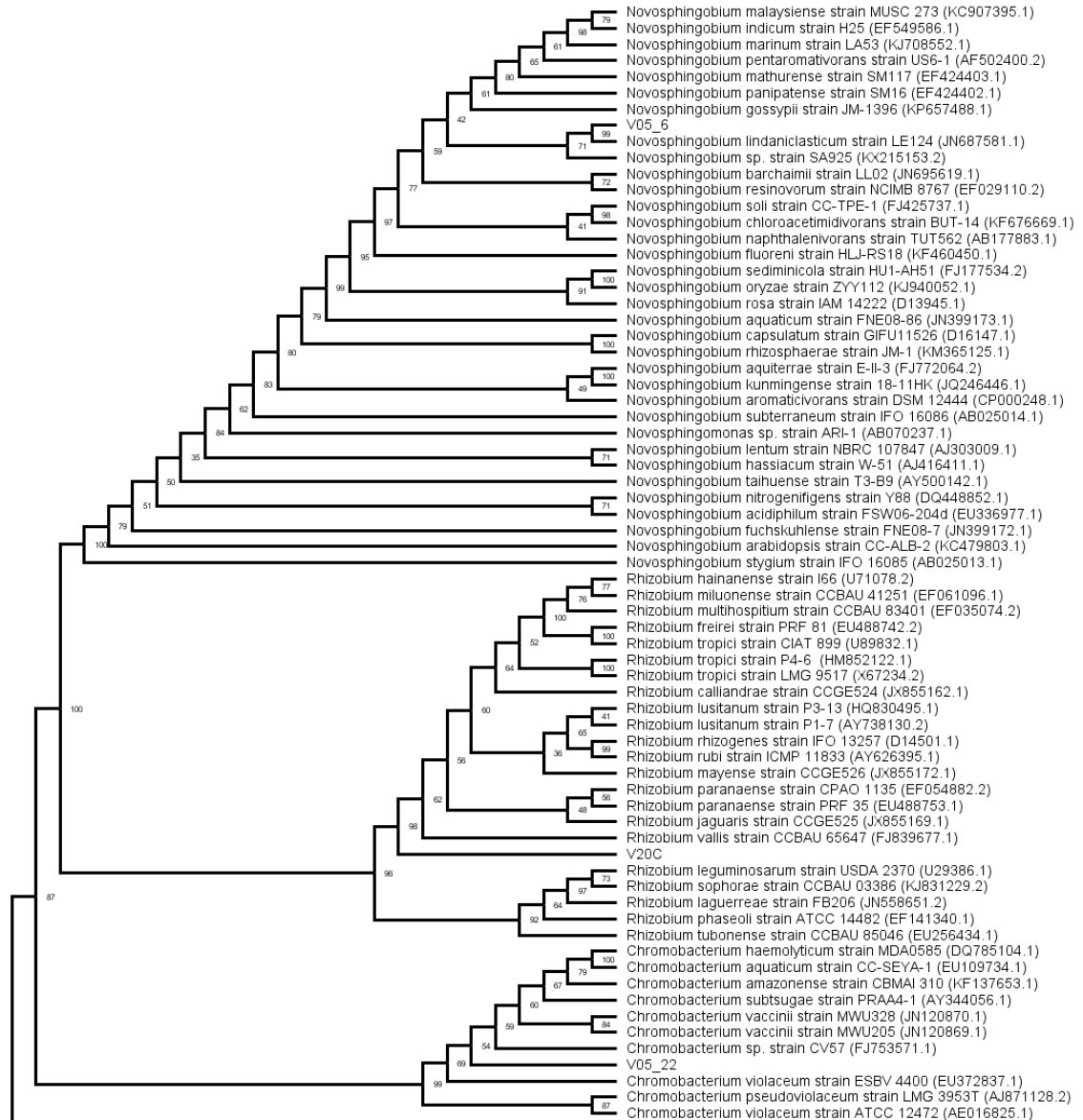
Isolado	Comprimento (pb)	Acesso	Família	Linhagem	Cobertura	Identidade	e-value
LGA-V05_22	1477	CP017707.1	Chromobacteriaceae	<i>Chromobacterium vaccinii</i> strain 21-1	100	99	0
LGA-V20F	810	KU248158.1	Burkholderiaceae	<i>Cupriavidus</i> sp. strain UYMRaPT14	100	99	0
LGA-V05_6	1240	KX215153.2	Sphingomonadaceae	<i>Novosphingobium</i> sp. strain SA925	100	99	0
LGA-V20C	1292	KY426389.1	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i> sp. strain Moz100	99	99	0
LGA-V05_13	777	MF405756.1	Bacillaceae	<i>Bacillus wiedmannii</i> strain cl65	100	99	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Filogenia dos isolados com base no sequenciamento total do gene 16S *rRNA*

De acordo com a filogenia obtida por meio do sequenciamento do gene 16S *rRNA*, todos os cinco isolados foram agrupados em filos e espécies diferentes. O isolado LGA-V05_22 foi caracterizado como *Chromobacterium vacinni* (linhagem tipo: MWU205 = ATCC BAA-2314 = DSM 25150), que teve seu primeiro isolamento por Soby *et al.* (2013), a partir de solo de pântano cultivado com amora silvestre em Truro, MA, EUA, no litoral nacional de Cape Cod (Figura 4). O isolado LGA-V20F teve semelhança com *Cupriavidus necator* (linhagem tipo: N-1 = ATCC 43291 = CCUG 52238 = CIP 103161 = DSM 13513 = LMG 8453), isolada por Makkar e Cassida (1987) a partir de um solo próximo a Universidade de Park, PA, EUA (Figura 5). O isolado LGAV05_13 teve similaridade com *Bacillus toyonensis* (linhagem tipo: BCT-7112 = CECT 876 = NCIMB 14858), originalmente *Bacillus cereus* (FRANKLAND; FRANKLAND, 1887) var *toyoi*, foi isolada em 1966 em um laboratório no Japão, durante uma seleção de culturas puras de microrganismos para uso como probióticos na nutrição animal (JIMÉNEZ *et al.*, 2013) (Figura 6). O isolado LGA-V20C foi semelhante para *Rhizobium vallis* (linhagem tipo: CCBAU 65647 = HAMB1 3073 = LMG 25295), isolada originalmente por Wang *et al.* (2011) no vale do rio vermelho, na província de Yunnan, China (Figura 4). O isolado LGA-V05_6 obteve similaridade para *Novosphingobium lindaniclasticum* (linhagem tipo: LE124 = CCM 7976 = DSM 25409), que teve seu isolamento por Saxena *et al.* (2013) em um lixão contaminado com Hexaclorociclohexano (HCH) localizado em Lucknow, Índia (Figura 4).

Figura 4 - Detalhe do dendrograma que agrupa os isolados LGA-V05_6, LGA-V20C e LGA-V05_22, recortado do dendrograma original (Anexo 2)



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Bioensaio de bactérias não esporulantes

Pequenas diferenças na subletalidade de *A. gemmatalis* foram observadas de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para todos os isolados não esporulantes usados no experimento em relação ao controle (H₂O), exceção para LGA-V05D (Tabela 2).

Tabela 2 – Bioensaio do teste de subletalidade de *Anticarsia gemmatalis* usando os isolados não esporulantes

Bactérias não esporulantes (R)	Peso das larvas (g.lar ⁻¹)
LGA-EV05	0,075 ± 0,011 b
LGA-EV08	0,076 ± 0,012 b
LGA-V05_13	0,075 ± 0,009 b
LGA-V05_6	0,075 ± 0,009 b
LGA-V20B	0,075 ± 0,009 b
LGA-V20C	0,076 ± 0,009 b
LGA-V20F	0,074 ± 0,011 b
LGA-V20G	0,072 ± 0,009 b
LGA-V05_22	0,075 ± 0,010 b
LGA-V05D	0,080 ± 0,012 a
Controle (H₂O)	0,079 ± 0,012 a
Anova	<i>p</i> =0,019975

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Médias seguidas por letras distintas diferem-se entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

5.6 Bioensaio de bactérias esporulantes

Em relação aos isolados esporulantes LGBBA-1355 e LGBBA-1304, ambos apresentaram subletalidade sutil para *A. gemmatalis*, principalmente com as maiores concentrações de esporos até a diluição de 3.10⁷. As diluições subsequentes não apresentaram resultados significativos em relação ao controle (H₂O). O tratamento com o produto comercial Dipel® foi eficaz e obteve-se mortalidade de 100% das larvas (Tabela 3). Na manutenção dos experimentos e tratamentos com foco nos isolados esporulantes, foi observado que o isolado LGBBA-1355 não foi eficaz na redução do peso das pupas. Por outro lado, LGBBA-1304 mostrou diminuição sutil no peso pupal nas diluições de 3.10⁶ e 3.10⁷ (Tabela 4).

Tabela 3 – Bioensaio do teste de subletalidade de *Anticarsia gemmatalis* usando os isolados esporulantes

Concentrações	Peso das Larvas (g)	
	LGBBA 1355	LGBBA 1304
3.10 ⁴	0,029 ± 0,013 b	0,014 ± 0,003c
3.10 ⁵	0,037 ± 0,010 b	0,020 ± 0,008c
3.10 ⁶	0,048 ± 0,024 a	0,025 ± 0,015 b
3.10 ⁷	0,041 ± 0,017 b	0,028 ± 0,019 b
3.10 ⁸	0,038 ± 0,017 b	0,019 ± 0,011 c
3.10 ⁹	0,052 ± 0,022 a	0,021 ± 0,019c
Controle (H₂O)	0,044 ± 0,020 a	0,044 ± 0,020 a
Controle (Dipel)	*	*
Anova	$p= 0,0002825$	$p= 4,3 \times 10^{11}$

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Médias seguidas por letras distintas diferem-se entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 4 – Peso das pupas de *Anticarsia gemmatalis* sob efeito de inóculo em diversas concentrações de duas linhagens de isolados de *Bacillus thuringiensis*

Concentrações	Peso das Pupas (g)	
	Isolate LGBBA-1355*	Isolate LGBBA-1304
3.10 ⁴	0,225 ± 0,038 a	0,226 ± 0,024 a
3.10 ⁵	0,208 ± 0,038 a	0,255 ± 0,030 a
3.10 ⁶	0,199 ± 0,030 a	0,236 ± 0,026 b
3.10 ⁷	0,239 ± 0,030 a	0,242 ± 0,037 b
3.10 ⁸	0,210 ± 0,028 a	0,248 ± 0,034 a
3.10 ⁹	0,240 ± 0,027 a	0,238 ± 0,030 b
Controle (H₂O)	0,252 ± 0,037 a	0,252 ± 0,037 a
Anova	$p= 0.34944$	$p=0.038379$

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Médias seguidas por letras distintas diferem-se entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

6 DISCUSSÃO

A utilização de sequências do gene *16S rRNA* para a caracterização molecular e estudo da filogenia bacteriana de microrganismos ocorre há vários anos e é considerada de longe a técnica mais aplicada para este interesse. O gene *16S rRNA* é o marcador mais utilizado por diversas razões, entre elas o fato de ser universal nos domínios Eubacteria e Archaea, além de oferecer regiões com domínios de sequência conservadas e hipervariáveis que evolutivamente distinguem esses microrganismos. O gene também possui 1500 pares de base aproximadamente, sendo considerado grande o suficiente para fins de análises de bioinformática. A utilização do sequenciamento do gene *16S rRNA* é potencialmente viável, pois por meio dessa técnica é fornecida a identificação em nível de gênero e até espécies para algumas linhagens bacterianas que não se adequam a nenhum perfil bioquímico reconhecido (JANDA; ABBOTT, 2007).

Os isolados do presente trabalho tiveram seu sequenciamento completo e filogenia feitos por meio do gene *16S rRNA*. Os dados obtidos através do sequenciamento foram comparados com os dados do GenBank, onde foi possível determinar os gêneros desses microrganismos com cobertura de 100% para todos os isolados, exceto o isolado LGA-V20C (99% de cobertura), e identidade de 99% para todos os isolados, a saber: LGA-V05_22 (*Chromobacterium vaccinii*), LGA-V20F (*Cupriavidus* sp.), LGA-V05_6 (*Novosphingobium* sp.), LGA-V20C (*Rhizobium* sp.) e LGA-V05_13 (*Bacillus wiedmannii*). Pode ser observado que, para alguns microrganismos, a caracterização não chegou a nível de espécie, pois o GenBank não conseguiu suportar a caracterização a tal nível. Portanto, os microrganismos foram relacionados de acordo com o seu sequenciamento comparado ao GenBank, quanto a nível de espécie e também a sua filogenia, devido à proximidade entre eles.

Anteriormente, Almeida (2017) havia feito a caracterização parcial de quatro desses cinco isolados, sendo eles: LGA-V05_22, LGA-V20F, LGA-V20C e LGA-V05_13, e os comparou com as sequências do GenBank, onde caracterizou em nível de gênero e espécie todas as bactérias, com exceção do isolado LGA-V20C, que foi caracterizado somente em nível de gênero. A caracterização parcial realizada por Almeida (2017) atribuiu os seguintes gêneros e espécies aos isolados: LGA-V05_22 (*Chromobacterium violaceum*), LGA-V20F (*Arthrobacter echigonensis*),

LGA-V20C (*Acinetobacter* sp) e LGA-V05_13 (*Bacillus cereus*). Entretanto, esse sequenciamento está incompleto, visto que o autor utilizou apenas o oligonucleotídeo iniciador universal (primer) FD1, e nesta pesquisa o sequenciamento completo foi feito por meio dos oligonucleotídeos iniciadores universais FD1 e RD1, além dos primers internos à região 16S *rRNA* (1,5 Kb), desenhados por L. M. Cruz e descritos por Menna *et. al* (2006), dando maior credibilidade à caracterização completa das bactérias.

O gênero *Chromobacterium* (LGA-V05_22) abrange bactérias gram-negativas que geralmente são isoladas de água doce e solo. Isolados tropicais e subtropicais deste gênero já estiveram relacionados com infecções consideradas rápidas e letais em seres humanos e em outros mamíferos (KE *et al.*, 2012; YANG; LI, 2011; TEOH *et al.*, 2006; de SIQUEIRA *et al.*, 2005; AJITHDOSS *et al.*, 2009; BALDI *et al.* 2010). Este gênero possui uma propriedade que é a composição de pigmentos roxos, tais como a violaceína e a deoxiviolaceína, embora existam também isolados que possam ser encontrados na natureza que não produzam esses pigmentos (HAN; HAN; SEGAL, 2008; YANG, 2011; RETTORI; DURAN, 1998). Estes pigmentos têm sido amplamente investigados devido à sua capacidade antibiológica, como a inibição de quitrídeos, fungos filamentosos, vírus, bactérias, protozoários e células tumorais humanas (BECKER *et al.*, 2009; BARRETO *et al.*, 2008; DURÁN; MENCK, 2001; MATZ *et al.*, 2004; DURÁN *et al.*, 2007; KODACH *et al.*, 2006).

Chromobacterium vacinni é uma bactéria aeróbia, gram-negativa e possui formato de bastonete, possuindo tamanho entre $03 \pm 0,555$ por $1,19 \pm 0,0198$ com um flagelo relativamente curto (SOBY *et. al.*, 2013). Ainda que não se tenham estudos sobre o papel dessa bactéria em seu ambiente natural, sabe-se que ela, assim como outras bactérias do gênero, produz a violaceína, além de possuir papel como agente de controle biológico contra a larva do mosquito *Aedes* e contra a traça das crucíferas (*Plutella xylostella*). Esta praga causa prejuízos em uma diversidade de culturas como cana-de-açúcar, algodão e arroz (VÖING; HARRISON; SOBY, 2015).

Chromobacterium violaceum é uma bactéria gram-negativa, isolada geralmente de solo e água doce, sua ocorrência em humanos já foi relatada diversas vezes, sendo a mesma um patógeno altamente oportunista que está relacionado à

sepsis grave e mortalidade. A infecção dessa bactéria em humanos ocorre por meio de exposição de feridas abertas em contato com águas de riachos, rios e lagos, e também em solos contaminados (THWE *et al.* 2020). Estudos com a violaceína, substância de cor violeta que estas bactérias produzem, mostraram efeitos eficazes contra diversas bactérias, especialmente as gram-positivas, combatendo até mesmo cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* (CHOI *et al.*, 2020). A violaceína é detectada em diversos ambientes, portanto, sua função deve se prolongar a muitos outros habitats, organismos e microrganismos (CHOI *et al.*, 2015).

As bactérias do gênero *Cupriavidus* (LGA-V20F) apresentam células em formato de bastonete gram-negativos, peritriquamente flagelados. Podem realizar atividades quimio-heterotróficas ou quimiolitotróficas. Seu metabolismo é oxidativo, vários carboidratos são utilizados como única fonte de carbono e nitrogênio. As espécies deste gênero podem ocorrer tanto em habitats naturais como solo, como também em humanos, quando estes se encontram debilitados (VANDAMME; COENYE, 2004). O poli (3-hidroxi-butirato) [P(3HB)] pertence ao grupo de poli-hidroxi-álcanoato (PHA). O PHA é um biopolímero sintetizado por muitas bactérias e arqueias, dentre elas a espécie *Cupriavidus necator*. A biodegradabilidade e a produção a partir de recursos renováveis são algumas das vantagens conferidas a este composto que possui inúmeras aplicações recentes como engenharia de tecidos e purificação de proteínas. O PHA é considerado um material em ascensão para a substituição do plástico petro- biodegradável (BIGLARI *et al.*, 2020).

Bacillus wiedmannii (LGA-V05_13) tem sua nomenclatura fazendo apologia a Martin Wiedmann (“widmannii”), moderno pesquisador da Cornell University que tem agregado conhecimento à biologia de *Bacillus*. O gênero *Bacillus* é bastante representativo, compreendendo 341 espécies citadas, tendo *B. subtilis* como espécie tipo (MILLER *et al.*, 2016).

A nomenclatura de *Bacillus toyonensis* reflete a “pequeno bastão” ou seja (“bacillus”), um epíteto que faz alusão à companhia japonesa Toyo Jozo (“toyonensis”). Uma linhagem vem sendo usada há mais de 30 anos como um componente ativo do produto TOYOCERIN[®], um suplemento alimentar destinado à nutrição de suínos, aves, bovinos, coelhos e aquicultura (WILLIAMS *et al.*, 2009).

Análises filogenéticas das sequências dos genes *16S rRNA* e *rpoB* (subunidade β da RNA polimerase) mostram que *B. toyonensis* e *B. wiedmannii*

estão intimamente relacionadas e formam um grupo monofilético dentro do grupo *B. cereus*. A espécie mais próxima destas linhagens foi *B. anthracis* (linhagem Ames) e a mais distante foi *B. cytotoxicus* (linhagem NVH 391-98^T) (MILLER *et al.*, 2016). Os dados obtidos para o isolado LGA-V05_13 corroboram esta característica e mostram o mesmo padrão, ainda que baseados apenas nos dados de sequência parcial de *16S rRNA*, indicando a confiabilidade destes dados. Contudo, o grupo contendo LGA-V05_13 mostrou-se mais intimamente relacionado com *B. thuringiensis* (linhagem KNU-07), ainda que uma análise filogenética mais discriminatória seja importante para o grupo *B. cereus*, conhecendo que espécies deste grupo não podem ser delineadas com base apenas em sequências *16S rRNA* (LIU *et al.*, 2015).

Deve-se ressaltar que o grupo *B. cereus*, ou *Bacillus cereus sensu lato (s.l.)*, inclui espécies patogênicas e não patogênicas, de ampla diversidade ambiental, que estejam intimamente relacionadas, sendo bactérias gram positivas, anaeróbios facultativos e formadores de esporos (PRIEST *et al.*, 2004). A patogenicidade e capacidade de causar doenças e toxicidade alimentar vinha sendo a principal fonte de interesse para o grupo. Contudo, a diversidade ecológica do grupo tem agregado interesse potencial nos estilos de vida saprofítico no solo e simbiótico (comensal e mutualístico), junto às raízes de plantas e intestinos de insetos e mamíferos. A diversidade de nichos ecológicos consiste no papel variado e competitivo das toxinas produzidas pelo grupo, afetando a dinâmica das comunidades microbianas envolvidas (CEUPPENS; BOON; UYTENDAELE, 2013).

As bactérias do gênero *Rhizobium* (LGA-V20C) são fixadoras de nitrogênio, podem reduzir o N₂ em amônia após formação de nódulos nas raízes e/ou caule das plantas leguminosas (WANG *et al.*, 2011). A espécie *Rhizobium vallis* possui suas células em formato de bastonetes móveis, gram-negativos e sem formação de esporos, medindo 1,0–1,5 µm × 2,0–3,5 µm (WANG *et al.*, 2011). Até o momento já foram caracterizadas mais de 280 espécies de bactérias pertencentes a esse gênero (LPSN).

As raízes das plantas cultivadas no solo não apenas possuem a função de absorção de nutrientes como também fornecem locais para a associação de diversos microrganismos que habitam o solo na rizosfera. A microbiota dos vegetais inclui fungos, protozoários e bactérias que podem influenciar negativamente na

produção. Relações benéficas também podem acontecer, como a simbiose de diversas espécies de microrganismos na raiz de plantas leguminosas (XU *et al.*, 2020).

O gênero *Novosphingobium* (LGA-V05_6) foi primeiramente descrito por Yabuuchi *et al.* (1990), posteriormente foi revisado por Takeuchi, Hamana e Hiraishi (2001) baseado em análises filogenéticas e quimiotaxonômicas. Até o momento este gênero possui mais de 50 espécies descritas e publicadas validamente. Alguns microrganismos deste grupo possuem a capacidade de degradação de *Hexaclorocicloexano*. O *Hexaclorocicloexano* (HCH) é um hidrocarboneto clorado saturado cíclico que tem sido amplamente estudado e utilizado no controle de pragas agrícolas desde a década de 50 (Saxena *et al.*, 2013). Bactérias desse gênero já foram associadas com doenças, como *Novosphingobium aromaticivorans*, microrganismo que pode iniciar a cirrose biliar primária (KAPLAN, 2004). A espécie bacteriana *Novosphingobium lindaniclasticum* é uma bactéria gram-negativa, aeróbica, não flagelada, móvel e sem esporos, em forma de bastonete (1,3 µm de comprimento e 0,7 µm de diâmetro) (SAXENA *et al.*, 2013).

Em relação à subletalidade das larvas de *A. gemmatilis* inoculadas com isolados não esporulantes, observou-se que todas as cepas bacterianas testadas apresentaram pequeno efeito, mas significativo na redução do peso das larvas em comparação ao controle, porém o isolado LGA-V05D correspondente a *Arthrobacter echigonensis* (MIRANDA, 2020) não mostrou nenhum efeito. Como esperado para ambas as cepas bacterianas esporuladas, a taxa de subletalidade foi mais proeminente do que aquelas observadas para isolados não esporulados, enquanto LGBBA-1304 foi ainda mais eficaz na redução do peso das larvas. Observou-se que para ambos os isolados os tratamentos com maior concentração (menor diluição) apresentaram maior índice de subletalidade quando comparados aos tratamentos com menores concentrações e controle. Na verdade, os dados das concentrações mais baixas ($<3.10^7$ diluição) testadas não foram coerentes devido à baixa quantidade de esporos presentes no bioensaio. A mortalidade absoluta de larvas foi observada apenas para o tratamento Dipel®, visto que este produto comercial é indicado para o controle de pragas da soja.

O desenvolvimento fisiológico de larvas de *A. gemmatalis* até o estágio de pupa não foi prevenido por cepas esporuladas. No entanto, o LGBBA-1304 foi capaz de reduzir o peso das pupas da mesma forma com base nas diluições de $3,10^6$ e $3,10^7$, o que corrobora esta cepa como a mais eficaz contra *A. gemmatalis* em todos os nossos tratamentos. Não excluimos que esse fato deva estar relacionado às condições fisiológicas das larvas aplicadas nos testes e não ao potencial de cepas bacterianas. Embora Barbosa (2017) testando cepas de *B. thuringiensis* contra *Helicoverpa armigera* não tenha obtido resultados significativos, as mesmas cepas apresentaram níveis de mortalidade significativos e satisfatórios para *Spodoptera eridania*.

Mesmo que as cepas de *B. thuringiensis* testadas contra *A. gemmatalis* não tenham um efeito proeminente na subletalidade e no desenvolvimento das larvas, elas podem ter efeitos de toxicidade em outras pragas agrícolas. É extremamente importante continuar a pesquisa sobre bactérias não esporulantes e seu potencial para o controle biológico não apenas de pragas de destaque, mas também para aquelas capazes de controlar outros patógenos bacterianos, fúngicos e virais. Nesse sentido, as bactérias do gênero *Chromobacterium* listadas acima se destacam pelo potencial de controle biológico de traças de pragas e vetores de doenças, além de seu potencial antitumoral em células humanas. Assim, a taxonomia acurada e promissora dos isolados não esporulantes revelou perspectivas quanto às suas propriedades biotecnológicas que poderiam ser prospectadas no futuro.

7 CONCLUSÃO

A manutenção e criação de *Anticarsia gemmatalis*, bem como a prospecção, seleção e caracterização de isolados bacterianos do solo quanto ao potencial entomopatogênico contra *A. gemmatalis* foi realizada, evidenciando os isolados com a maior capacidade de subletalidade. Embora os isolados esporulantes e não esporulantes tenham mostrado baixo efeito de subletalidade nas larvas de *A. gemmatalis*, a caracterização total desses microrganismos mostrou seus diversos potenciais biotecnológicos que podem ser prospectados futuramente nas diversas áreas da biotecnologia.

REFERÊNCIAS

- AJITHDOSS, D. K. *et al.* Septicemia in a neonatal calf associated with *Chromobacterium violaceum*. **Veterinary Pathology**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 71-74, Jan. 2009. Available at: <https://doi.org/10.1354%2Fvp.46-1-71>. Access in: 09 June 2020.
- ALMEIDA, W. E. S. **Caracterização parcial do gene 16S rRNA de isolados do solo e seus potenciais na solubilização de fosfato e influência crescimento de soja (*Glicine max*) e milho (*Zea mais*)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabau, 2017. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/148901>. Acesso em: 10 de nov. 2019.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct 1990. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2). Access in: 03 Jan. 2020.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, Sept. 1997. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>. Access in: 20 Dec. 2019.
- ALVES, S. B.; MORAES, S. B. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. *In*: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 765-778.
- BALDI, M. *et al.* *Chromobacterium violaceum* infection in a free-ranging howler monkey in Costa Rica. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, v. 46, n. 1, p. 306-310, Jan. 2010. Available at: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.1.306>. Access in: 15 Nov. 2019.
- BARBOSA, T. A. N. **Seleção e caracterização molecular de cepas de *Bacillus thuringiensis* visando o controle de *Helicoverpa armigera***. 2017. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/15230>. Acesso em: 20 jan. 2020.
- BARRETO, E. S. *et al.* Diversity in antifungal activity of strains of *Chromobacterium violaceum* from the Brazilian Amazon. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [S. l.], v. 35, n. 7, p. 783-790, July 2008. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0331-z>. Access in: 18 Nov. 2019.
- BECKER, M. H. *et al.* The bacterially produced metabolite violacein is associated with survival of amphibians infected with a lethal fungus. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 75, n. 21, p. 6635-6638, Aug. 2009. Available at: <https://doi.org/10.1128/aem.01294-09>. Access in: 29 Nov. 2019.

BERNARDI, O. *et al.* Resistência de Insetos-Praga a Plantas Geneticamente Modificadas. **Resistência de Insetos-Praga às Plantas Geneticamente Modificadas**, n. Oct. 2015, p. 181–208, Jan. 2011.

BIGLARI, N. *et al.* A study on the effects of increment and decrement repeated fed-batch feeding of glucose on the production of poly (3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by a newly engineered *Cupriavidus necator* NSDG-GG mutant in batch fill-and-draw fermentation. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 307, p. 77-86, Jan. 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.10.013>. Access in: 04 Feb. 2020.

CEUPPENS, S.; BOON, N.; UYTENDAELE, M. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 84, n. 3, p. 433-450, June 2013. Available at: <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12110>. Access in: 10 Oct 2019.

CHOI, S. Y. *et al.* *Chromobacterium violaceum* delivers violacein, a hydrophobic antibiotic, to other microbes in membrane vesicles. **Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 705-713, Feb. 2020. Available at: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14888>. Access in: 10 Mar. 2020.

CHOI, S. Y. *et al.* Violacein: Properties and Production of a Versatile Bacterial Pigment. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2015, p. 1-8, Aug. 2015. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/465056>. Access in: 14 Mar. 2020.

DONG, Y. S. *et al.* (2004) The genetic diversity of cultivated soybean grown in China. **Theoretical and Applied Genetics**, [S. l.], v. 108, n. 5, p. 931-936, Mar. 2004. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1503-x>. Access in: 02 Nov. 2019.

DONG, H. *et al.* Transcriptomic analysis of genes in soybean in response to *Peronospora manshurica* infection. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 1-45, May 2018. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4741-7>. Access in: 24 June 2020.

DURÁN, N.; MENCK, C. F. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 201-222, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1080/20014091096747>. Access in: 16 Jan. 2020.

DURÁN, N. *et al.* Violacein: properties and biological activities. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 127-165, Nov. 2007. Available at: <https://doi.org/10.1042/BA20070115>. Access in: 18 Feb. 2020.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de produção de soja**: Região Central do Brasil 2007. Londrina: Embrapa Soja, 2006.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Soja em números (safra 2019/20)**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 30 nov. 2020.

FIAZ, M. *et al.* Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 156, p. 1-8, July 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.080>. Access in: 14 Dec. 2019.

FIGUEIREDO, B.; TOLEDO, B.; MARCONDES, J. Caracterização de rizóbios indicados para produção de inoculantes por meio de sequenciamento parcial do *16S rRNA*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 4, p. 384–391, abr. 2009. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2009000400008. Acesso em: 03 fev. 2020.

FIGUEIREDO, C. S. **Isolamento, caracterização molecular e expressão de um novo gene *vip3Aa50* de *Bacillus thuringiensis* virulento para *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda***. 2013. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Jaboticabau, 2013. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/92638>. Acesso em: 03 fev. 2020.

FRANKLAND, G. C.; FRANKLAND, P. F. Studies on some new microorganisms obtained from air. **Philosophical Transactions of the Royal Society B.**, London, v. 178, p. 257-287, Dec. 1887.

FREITAS, M. C. M. A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. *In*: ENCICLOPÉDIA Biosfera. Goiás: Centro Científico Conhecer, 2011. v. 7, p. 1–12.

FRIZZAS, M. R.; OLIVEIRA, C. M. Plantas transgênicas resistentes a insetos e organismos não-alvo: predadores, parasitóides e polinizadores. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v. 4, n. 1, p. 63–82, 2008.

GALLARDO, M. J. *et al.* Characterization of *Chromobacterium violaceum* pigment through a hyperspectral imaging system. **AMB Express**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 1-9, Jan. 2014. Available at: <https://doi.org/10.1186/2191-0855-4-4>. Access in: 26 Jan. 2020.

GALLO, D. *et al.* **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001252172>. Acesso em: 15 abr. 2020.

GLARE, T. *et al.* Have biopesticides come of age? **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 30, n. 5, p. 250–258, 2012.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998. Available at: <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.195>. Access in: 03 Dec. 2019.

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C., DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v. 69, n. 4, p. 487-488, Aug. 1976. Available at: <https://doi.org/10.1093/jee/69.4.487>. Access in: 18 Nov. 2019.

HAN, X. Y.; HAN, F. S.; SEGAL, J. *Chromobacterium haemolyticum* sp. nov., a strongly haemolytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 58, n. 6, p. 1398-1403, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64681-0>. Access in: 25 Nov. 2019.

HOFFMANN-CAMPO, C. B. *et al.* **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: EMBRAPA Soja, 2000. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/circtec30_000g46xpyyv02wx5ok0iuqaqkbbpq943.pdf. Acesso em: 27 jan. 2020.

HOFFMANN-CAMPO, C. B. *et al.* Integrated pest management in Brazil. *In*: MAREDIA, K. M.; DAKOUO, D.; MOTA-SANCHEZ, D. (org.). **Integrated Pest Management in the Global Arena**. Wallingford: CABI Publishing, 2003. chapter 22, p. 285-299.

INUI, R. N. *et al.* Phosphorus solubilizing and iaa production activities in plant growth promoting rhizobacteria from brazilian soils under sugarcane cultivation. **ARNP: Journal of Engineering and Applied Sciences**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. 1446-1454, Nov. 2012.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, Bethesda, v. 45, n. 9, p. 2761-2764, Sept. 2007. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-0>. Access in: 10 Jan. 2020.

JIMÉNEZ, G. *et al.* Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. **Systematic and Applied Microbiology**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 383-391, Sept. 2013. Available at: <https://10.1016/j.syapm.2013.04.008>. Access in: 23 Apr. 2020.

KAPLAN, M. M. *Novosphingobium aromaticivorans*: a potential initiator of primary biliary cirrhosis. **American Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 99, n. 11, p. 2147-2149, Nov. 2004.

KE, L. *et al.* Paediatric *Chromobacterium violaceum* in Cambodia: the first documented case. **Tropical Doctor**, [S. l.], v. 42, n. 3, p. 178-179, July 2012. Available at: <https://doi.org/10.1258/td.2012.120054>. Access in: 21 Nov. 2019.

KATOH, K. *et al.* MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 14, p. 3059-3066, July 2002. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>. Access in: 15 Nov. 2019.

KODACH, L. L. *et al.* Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 508-516, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi307>. Access in: 01 Sept. 2020.

LETOWSKI, J. *et al.* Assessment of cry1 Gene Contents of *Bacillus thuringiensis*

Strains by Use of DNA Microarrays. **Applied And Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 71, n. 9, p. 5391–5398, Sept. 2005.

LIU, Y. *et al.* Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 5, p. 1–11, Sept. 2015. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep14082>. Access in: 04 Feb. 2020.

MACEDO, C. L. *et al.* Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficientes contra a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 12, p. 1759–1765, dez. 2012.

MACHADO, V.; FIUZA, L. M. Manejo da resistência: Na era das plantas transgênicas. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 291–302, jun. 2011.

MAKKAR, N. S.; CASIDA JR, L. E. *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [S. l.], v. 37, p. 323–326, Oct. 1987. Available at: <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-323>. Access in: 13 Jan. 2020.

MARMUR, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 208-218, Apr. 1961.

MATZ, C. *et al.* Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 70, n. 3, p. 1593-1599, Mar. 2004. Available at: <https://doi.org/10.1128/aem.70.3.1593-1599.2004>. Access in: 13 Jan. 2020.

MENNA, P. *et al.* Molecular phylogeny based on the 16S *rRNA* gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic Applied Microbiology**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 315-332, June 2006. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.12.002>. Access in: 13 July 2020.

MILLER, R. A. *et al.* *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 66, n. 11, p. 4744-4753, Nov. 2016. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001421>. Access in: 14 May 2020.

MIRANDA, M. D. Taxonomia de bactérias não esporulantes testadas no controle biológico contra *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith). Comunicação direta. 2020.

MIRANDA, M. A. C. *et al.* Descrição, produtividade e estabilidade da cultivar de soja IAC-24, resistente a insetos. **Bragantia**, Campinas, v. 62, p. 29-37, 2003.

MNIF, I.; GHRIBI, D. Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. **Crop Protection**, [S. l.], v. 77, p. 52–64, Nov. 2015.

MOSCARDI, F. *et al.* Baculovirus pesticides: present state and future perspectives. *In*: AHMAD, L.; AHMAD, F.; PICHTEL, J. (Eds.). **Microbes and microbial technology agricultural and environmental applications**. New York: Springer,

2011, p. 415-445. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7931-5_16. Access in: 05 Feb. 2020.

MOSCARDI, B. S. *et al.* Artrópodes que atacam as folhas da soja. In.: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. (Eds.) **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília: EMBRAPA, 2012, p. 213-334.

NEEFS, J. *et al.* Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 18, p. 2237- 2317, Apr. 1990.

NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A. L.; FARIAS, J. R. B. Estágios de desenvolvimento da cultura de soja. In: BONATO, E. R. (Ed.) **Estresses em soja**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 2000, p. 19-44.

OMORI, W. P. *et al.* Influence of Vinasse Application in the Structure and Composition of the Bacterial Community of the Soil under Sugarcane Cultivation. **International Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 2016, p. 1-11, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1155/2016/2349514>. Access in: 03 Feb. 2020.

PRIEST, F. G. *et al.* Population Structure and Evolution of the Bacillus cereus Group. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 186, n. 23, p. 7959-7970, Dec. 2004.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 166, n. 2, p. 99–110, Feb. 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.02.003>. Access in: 22 Jan. 2020.

RAYMOND, B. *et al.* Bacillus thuringiensis: An impotent pathogen? **Trends in Microbiology**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 189–194, May 2010.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: The R Foundation for Statistical Computing, 2011. Available at: <http://www.R-project.org/>. Access in: 22 Jan. 2020.

RETTORI, D.; DURAN, N. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by Chromobacterium violaceum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 14, p. 685-688, Oct. 1998.

SALVADOR, M. C. **Efeito de genótipos de soja e de flavonóides na biologia e no intestino médio de *Anticarsia gemmatilis***. 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2008.

SAXENA, A. *et al.* *Novosphingobium lindaniclasticum* sp. nov., a hexachlorocyclohexane (HCH) degrading bacterium isolated from an HCH dumpsite. **International Journal of Sistemacy and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 63, n. 6, p. 2160-2167, June 2013. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijms.0.045443-0>. Access in: 04 Apr. 2020.

SCHLIEP, K. P. Phangorn: phylogenetic analysis in R. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 592-593, Feb. 2011. Available at: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>. Access in: 01 Aug. 2020.

SEBASTIÃO, I. **Toxicidade e interação de proteínas Cry1 de bacillus thuringiensis em Helicoverpa armigera (Hübner) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2015.

SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecenaz, 2009.

SIMONATO, J.; GRIGOLLI, J. F. J.; OLIVEIRA, H. N. Controle Biológico de Insetos-Praga na Soja. Tecnologia e Produção: Soja 2013/2014, p. 178–193, 2014. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/102097/1/cap.-8.pdf>

SIQUEIRA, I. C. *et al.* Chromobacterium violaceum in siblings, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 11, n. 9, p. 1443-1445, Sept. 2005. Available at: <https://dx.doi.org/10.3201%2Fid1109.050278>. Access in: 03 Feb. 2020.

SOBY, S. D., *et al.* Chromobacterium vaccinii sp. nov., isolated from native and cultivated cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) bogs and irrigation ponds. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 63, n. 5, p. 1840-1846, May 2013. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.045161-0>. Access in: 03 Feb. 2020.

SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* Pragas da soja e seu controle. In: ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. M., (Eds.). **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p. 299-331.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; MIRANDA, J. E. Fitness cost of resistance to Bacillus thuringiensis in velvetbean caterpillar Anticarsia gemmatilis Hübner (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 56, n. 3, p. 359-362, July/Sept. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0085-56262012005000050>. Acesso em: 03 fev. 2020.

SOUZA, L. C. F. *et al.* Desempenho agrônomico da soja em sucessão de culturas com espécies de oleaginosas. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 4, n. 1, p. 112-126, 2015.

TAKEUCHI, M.; HAMANA, K.; HIRAISHI, A. Proposal of the genus Sphingomonas sensu stricto and three new genera, Sphingobium, Novosphingobium, and Sphingopyxis, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 51, n. 2, p. 1405-1417, July 2001. Available at: <https://doi.org/10.1099/00207713-51-4-1405>. Access in: 14 Apr. 2020.

TEOH, A. Y. B. *et al.* Fatal septicaemia from Chromobacterium violaceum: case reports and review of the literature. **Hong Kong Medical Journal**, Hong Kong, v. 12,

n. 3, p. 228-231, July 2006. Available at: <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.005084>.
Access in: 14 Apr. 2020.

THWE, P. M. *et al.* Closing the Brief Case: Recurrent *Chromobacterium violaceum* Bloodstream Infection in a Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD)-Deficient Patient with a Severe Neutrophil Defect. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 58, n. 2, p. 1-2, Feb. 2020. Available at: <https://doi.org/10.1128/jcm.00314-19>.
Access in: 14 Apr. 2020.

TRIFINOPOULOS, J. *et al.* W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 232-235, July 2016. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>. Access in: 10 Aug. 2020.

VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 54, n. 6, p. 2285-2289, Nov. 2004. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63247-0>. Access in: 10 Aug. 2020.

VENCATO, A. Z., *et al.* **Anuário Brasileiro da Soja 2010**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2010.

VÖING, K.; HARRISON, A.; SOBY, S. D. Draft Genome Sequence of *Chromobacterium vaccinii*, a Potential Biocontrol Agent against Mosquito (*Aedes aegypti*) Larvae. **Genome Announcements**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 14-15, May/June 2015.

WANG, Y.; QIAN, P. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **Public Library of Science**, [S. l.], v. 4, n. 10, Oct. 2009.

WANG, F. *et al.* *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 61, n. 11, p. 2582-2588, Nov. 2011. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.026484-0>. Access in: 18 Aug. 2020.

WEISBURG, W. G. *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 173, n. 2, p. 697-703, Jan. 1991. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>. Access in: 18 Aug. 2020.

WILLIAMS, L. D. *et al.* Literature review on the safety of Toyocerin Ò, a non-toxicogenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var *toyoi* preparation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 55, n. 2, p. 236-246, Nov. 2009. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2009.07.009> Access in: 24 Oct. 2019.

YABUUCHI, E. (1990). Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. **Microbiology and Immunology**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 99-119,

Feb. 1990. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1990.tb00996.x>. Access in: 24 Feb. 2020.

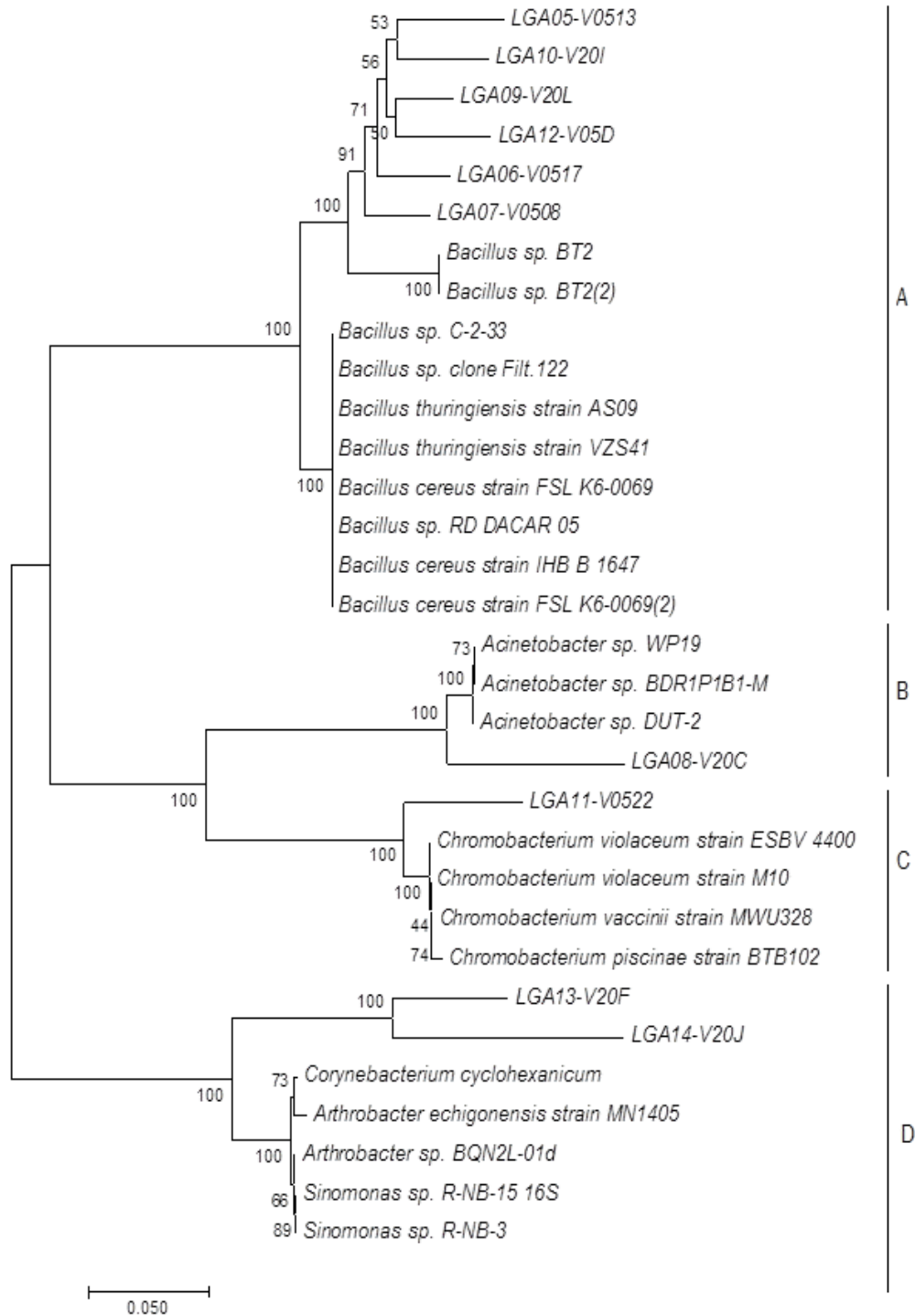
YANG, C. H.; Li, Y. H. Chromobacterium violaceum infection: a clinical review of an important but neglected infection. **Journal of the Chinese Medical Association**, [S. l.], v. 74, n. 10, p. 435-441. Oct. 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2011.08.013>. Access in: 16 Dez. 2019.

YANG, C. H. Nonpigmented Chromobacterium violaceum bacteremic cellulitis after fishbite. **Journal of Microbiology Immunology and Infection**, [S. l.], v. 44, n. 5, p. 401-405, Oct. 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2010.04.004>. Access in: 28 Nov. 2019.

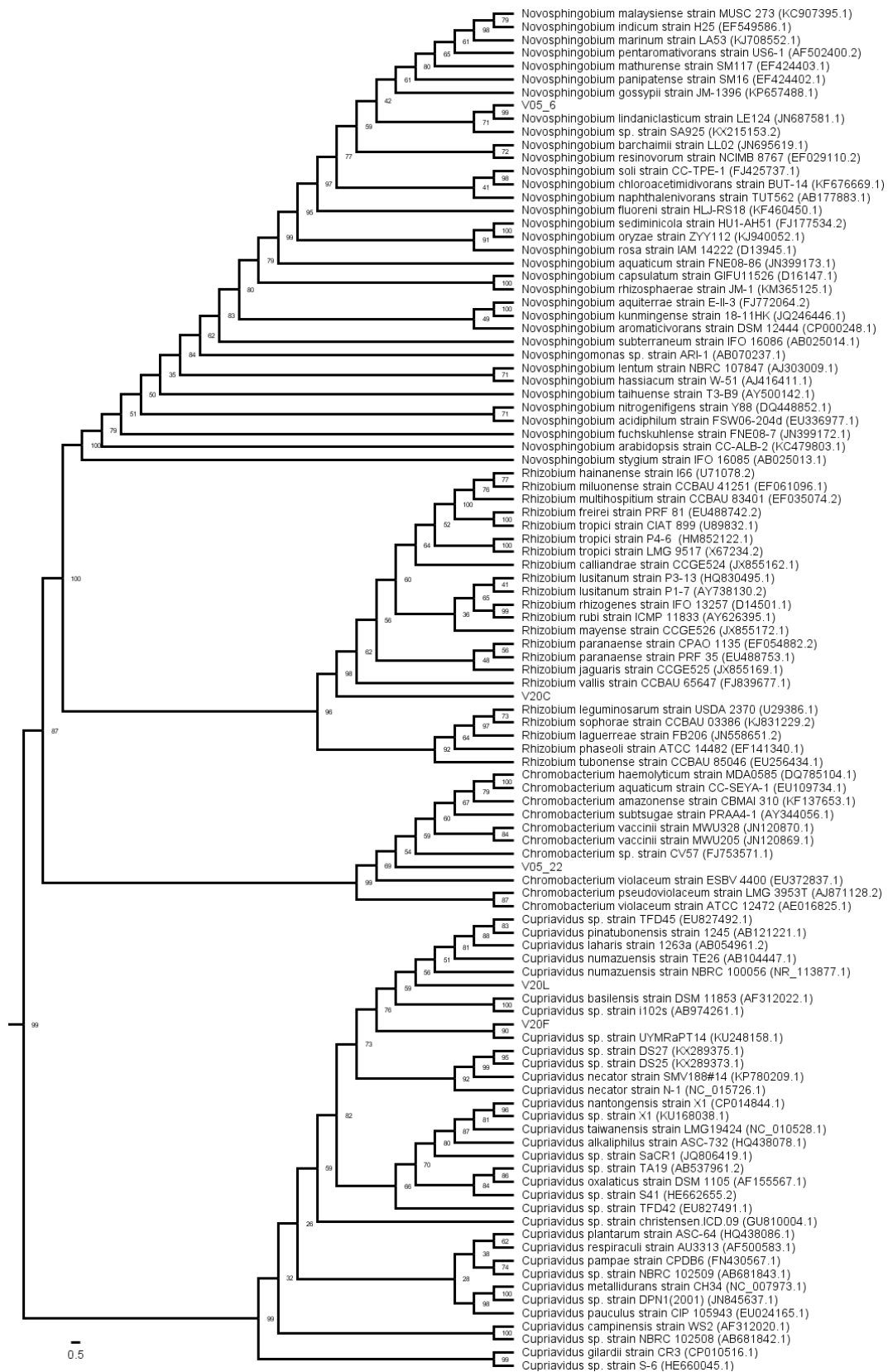
XU, H. *et al.* Rhizobium Inoculation Drives the Shifting of Rhizosphere Fungal Community in a Host Genotype Dependent Manner. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 10, p. 1-14, Jan. 2020. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03135>. Access in: 05 Feb. 2020.

ANEXOS

ANEXO 1 - Dendrograma evidenciando os isolados do solo parcialmente caracterizados por Almeida (2017) utilizando o método Neighbor-Joining com 1000 bootstrap. Onde os ramos correspondem a respectivamente aos gêneros: A) *Bacillus*; B) *Acinetobacter*; C) *Chromobacterium* e D) *Corynebacterium*, *Arthrobacter* e *Sinomonas*



ANEXO 2 - Dendrograma original que corresponde aos isolados caracterizados pelo marcador 16S rRNA usando o método Neighbor-Joining e 1000 bootstrap



ANEXO 3 - Dendrograma original que corresponde aos isolados caracterizados pelo marcador 16S rRNA usando o método Neighbor-Joining e 1000 bootstrap

