

**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*

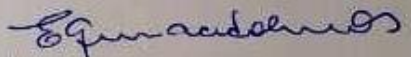
AUTOR: RENATO FARINACIO

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:

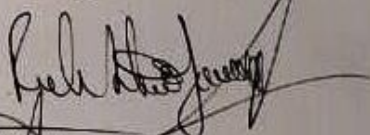
Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



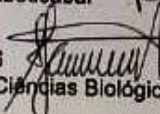
Pesquisador Dr. EDUARDO FERMINO CARLOS
Instituto Agrônomo do Paraná-IAPAR / Londrina/PR

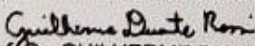


Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



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.

1.2. Revisão de literatura

1.2.1. Transformação genética de cana-de-açúcar para resistência a pragas

1.2.1.1. Cana-de-açúcar e *Diatraea saccharalis*

O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp L.) (FAO, 2019). Estima-se para a safra 2019/20 a produção de 615 milhões de toneladas (CONAB, 2019). Quanto a importância energética desta cultura, em 2018, o uso de sua biomassa representou 17,4% da matriz energética brasileira, o que corresponde a 38,4% da matriz energética renovável (EPE, 2019). Dentre os fatores que levam à perda de rendimento na cultura da cana-de-açúcar por todo o mundo, o ataque de insetos pragas é um dos principais (Islam et al., 2016). No Brasil, *Diatraea saccharalis* Fabr. (Lepidoptera: Crambidae) é uma das mais importantes pragas da cultura, seus danos se estendem pelas várias regiões de cultivo (Dinardo-Miranda, 2008).

Como agravante, a implantação da colheita da cana crua possivelmente contribui para o aumento da intensidade de infestação de *D. saccharalis*. Dados analisados de uma unidade na região de Ribeirão Preto-SP apontaram que a área de cana-de-açúcar colhida crua passou de 35% em 2006 para 95% em 2011, e a intensidade de infestação elevou de 3,5% para 8,7%, respectivamente (Dinardo-Miranda e Fracasso, 2013).

Além dos danos diretamente relacionados a formação de galerias, como a perda de peso, tombamento pelo vento e morte de gemas, o ataque de *D. saccharalis* pode gerar também danos indiretos, dentre eles está a entrada de microrganismos oportunistas causadores da podridão vermelha, que caracteriza o complexo broca-podridão (Gallo et al., 2002; Rossetto e Santiago, 2019). Estima-se que os prejuízos decorrentes do ataque de *D. saccharalis* estejam na ordem de US\$ 500 milhões por ano no Brasil (Arruda et al., 2014).

Estratégias baseadas no aumento da resistência a pragas por meio do melhoramento convencional em cana-de-açúcar são dificultadas pela complexidade de seu genoma (Arruda, 2012) e pela ausência de germoplasma resistente a pragas

nas coleções em todo o mundo (Islam et al., 2016). Neste sentido, a utilização da engenharia genética tem se destacado por apresentar enorme potencial para a introdução de características desejáveis, diretamente em variedades cultivadas comercialmente (Arruda, 2012).

1.2.1.2. Transgenia em cana-de-açúcar para resistência a pragas

Uma das primeiras obtenções de cana-de-açúcar transgênicas para resistência a pragas foi a inserção do gene *cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis* (Arencibia et al., 1997). Posteriormente, diversos outros trabalhos relataram sucesso no desenvolvimento de plantas que expressam proteínas provenientes de *B. thuringiensis*, como Cry1Ac (Weng et al., 2006; Ismail, 2013), Cry1Aa3 (Kalunke et al., 2009), Cry2A (Gao et al., 2018). No entanto, a variedade de cana-de-açúcar CTC 20 Bt, obtida pelo Centro de Tecnologia Canavieira, no Brasil em 2017, foi a que teve a primeira aprovação mundial para uso comercial, esta contém o gene *cry1Ab* (CIB, 2017; UNICA, 2017).

Os genes *cry*, com algumas exceções, caracterizam-se por sua expressão durante a fase celular estacionária e formação de cristais proteicos na célula. O mecanismo de ação clássico destas proteínas envolve a solubilização dos cristais, processamento proteolítico da protoxina por proteases intestinais, ligação da toxina Cry nos receptores intestinais e inserção na membrana apical, o que resulta na formação poros e consequente lise celular e morte do inseto (Schnepf et al., 1998). Adicionalmente, outros modelos de mecanismos de ação com algumas similaridades foram propostos (Vachon et al., 2012; Melo et al., 2016)

Outra classe de proteínas inseticidas produzidas por *B. thuringiensis*, as proteínas Vip, se caracterizam por serem produzidas durante a fase vegetativa da célula, serem secretadas e não formarem cristais proteicos (Schnepf et al., 1998). Dentro desta classe, destaca-se a proteína Vip3Aa por sua eficiência no controle de diversas pragas agrícolas e pelo fato de se ligar em receptores de membrana do intestino diferentes dos que se unem as proteínas Cry, o que dificulta a ocorrência de resistência cruzada (resistência simultânea a duas proteínas inseticidas

diferentes) e auxilia no manejo da resistência dos insetos às toxinas de *B. thuringiensis* (Sena et al., 2009; Lemes et al., 2017).

Quanto ao uso da proteína Vip3Aa no controle de *D. saccharalis*, obteve-se resultados positivos em ensaios de adição da proteína sobre dieta artificial, que apresentou concentrações 0,13 e 27,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para causar a mortalidade de 50% e 90% da população, respectivamente (Lemes et al., 2014). No entanto, apesar destes promissores resultados, não foram encontrados até o momento relatos da transformação genética de cana-de-açúcar com o gene *vip3Aa*. Enquanto para outras culturas como o milho e o algodão, eventos com o gene são plantados comercialmente (CTNBio, 2019).

1.2.1.3. Tolerância a glufosinato de amônio por transgenia

Além do ataque de pragas, outro fator limitante para a produtividade é a competição das lavouras com plantas daninhas, pois estas são usuários eficientes de recursos, competindo por água, luz solar e nutrientes, além de fornecer abrigo e alimento a pragas e patógenos de plantas (Naqvi et al., 2017). No controle destas, o herbicida glufosinato de amônio vem sendo amplamente utilizado. Esta é uma versão sintética do herbicida bialaphos, produzido por *Streptomyces viridochromogenes*, não seletivo, atua em monocotiledôneas e dicotiledôneas (Duke e Lydon, 1987).

O mecanismo de ação do glufosinato de amônio ocorre pela formação de um complexo irreversível com a glutamina sintetase (responsável pela assimilação e reciclagem da amônia para síntese de glutamina em plantas), o que causa a perda da atividade da enzima (Dayan et al., 2015). Como consequência de seu uso, ocorre o rápido acúmulo de amônia a níveis tóxicos nas plantas (Duke e Lydon, 1987).

Neste sentido, além das plantas geneticamente modificadas para resistência a pragas, outro destaque tem sido a inserção de genes de resistência a herbicida, que pode ser uma poderosa ferramenta em programas de controle de plantas daninhas (Gonzalez et al., 2018).

Com a descoberta dos genes *pat* e *bar* que codificam para a enzima fosfinotricina acetiltransferase, ampliou-se o uso do herbicida glufosinato de amônio no controle de plantas daninhas em pós-emergência da cultura e na seleção de eventos transgênicos que a expressem (Áy et al., 2012). Isso foi possível devido a capacidade da enzima fosfinotricina acetiltransferase inativar o herbicida pela acetilação da L-fosfinotricina, isômero ativo do herbicida glufosinato de amônio (Hérouet et al., 2005). Como resultado destas descobertas, há relatos de diversas espécies transformadas com estes genes, desde plantas modelo como *Arabidopsis* sp. (Abdeen e Miki, 2009) até culturas como trigo (Áy et al., 2012), cana-de-açúcar (Mayavan et al., 2015), soja (Abdeen e Miki, 2009) entre outras, e a liberação comercial no Brasil de três culturas, a soja, o milho e o algodão (CTNBio, 2019).

1.2.2. *Pseudomonas* e *Burkholderia* no controle de pragas agrícolas

1.2.2.1. Controle biológico

O controle biológico abrange técnicas que podem utilizar agentes microbianos (como bactérias, fungos, vírus), a criação massal e dispersão de organismos predadores, parasitoides e nematoides entomopatogênicos, o uso de compostos naturais extraídos de plantas e semioquímicos (Ruiu, 2015). Dentre estes, o controle de pragas com a utilização de agentes microbianos aplicados no solo ou em partes do vegetal destaca-se como uma alternativa promissora para a maior sustentabilidade da produção agrícola (Péchy-Tarr et al., 2008).

Na utilização de bactérias entomopatogênicas, características como a produção em massa com boa relação custo-benefício, especificidade, durabilidade, segurança ao meio ambiente e a rápida interrupção da alimentação, contribuem para a manutenção das populações de pragas abaixo do nível de dano econômico (Glare et al., 2017).

A descoberta de espécies que reúnem este conjunto de características vem proporcionando incrementos significativos na quantidade de derivados liberados para uso obtidos de bactérias entomopatogênicas, como compostos ativos e

produtos comerciais (Ruiu, 2015), resultando no domínio em todo o mundo do mercado de biopesticidas (Glare et al., 2017).

1.2.2.2. *Bacillus thuringiensis* como biopesticida e fonte de genes inseticidas

Entre os maiores sucessos comerciais de entomopatógenos bacterianos encontra-se os da ordem Bacillales, destacando-se os gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Lysinibacillus*, que sob certas condições formam endósporos, que podem ser acompanhados de corpos paraesporais (ou cristais de proteínas) com atividade inseticida (Glare et al., 2017). No entanto, embora haja certa diversidade de gêneros com atividade inseticida na ordem Bacillales, ocorre o predomínio da utilização de uma única espécie, *Bacillus thuringiensis*, que detém a maior parcela do mercado de bioinseticidas microbianos (Glare et al., 2012; Arthurs e Dara, 2019).

Como consequência da utilização em larga escala de *B. thuringiensis*, seja por seu uso como biopesticidas, e principalmente pela expressão de suas proteínas inseticidas em plantas transgênicas, estão ocorrendo sucessivos casos de evolução da resistência de pragas a suas proteínas.

Em campo, para os biopesticidas à base *B. thuringiensis*, somente duas espécies de insetos têm sido reportadas com o desenvolvimento de resistência: *Plutella xylostella* e *Trichoplusia ni*, o que pode ser explicado pela presença de múltiplas toxinas com diferentes modos de ação presentes nesses produtos (Glare et al., 2017).

Já em plantas transgênicas, relatos de resistência em campo para as proteínas de *B. thuringiensis* são mais frequentes, como é o caso da *Busseola fusca* para Cry1Ab em milho na África do Sul (van Rensburg, 2007), *Helicoverpa armigera* para Cry1Ac em algodão na China (Liu et al., 2010), *Spodoptera frugiperda* para Cry1F em milho em Porto Rico (Storer et al., 2010) e no Brasil (Farias et al., 2014), e *Diabrotica virgifera virgifera* para Cry3Bb1 em milho nos Estados Unidos (Gassmann et al., 2011). Entre estes autores, é comum justificarem a evolução da resistência devido a utilização por longo tempo e em larga escala de um reduzido número de

proteínas, uso de plantas que apresentam baixos níveis de acúmulo da proteína inseticida e negligenciamento na adoção das áreas de refúgio.

Como agravante, entre as proteínas de *B. thuringienses* pode ocorrer resistência cruzada, como no caso de lagartas com resistência a Cry1F que apresentam alto nível de resistência a Cry1A.105 e Cry1Ab, e adicionalmente baixo nível de resistência a Cry2Ab2 (Bernardi et al., 2015). Esses fatores fazem com que seja necessário identificar novas moléculas que sejam amplamente eficazes e que possam ser utilizadas com segurança contra as conhecidas e emergentes pragas agrícolas (Labreuche et al., 2017).

1.2.2.3. *Pseudomonas* no controle de pragas

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são conhecidas por sua ampla distribuição por diversos ambientes, como solo, água, superfície de plantas e animais, capacidade de utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos como fonte de energia e produção de um conjunto notável de exoenzimas, toxinas e metabólitos secundários (Rangel et al., 2016).

Além destas promissoras características já identificadas, tem-se ainda vasta diversidade de espécies bacterianas pouco estudadas ou não conhecidas do gênero *Pseudomonas*. Desde 2009 foram descritas mais de 70 novas espécies, sendo que nos últimos 3 anos houve em média a identificação de 10 novas espécies por ano (Peix et al., 2018). Nesta diversidade encontramos espécies que são patogênicas a humanos, *Pseudomonas aeruginosa*, a plantas, *Pseudomonas syringae*, enquanto outras são conhecidas por sua capacidade de biorremediação de poluentes, *Pseudomonas putida* e efeitos benéficos em plantas, como na melhora da sanidade vegetal e produção agrícola, *Pseudomonas fluorescens* (Flury et al., 2016).

No controle de pragas, vários trabalhos têm demonstrado o potencial de utilização de bactérias do gênero *Pseudomonas*. Estes estudos resultaram na descoberta de uma ampla variedade de moléculas que contribuíram ou foram efetivas em seu controle, como as proteínas Fit de *Pseudomonas fluorescens* CHA0 e *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391, contra *Spodoptera littoralis*, *Heliothis virescens* e *Plutella xylostella* (Ruffner et al., 2013); do cianeto de hidrogênio e

diferentes tipos de lipopeptídeos cíclicos de *Pseudomonas protegens* CHA0, *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 e *Pseudomona sp.* CMR12a avaliados em *G. mellonella* e *Plutella xylostella* (Flury et al., 2017); de lipopeptídeos xantholysins A e B de *Pseudomonas sp.* DJ15 em *Myzus persicae* (Lim et al., 2017); de análogos de rizoxina, orfamida A e quitinase de *Pseudomonas protegens* Pf-5 em *Drosophila melanogaster* (Loper et al., 2016).

Além da descoberta destas moléculas, ocorreu também o desenvolvimento de plantas transgênicas com genes de *Pseudomonas* eficazes no controle de coleópteros. Pode-se citar as proteínas IPD072A identificada em *Pseudomonas chlororaphis*. Depois de constatada sua atividade inseticida, o gene que codifica a proteína foi utilizado na transformação genética de milho e as plantas obtidas foram resistentes a *Diabrotica virgifera virgifera* (Schellenberger et al., 2016).

Há também o recente trabalho de Wei et al. (2018), que descobriram a proteína PIP-47Aa isolada de *Pseudomonas mosselii*, esta apresentou atividade inseticida contra *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica barberi*, *Diabrotica undecimpunctata Howardi*, *Diabrotica speciosa* e *Phyllotreta cruciferae*. A proteína demonstrou-se também efetiva quando expressa em plantas de milho.

Destaca-se, ainda, que em ambos os trabalhos estas novas proteínas mantiveram-se eficazes contra larvas de *Diabrotica virgifera virgifera* resistentes as proteínas mCry3Aa e Cry34Ab1/Cry35Ab1, ambas utilizadas em eventos comerciais de milho, sendo possível que sua atuação ocorra por novos mecanismos de ação.

1.2.2.4. *Burkholderia* no controle de pragas

O gênero *Burkholderia* surgiu a partir da reclassificação de espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, o qual inicialmente foi composto por apenas sete espécies (Yabuuchi et al., 1992), posteriormente, inúmeras novas espécies foram acrescentadas, atualmente é composto por mais de 120 espécies (Parte, 2018). Com este grande aumento, foram identificadas várias potenciais aplicações biotecnológicas, como espécies capazes de produzir enzimas hidrolíticas de interesse comercial, substâncias bioativas que promovem a sanidade e crescimento

vegetal e as capazes de degradar poluentes recalcitrantes (Eberl e Vandamme, 2016).

Outra aplicação de destaque no gênero *Burkholderia* é seu uso no biocontrole de pragas agrícolas, embora com um menor número de isolados e moléculas ativas identificadas que em *Pseudomonas*, há relatos de sucesso tanto em estudos científicos como na produção comercial de bioinseticida. Como exemplos, a presença intestinal de *Burkholderia* sp. reduziu o número de ovos e o tempo da primeira ovoposição de *Riptortus pedestris* (Jong Kil et al., 2014), enquanto a *Burkholderia cepacia* apresentou efeito inseticida contra larvas de *Drosophila* (Hsu et al., 2014). Outro interessante relato foi o isolamento e caracterização de uma nova espécie de *Burkholderia*, a *B. rinojensis* (isolado A396), que apresentou forte atividade inseticida e acaricida, estes efeitos não dependeram da ingestão ou contato das células bacterianas com a lagarta, visto que o cultivo bacteriano após aquecimento a 60°C por 2h (que resulta ausência de células vivas) e o sobrenadante livre de células permaneceram ativos (Cordova-Kreylos et al., 2013). Atualmente o isolado A396 é o ingrediente ativo do bioinseticida Venerate® produzido pela Marrone® Bio Innovations nos Estados Unidos (Marrone Bio Innovations, 2019).

1.3. Referências

Abdeen A, Miki B (2009) The pleiotropic effects of the bar gene and glufosinate on the *Arabidopsis* transcriptome. **Plant Biotechnology Journal** 7:266–282.

Arencibia A, Vázquez RI, Prieto D, Téllez P, Carmona ER, Coego A, Hernández L, La Riva GA, Selman-Housein G (1997) Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding** 3:247–255.

Arruda LA, Leite RC, Tonquelski GV, Leal AF, Borges FSP, Rodrigues LA (2014) Eficiência do parasitismo de três espécies de *Trichogramma* (*T. galloi*, *T. atopovirilia* e *T. bruni*) sobre ovos da praga *Diatraea saccharalis*. **Global Science and Technology** 7:67–75.

Arruda P (2012) Genetically modified sugarcane for bioenergy generation. **Current Opinion in Biotechnology** 23:315–322.

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

Áy Z, Mihály R, Cserhádi M, Éva K, Pauk J (2012) The effect of high concentrations of glufosinate ammonium on the yield components of transgenic spring wheat (*Triticum aestivum* L.) constitutively expressing the *bar* gene. **The Scientific World Journal** 2012:1–9.

Bernardi D, Salmeron E, Horikoshi RJ, Bernardi O, Dourado PM, Carvalho RA, Martinelli S, Head GP, Omoto C (2015) Cross-resistance between Cry1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided bt maize hybrids in Brazil. **PLoS ONE** 10:1–15.

CIB (2017) **CTB141175/01-A (CTC20BT)**. Disponível em: <<https://cib.org.br/produtos-aprovados/ctb141175-01-a/>>. Acesso em: 31 dez. 2018.

CONAB (2019) **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, safra 2019/20, Primeiro levantamento**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>. Acesso em: 31 dez. 2018.

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.

CTNBio (2019) **Liberação Comercial**. Disponível em: <<http://ctnbio.mcti.gov.br/inicio>>. Acesso em: 2 nov. 2019.

Dayan FE, Owens DK, Corniani N, Silva FML, Watson SB, Howell J, Shaner DL (2015) Biochemical Markers and Enzyme Assays for Herbicide Mode of Action and Resistance Studies. **Weed Science** 63:23–63.

Dinardo-Miranda LL (2008) Pragas. In.: Dinardo-Miranda L. L., Vasconcelos A. C. M., Landell M. G. A. (Eds.) **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, p. 349–404.

Dinardo-Miranda LL, Fracasso JV (2013) Sugarcane straw and the populations of pests and nematodes. **Scientia Agricola** 70:305–310.

Duke S, Lydon J (1987) Herbicides from Natural Compounds. **Weed Technology** 1:122–128.

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

EPE (2019) **Relatório Síntese. Balanço Energético Nacional 2019, Ano Base 2018**. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-377/topico-470/Relatório Síntese BEN 2019 Ano Base 2018.pdf>>. Acesso em: 04 jan. 2020.

FAO (2019) **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 26 mar. 2019.

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.

Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, et al. (2002) **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 920p.

Gao S, Yang Y, Xu L, Guo J, Su Y, Wu Q, Wang C, Que Y (2018) Particle bombardment of the cry2A gene cassette induces stem borer resistance in sugarcane. **International Journal of Molecular Sciences** 19:1–16.

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.

Gonzalez DO, Church JB, Robinson A, Connell JP, Sopko M, Rowland B, Woodall K, Larsen CM, Davies JP (2018) Expression characterization of the herbicide tolerance gene *Aryloxyalkanoate Dioxygenase (aad-1)* controlled by seven combinations of regulatory elements. **BMC Plant Biology** 18:1–13.

Hérouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, Klis RJ Van Der, Rouan D (2005) Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** 41:134–149.

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.

Islam N, Laksana C, Chanprame S (2016) Agrobacterium-mediated transformation and expression of Bt gene in transgenic sugarcane. **J. Issaas** 22:84–95.

Ismail RM (2013) Evaluation of genetically modified sugarcane lines carrying Cry1Ac gene using molecular marker techniques. **GM crops & food** 4:58–66.

Jong Kil Y, Ja Seo M, Kyun Kang D, Na Oh S, Suk Cho H, Nam Youn Y, Yasunaga-Aoki C, Man Yu Y (2014) Effects of Enterobacteria (*Burkholderia* sp.) on Development of *Riptortus pedestris*. **Journal of the Faculty of Agriculture** 59:77–84.

Kalunke RM, Kolge AM, Babu KH, Prasad DT (2009) *Agrobacterium* mediated transformation of sugarcane for borer resistance using *cry1Aa3* gene and one-step regeneration of transgenic plants. **Sugar Tech** 11:355–359.

Labreuche Y, Chenivresse S, Jeudy A, Panse S Le, Boulo V, Ansquer D, Pagès S, Givaudan A, Czjzek M, Roux F Le (2017) Nigritoxin is a bacterial toxin for crustaceans and insects. **Nature Communications** 8:1–9.

Lemes ARN, Davolos CC, Legori PCBC, Fernandes OA, Ferré J, Lemos MVF, Desiderio JA (2014) Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PloS one** 9:1–8.

Lemes ARN, Figueiredo CS, Sebastião I, Marques da Silva L, Costa Alves R da, Siqueira HAA de, Lemos MVF, Fernandes OA, Desidério JA (2017) Cry1Ac and Vip3Aa proteins from *Bacillus thuringiensis* targeting Cry toxin resistance in *Diatraea flavipennella* and *Elasmopalpus lignosellus* from sugarcane. **PeerJ** 5:1–16.

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.

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

Mayavan S, Subramanyam K, Jaganath B, Sathish D, Manickavasagam M, Ganapathi A (2015) Agrobacterium-mediated in planta genetic transformation of sugarcane setts. **Plant Cell Reports** 34:1835–1848.

Melo ALDA, Soccol VT, Soccol CR (2016) *Bacillus thuringiensis*: Mechanism of action, resistance, and new applications: A review. **Critical Reviews in Biotechnology** 36:317–326.

Naqvi RZ, Asif M, Saeed M, Asad S, Khatoon A, Amin I, Mukhtar Z, Bashir A, Mansoor S (2017) Development of a Triple Gene Cry1Ac-Cry2Ab-EPSPS Construct and Its Expression in *Nicotiana benthamiana* for Insect Resistance and Herbicide Tolerance in Plants. **Frontiers in Plant Science** 8:1–9.

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.

Peix A, Ramírez-Bahena M-H, Velázquez E (2018) The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. **Infection, Genetics and Evolution** 57:106–116.

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.

Rossetto R, Santiago AD (2019) **Pragas no colmo - Broca da cana-de-açúcar (*Diatrea sacchralis*)**. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_131_272200817517.html>. Acesso em: 8 jul. 2019.

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.

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.

Schnepf E, Crickmore N, Rie J Van, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and molecular biology reviews** 62:775–806.

Sena JAD, Hernández-Rodríguez CS, Ferré J (2009) Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. **Applied and environmental microbiology** 75:2236–2237.

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.

UNICA (2017) **Genetically modified sugarcane developed by CTC in Brazil is approved at CTNBio.** Disponível em: <<http://english.unica.com.br/news/16900437920334804993/genetically-modified-sugarcane-developed-by-ctc-in-brazil-is-approved-at-ctnbio>>. Acesso em: 31 dez. 2018.

Vachon V, Laprade R, Schwartz JL (2012) Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. **Journal of Invertebrate Pathology** 111:1–12.

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.

Weng LX, Deng H, Xu JL, Li Q, Wang LH, Jiang Z, Hai BZ, Li Q, Zhang LH (2006) Regeneration of sugarcane elite breeding lines and engineering of stem borer resistance. **Pest Management Science** 62:178–187.

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.

2. CAPÍTULO 2 – Obtenção de eventos de cana-de-açúcar tolerantes ao herbicida glufosinato de amônio e expressão da toxina Vip3Aa para controle de *Diatraea saccharalis*

2.1. Resumo

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande relevância no Brasil e no mundo. Durante seu cultivo o ataque de pragas e a competição com plantas daninhas são fatores limitantes à obtenção de maiores produtividades. Para o controle de pragas em cana-de-açúcar por meio de transgenia com os genes *cry*, vários estudos demonstraram sua efetividade e está liberado no Brasil variedades para uso comercial. No entanto, não são encontrados relatos sobre a transformação genética de cana-de-açúcar com o gene *vip3Aa*. Assim, objetivou-se a 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*. Foram obtidos 48 eventos PCR positivos, que foram submetidos ao teste de resistência a *Diatraea saccharalis*, principal praga da cultura no Brasil, não sendo encontrados eventos resistentes. Já no teste de resistência ao glufosinato de amônio foram obtidos eventos que não foram afetados por nenhuma das concentrações utilizadas do herbicida, enquanto plantas sem o gene apresentaram efeitos significativos de suscetibilidade ao 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 nos com maiores níveis não se detectou nenhum efeito, demonstrando-se eficientes.

Palavras-chave: *Saccharum* spp, *Agrobacterium tumefaciens*, proteína inseticida vegetativa, glufosinato de amônio, plantas daninhas

2.2. Introdução

O ataque de insetos-praga é uma das principais causas de perda de rendimento da cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp L.) no mundo (Islam et al., 2016). No Brasil, principal produtor (FAO, 2019), destaca-se *Diatraea saccharalis* Fabr. (Lepidoptera: Crambidae) como uma das mais importantes pragas da cultura (Dinardo-Miranda, 2008). Seus danos diretos compreendem a formação de galerias e consequências relacionadas, como a perda de peso e morte de gemas, enquanto os indiretos estão relacionados ao favorecimento da entrada de microrganismos oportunistas causadores da podridão vermelha, o que caracteriza o complexo broca-podridão (Gallo et al., 2002; Rossetto e Santiago, 2019). Os prejuízos decorrentes do ataque dessa praga estão estimados na ordem de US\$ 500 milhões por ano no Brasil (Arruda et al., 2014).

O desenvolvimento de resistência a pragas por meio do melhoramento convencional em cana-de-açúcar é dificultado pela complexidade de seu genoma (Arruda, 2012) e pela ausência de germoplasma resistente a pragas nas coleções em todo o mundo (Islam et al., 2016). Neste sentido, a utilização da engenharia genética vem se destacando por apresentar enorme potencial para a introdução de características desejáveis, diretamente em variedades cultivadas comercialmente (Arruda, 2012). Os primeiros relatos de eventos de cana-de-açúcar expressando genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* para resistência a pragas datam de 1997 (Arencibia et al., 1997), posteriormente, vários outros trabalhos foram desenvolvidos (Weng et al., 2006; Kalunke et al., 2009; Ismail, 2013; Gao et al., 2018), com a primeira aprovação para uso comercial de uma cana-de-açúcar transgênica no Brasil em 2017, a qual contém o gene *cry1Ab* (CIB, 2017; UNICA, 2017).

Outra classe de proteínas inseticidas produzidas por *B. thuringiensis*, as proteínas Vip, se caracterizam por serem produzidas durante a fase vegetativa da célula, serem secretadas e não formarem cristais proteicos (Schnepf et al., 1998). Entre estas, a Vip3Aa destaca-se por sua eficiência no controle de diversas pragas agrícolas e pelo fato de se ligar em receptores de membrana do intestino diferentes dos que se unem às proteínas Cry, o que dificulta a ocorrência de resistência cruzada (resistência simultânea a duas proteínas inseticidas diferentes) (Sena et al.,

2009; Lemes et al., 2017). No entanto, apesar destas características, da existência de eventos comerciais de milho e algodão expressando o gene *vip3Aa* (CTNBio, 2019) e de sua eficiência no controle de *D. saccharalis* avaliada por meio de bioensaios com dieta artificial (Lemes et al., 2014), não foram encontrados até o momento relatos da transformação genética de cana-de-açúcar com este gene.

Outro fator limitante para a produtividade é a competição das lavouras com plantas daninhas (Naqvi et al., 2017). Para seu controle, uma alternativa é a utilização do herbicida glufosinato de amônio, que é uma versão sintética do herbicida bialaphos, produzido por *Streptomyces viridochromogenes*, não seletivo e atuando em monocotiledôneas e dicotiledôneas e sua aplicação causa o rápido acúmulo de amônia a níveis tóxicos nas plantas (Duke e Lydon, 1987).

Com a descoberta dos genes *pat* e *bar* que codificam para a enzima fosfinotricina acetiltransferase (capaz de inativar o herbicida glufosinato de amônio) e sua expressão em plantas por transgenia, foi possível o uso do glufosinato de amônio na seleção de eventos transgênicos durante a etapa de transformação e em campo para o controle de plantas daninhas em pós-emergência da cultura (Áy et al., 2012).

Assim, objetivou-se a obtenção e avaliação de 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*.

2.3. Materiais e Métodos

2.3.1. Síntese e montagem do gene *vip3Aa* no vetor de expressão pMCG1005

No gene *vip3Aa* foi realizada a otimização de códons, síntese e clonagem nos sítios *AvrII* e *SpeI* do vetor pMCG1005, pela GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brasil). A otimização foi realizada pela modificação dos nucleotídeos nos códons, substituindo-os por códons preferencialmente utilizados em cana-de-açúcar, o que resulta na maior expressão. No processo foi conservada a sequência proteica

de 789 aminoácidos depositada no GenBank sob o número AAC37036, proveniente de *B. thuringiensis* cepa AB88.

O vetor pMCG1005 é do tipo binário e utilizado para transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. Neste o gene *vip3Aa* ficou sob controle do promotor da ubiquitina 1 (PUBi1), acoplado ao primeiro intron do gene álcool desidrogenase (*adh1*), ambos de milho. O vetor contém ainda, o gene *bar* sob controle do promotor 4xCaMV35S que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio em plantas, e o gene de resistência ao antibiótico espectinomicina para seleção em bactérias, a montagem final ficou nomeada de pMCG1005::*vip3Aa* (Figura 1).

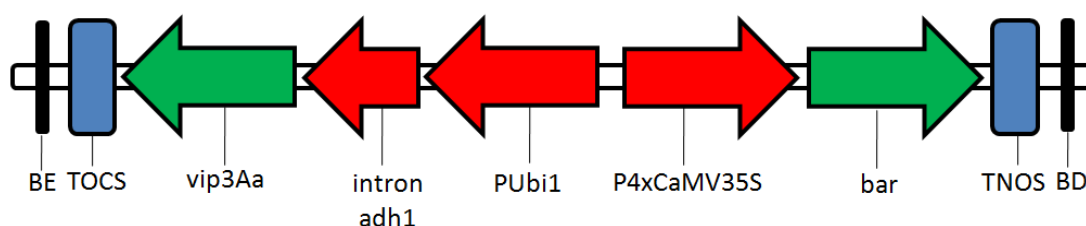


Figura 1. Esquema da região do T-DNA do vetor pMCG1005::*vip3Aa* utilizado na transformação de cana-de-açúcar. Gene *vip3Aa* sob o promotor da ubiquitina 1 do milho (PUBi1) com o primeiro intron do gene álcool desidrogenase (*adh1*) e terminador da octopina sintase (TOCS), gene bialaphos (*bar*) sob o promotor 4xCaMV35S e terminador da nopalina sintase (TNOS), borda esquerda (BE) e direita (BD).

O vetor pMCG1005::*vip3Aa* foi inserido em células competentes de *E. coli* DH10B por choque térmico, conforme descrito por Aragão e Rech (2015), para multiplicação e manutenção dos mesmos, no procedimento utilizou-se o meio Luria-Bertani (LB) acrescido de 100 mg/L do antibiótico espectinomicina.

2.3.2. Transformação de *A. tumefaciens* por eletroporação

Foi realizada a extração do vetor pMCG1005::*vip3Aa* das células de *E. coli* utilizando o kit Wizard Plus SV Promega Miniprep DNA Purification System conforme recomendação do fabricante. Posteriormente, conforme descrito em Lacorte e Ramano (2015), o DNA plasmidial foi utilizado na eletroporação de células competentes de *A. tumefaciens* EHA 105, e selecionadas em meio Luria-Bertani (LB) acrescido de 100 mg/L do antibiótico espectinomicina. A confirmação da inserção do

plasmídeo nas células de *A. tumefaciens* se processou pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), com 2 µL de células crescidas em cultura líquida por 18 horas e os iniciadores “forward” AAGACACTGCGCTACGAGGT e “reverse” CCGAAGCCATTGATAGGTGT, que amplificam um fragmento de 185 pares de bases (pb) do gene *vip3Aa*, sob a temperatura de pareamento de 60°C, com posterior detecção de bandas por corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%.

2.3.3. Transformação via *A. tumefaciens*, seleção e regeneração de plantas transgênicas

Os procedimentos de indução de calos, transformação genética e regeneração (Figura 2) foram desenvolvidos conforme descrito por Dong et al. (2014) com modificações: utilizaram-se ponteiros de cana-de-açúcar da cultivar SP80-3280 do Centro de Cana IAC, Ribeirão Preto-SP, coletados em duas datas, com intervalo de 27 dias, os quais foram definidos como lote 1 e 2 e extraídos explantes de 25 e 20 “palmitos”, respectivamente. A indução de calos embriogênicos foi realizada com o uso de meio MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 2 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D). Após a transformação via *A. tumefaciens*, para a regeneração de plantas, foi utilizado 2 mg/L de glufosinato de amônio para seleção de eventos transgênicos e 20 mg/L de meropeném para eliminar a bactéria *A. tumefaciens*.

Após o enraizamento *in vitro*, os brotos foram transplantados em bandejas plásticas preenchidas com substrato e aclimatizados em casa de vegetação. Da indução de calos até a transferência para casa de vegetação teve a duração de aproximadamente de seis meses. Também foram aclimatizados controles negativos (plantas não transformadas regeneradas *in vitro*), para serem utilizadas nas posteriores análises.

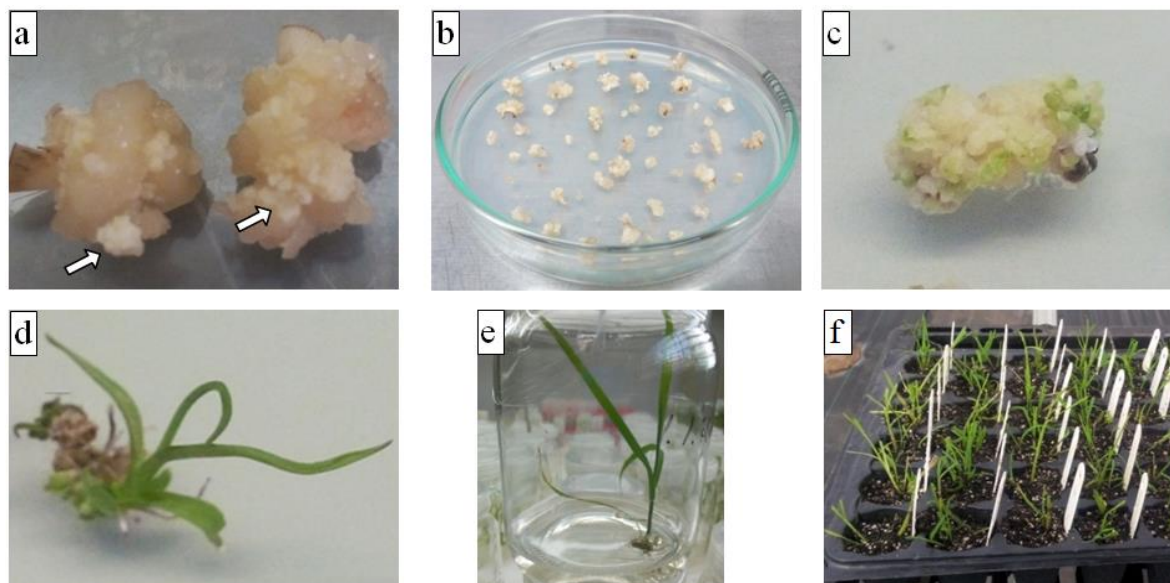


Figura 2. Etapas da transformação genética de cana-de-açúcar. a - indução de calos, setas indicam regiões com aspecto embriogênico; b - calos embriogênicos selecionados para transformação; c - presença de pontuações esverdeadas indicando início de regeneração após transformação; d - broto regenerando em meio seletivo; e - broto individualizado em processo de enraizamento; f - plantas em aclimatização em casa de vegetação.

2.3.4. Extração de DNA genômico e confirmação da inserção dos genes

A confirmação da inserção do T-DNA em plantas regeneradas foi realizada por meio dos procedimentos de extração, quantificação, verificação de qualidade do DNA e confirmação por PCR, conforme descrito por Romano e Leal-Bertioli (2015) e Rodrigues, Gama e Aragão (2015). Tecidos de folha foram coletados das plantas mantidas em casa de vegetação e submetidas à extração de DNA total pelo método CTAB, sendo, posteriormente, realizada a quantificação e verificação de pureza do DNA obtido por leitura espectrofotométrica e de integridade em gel de agarose a 1%. Após a obtenção do DNA genômico, procedeu-se a PCR utilizando 30 ng de DNA e os iniciadores “forward” AAGACACTGCGCTACGAGGT e “reverse” CCGAAGCCATTGATAGGTGT, que amplificam um fragmento de 185 pares de bases (pb) do gene *vip3Aa*, sob a temperatura de pareamento de 58°C, com posterior detecção de bandas por corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%. Assim, pela presença de banda após a corrida eletroforética, pode-se confirmar a inserção do T-DNA nos eventos candidatos.

2.3.5. Teste de resistência a *Diatraea saccharalis*

A fim de facilitar a identificação das plantas proveniente de cada lote, a partir do teste de resistência a *D. saccharalis*, adotou-se a identificação 1.n e 2.n, respectivamente, para os lotes 1 e 2, sendo “n” o número de identificação do evento.

O teste foi realizado com posturas cedidas pela Usina São Martinho (Pradópolis-SP) e conduzido conforme descrito por Ramos (2013) com modificações. Foram utilizadas plantas de cana-de-açúcar transgênicas e plantas não transformadas oriundas do cultivo *in vitro* (CT - controle negativo) com aproximadamente cinco meses de idade, plantadas em vasos de 700 mL e mantidas em casa de vegetação. Folhas destas plantas foram acondicionadas em placa de Petri sobre papel umedecido, em cada placa foram adicionadas 20 lagartas de *D. saccharalis* recém eclodidas e mantidas em condições controladas de fotoperíodo (16 h de luz e 8 h de escuro) e temperatura ($27^{\circ}\text{C} \pm 2$). Cada planta (evento) foi representada por quatro placas. Após oito dias foram avaliados o peso médio de lagartas vivas e a sobrevivência por placa.

2.3.6. Acúmulo amônio em discos foliares causado pelo herbicida glufosinato de amônio

Para avaliar a eficiência de inativação do herbicida glufosinato de amônio pela enzima fosfinotricina acetiltransferase expressa pelo gene *bar*, plantas transgênicas e as controle negativo foram submetidas ao ensaio de disco foliar, descrito em Dayan et al. (2015). O teste baseia-se na quantificação do acúmulo de amônio, que em níveis tóxicos causa a morte celular, isto ocorre em consequência da inibição pelo herbicida da enzima glutamina síntese (responsável pela assimilação do amônio). Foram extraídos discos foliares de 5 mm das plantas e imediatamente imersos em solução aquosa acrescida do herbicida glufosinato de amônio nas concentrações de 0, 12,5 e 100 μM , em triplicata. A confecção dos discos para exposição ao glufosinato de amônio, assim como a leitura na absorbância A_{630} foram realizadas em microplacas de 96 poços, cada poço contendo um único disco. Simultaneamente foi realizada a leitura de uma curva padrão estabelecida com

sulfato de amônio, com 11 pontos em triplicata e concentrações variando entre 0 e 2 mM de amônio.

2.3.7. Quantificação da expressão dos genes *vip3Aa* e *bar* por PCR em tempo real em cana-de-açúcar

Amostras de RNA total foram extraídas a partir de folhas de cana-de-açúcar utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen™), conforme recomendações do fabricante. Após extração foi verificada a integridade do RNA com o kit Bioanalyzer RNA 6000 Nano no equipamento 2100 Bioanalyzer e quantificado com o kit Qubit® RNA BR Assay no Qubit® 2.0 Fluorometer. Posteriormente, 1 µg de RNA foi tratado com a RQ1 RNase-Free DNase para eliminar contaminações por DNA genômico e, em seguida, foi realizada a síntese da primeira fita de cDNA com o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System.

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas com o kit KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Universal no Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR, de acordo com as instruções do fabricante. Para o gene *GAPDH* (gene de referência) foram utilizados os iniciadores “forward” TTGGTTTCCACTGACTTCGTT e “reverse” CTGTAGCCCCACTCGTTGT, que amplificam um fragmento de 122 pb (Andrade et al., 2017), para o gene *vip3Aa*, utilizou a sequência “forward” CAAGGCAACCTCAACACAGA e “reverse” GCAGGGAAAGGGCATAGT, que amplificam um fragmento de 181 pb, e para o gene *bar*, utilizou a sequência “forward” CGCTCTACCCACCTGCT e “reverse” ATGCCAGTTCCCGTGCTT, que amplificam um terceiro fragmento de 164 pb, para estes dois últimos genes, seus iniciadores foram obtidos com o “software” Primer3Plus (Rozen e Skaletsky, 2000). Inicialmente, para determinar a eficiência de amplificação dos iniciadores, o coeficiente de determinação (R^2) da reta e a melhor concentração de cDNA a ser utilizada, foram realizadas diluições seriadas (1:10) e amplificações com cDNA do evento 34 do lote 2.

Os resultados obtidos foram analisados pelos métodos de quantificação relativa normalizada pelo gene de referência e pela quantificação relativa normalizada por unidade de massa (Livak e Schmittgen, 2001; BioRad, 2006). Para

a amplificação, utilizou-se por reação cDNA equivalente a 7,5 ng do RNA isolado, em triplicata. Na quantificação relativa normalizada pelo gene de referência, primeiro, os valores de Ct dos genes *bar* e *vip3Aa* foram normalizados com o gene de referência GAPDH e, posteriormente, calibrados utilizando o evento 2.34, a este atribuiu-se o nível de expressão igual a 1. Na quantificação relativa normalizada por unidade de massa, os valores de Ct foram calibrados contra o vetor pMCG1005::*vip3Aa*, utilizando 0,133 ng de DNA plasmidial, em triplicata.

2.3.8. Forma de análise dos dados

A avaliação de resistência a *D. saccharalis* foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e sua análise estatística realizada pelo método de agrupamento de médias por meio do teste de Scott-Knott. Para a avaliação do acúmulo amônio em discos foliares causado pelo herbicida glufosinato de amônio, utilizou-se o delineamento fatorial 3x14 (3 concentrações de glufosinato de amônio e 12 eventos transgênicos, mais 2 controles negativos), enquanto a quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real foi novamente conduzido em DIC, nestes dois últimos a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey. Todos foram analisados a 5% de significância.

2.4. Resultados e Discussão

2.4.1. Transformação genética e confirmação de eventos transgênicos

Decorrida a transformação e regeneração, foram aclimatizados em casa de vegetação 60 e 44 eventos candidatos dos lotes 1 e 2 (Figura 2), estas plantas foram então submetidas a confirmação via PCR. Utilizou-se como controle positivo da PCR o vetor pMCG1005::*vip3Aa* e como controle negativo plantas não transformadas. Na eletroforese (Figura 3) obteve-se a presença de banda no controle positivo, e ausência no controle negativo e branco (reação sem DNA). Nos eventos candidatos, obtiveram-se 29 e 19 eventos PCR positivos para os lotes 1 e 2, respectivamente. Foram selecionadas do lote 1 as seguintes plantas: 1, 2, 6, 7, 8,

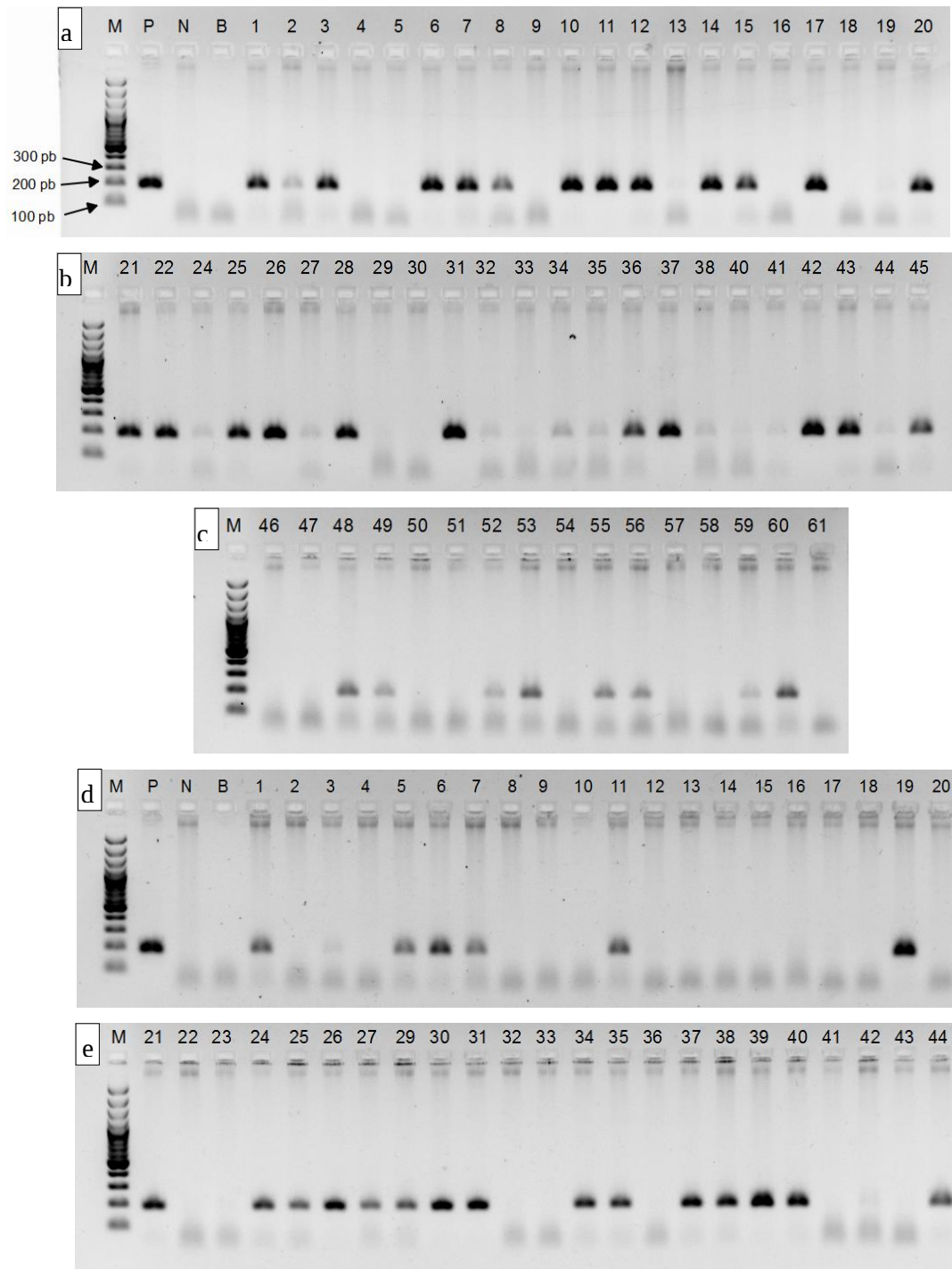


Figura 3. Géis de eletroforeses em agarose das PCR realizadas, fragmento amplificado de 185 pb do gene *vip3Aa* de eventos candidatos. a, b, c - plantas provenientes do lote 1; d, e - plantas provenientes do lote 2. M: marcador de tamanho de DNA (100 pb); P: controle positivo, utilizando DNA plasmidial do vetor pMCG1005::*vip3Aa*, N: controle negativo, utilizando DNA de plantas não transgênicas; B: controle branco, sem adição de DNA.

10, 11, 12, 15, 17, 20, 21, 22, 25, 26, 28, 31, 36, 37, 42, 43, 45, 48, 52, 53, 55, 56, 59, 60 e do lote 2 as plantas: 5, 6, 7, 11, 19, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 34, 35, 37, 38, 39, 40. Plantas 3, 14, 49 (lote 1) e 1 e 44 (lote 2) foram PCR positivas, no entanto, não sobreviveram para continuidade nas demais análises, não sendo contabilizadas.

2.4.2. Teste de resistência a *Diatraea saccharalis*

Na análise de resistência das plantas transgênicas a *D. saccharalis*, os 48 eventos PCR positivos e controles negativos foram avaliados (Figura 4). Ao final de 7 dias obteve-se entre 75% e 100% de sobrevivência, encontra-se entre os menores valores obtidos o controle negativo do lote 2. O peso médio de lagartas variou entre 0,35 e 2,45 mg, o qual foi distinguido estatisticamente em quatro grupos, no entanto, no grupo de menor peso médio (grupo d) estão ambos os controles negativos.

Em trabalhos de expressão de genes codificadores de bioinseticidas de *B. thuringiensis*, é comum observar-se resultados desde o subdesenvolvimento de lagartas, até níveis de mortalidade próximos de 100% quando alimentadas com eventos transgênicos eficientes na produção da proteína inseticida, enquanto para plantas controle os relatos foram de ocorrência de desenvolvimento normal e baixos níveis de mortalidade (Weng et al., 2006, 2011; Wang et al., 2017).

Em relação a eficiência da proteína Vip3Aa no controle de *D. saccharalis*, obteve-se resultados positivos quando avaliada em ensaios de adição da proteína sobre dieta artificial, o qual apresentou concentrações de 0,13 e 27,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para causar a mortalidade de 50% e 90% da população, respectivamente (Lemes et al., 2014).

Assim, pelos resultados observados neste estudo (eventos transgênicos com baixas taxas de mortalidade e controles negativos situados em grupos de menor desenvolvimento), têm-se indicativos de que a variação observada entre as plantas pode não ser devida à atividade da proteína Vip3Aa.

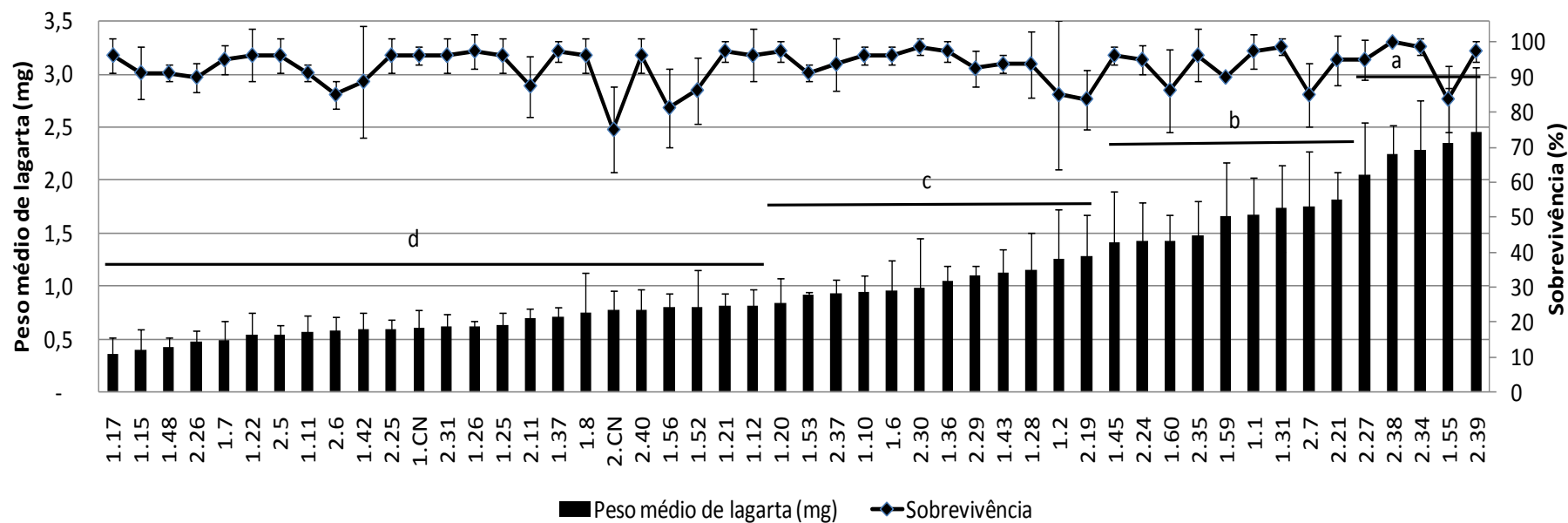


Figura 4. Sobrevivência e peso médio de lagartas de *D. saccharalis* alimentadas com folhas de eventos transgênicos e controle negativo (CN) de cana-de-açúcar. Médias acompanhadas de letras iguais não diferem significativamente para o peso médio de lagartas. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

2.4.3. Acúmulo amônio em discos foliares causado pelo herbicida glufosinato de amônio

O total de 12 plantas transgênicas e 2 controles negativo foram avaliados quanto ao acúmulo de amônio causado pelo herbicida glufosinato de amônio (Figura 5). Foi observado que na ausência (0 μM) de glufosinato de amônio, não houve detecção de amônio em nenhuma das plantas avaliadas, na concentração de 12,5 μM observou-se acúmulo de amônio nas plantas 1.CN, 2.CN e 1.45, e quando submetidas a 100 μM foram afetadas as 1.CN, 2.CN, 1.45, 2.19 e 2.39. Nos demais nove eventos avaliados não se identificaram significativos acúmulos de amônio, ou seja, foram eficientes às concentrações avaliadas.

A obtenção de plantas transgênicas de cana-de-açúcar resistentes a herbicidas como glufosinato de amônio é um importante caráter agrônômico no manejo de plantas daninhas, principalmente devido ao lento crescimento inicial da cultura, o que faz com que tenha grande potencial para aplicação comercial (Gao et al., 2016).

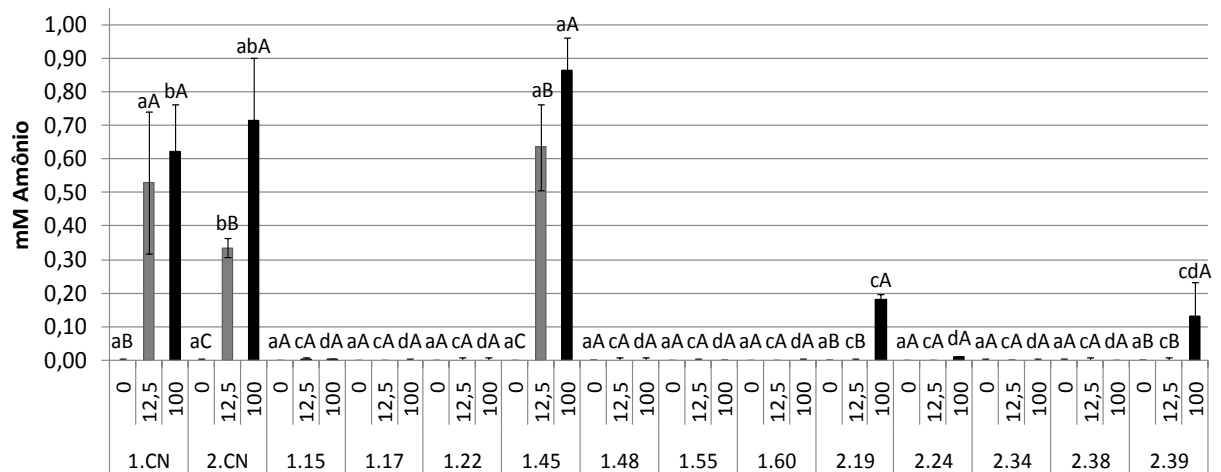


Figura 5. Quantificação de amônio em discos foliares de eventos transgênicos e controle negativo (CN) de cana-de-açúcar, expostos as concentrações de 0, 12,5 e 100 μM do herbicida glufosinato de amônio. Médias acompanhadas de letras minúsculas iguais entre eventos e de letras maiúsculas iguais entre concentrações não diferem significativamente. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

2.4.4. Expressão gênica

Na análise de integridade do RNA as amostras apresentaram picos definidos e valores de RIN (“RNA integrity number”) superiores a 6,7 (Figura 6). No ensaio de avaliação de desempenho dos iniciadores por diluições seriadas, obteve-se para o gene *GAPDH* eficiência de 101,2% e R^2 de 1,0, para o gene *bar* eficiência de 96,2% e R^2 de 1,0 e para o gene *vip3Aa* eficiência de 103,8% e R^2 de 0,99, valores adequados para a análise de expressão gênica. Foram então verificados os níveis de expressão gênica de 5 eventos transgênicos. Na quantificação relativa normalizada por gene de referência (Figura 7 **a** e **b**), pode-se observar que houve variação entre os eventos avaliados. Os eventos 1.48, 1.55 e 2.34 para o gene *bar* (Figura 7 **a**) apresentaram os maiores níveis de expressão e se mostraram eficientes na avaliação do acúmulo amônio em discos foliares (Figura 5), enquanto os eventos 1.45 e 2.19 apresentaram os menores níveis de expressão e acúmulo de amônio no teste com o herbicida.

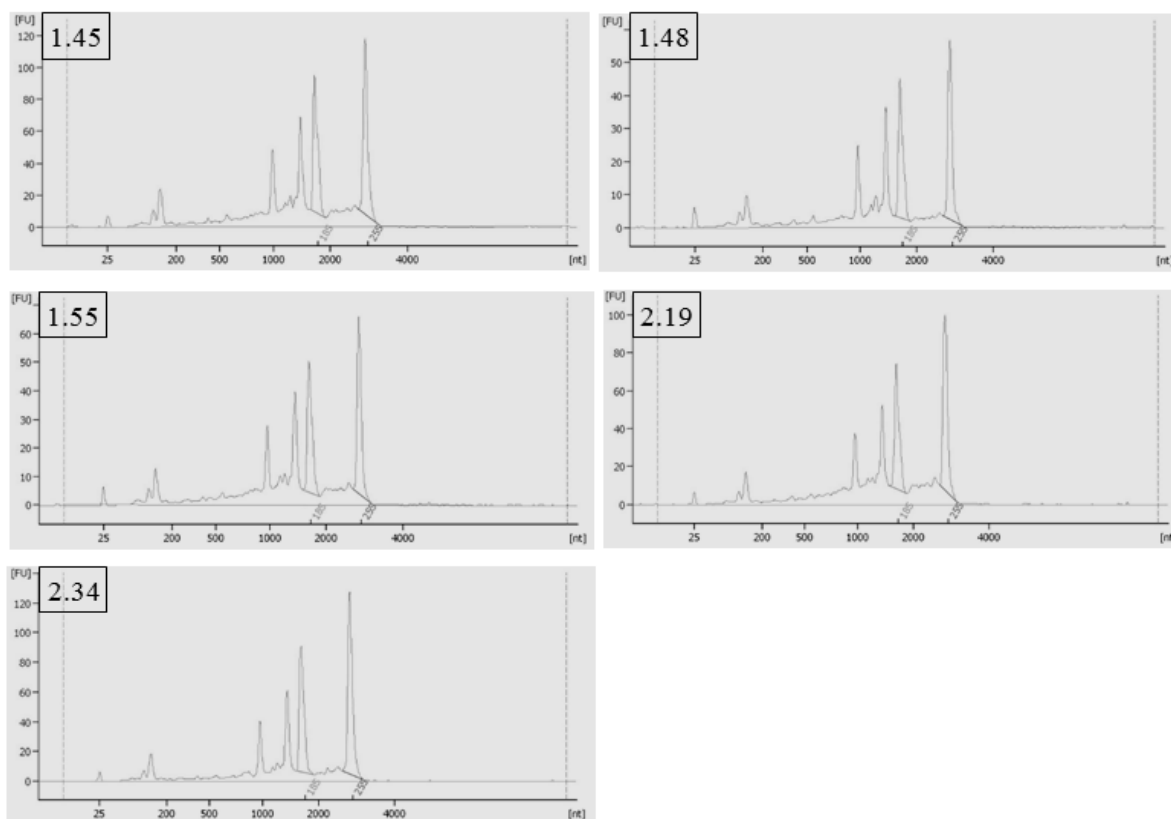


Figura 6. Verificação de integridade de RNA de eventos transgênicos com Bioanalyzer; eixo vertical – unidades de fluorescência (FU); eixo horizontal – tamanho de fragmento em nucleotídeos (nt).

Quanto ao gene *vip3Aa*, também houve variação nos níveis de expressão entre os eventos (Figura 7 b), no entanto, mesmo os com maiores níveis de expressão demonstraram-se suscetíveis na avaliação com *D. saccharalis* (Figura 4). Comparando-se a expressão dos genes *vip3Aa* e *bar*, por meio da quantificação relativa normalizada por unidade de massa (Figura 7 c), nos 3 eventos que se apresentaram eficientes no teste com o herbicida (1.48, 1.55 e 2.34), o gene *bar* foi entre 31 a 49 vezes mais expresso que o gene *vip3Aa*. Baixos níveis de expressão de genes de *B. thuringiensis* em cana-de-açúcar podem ser a causa da ineficiência no controle de pragas, além da possibilidade de subdosos favorecerem a rápida evolução de populações resistentes de insetos à toxina utilizada (Weng et al., 2011).

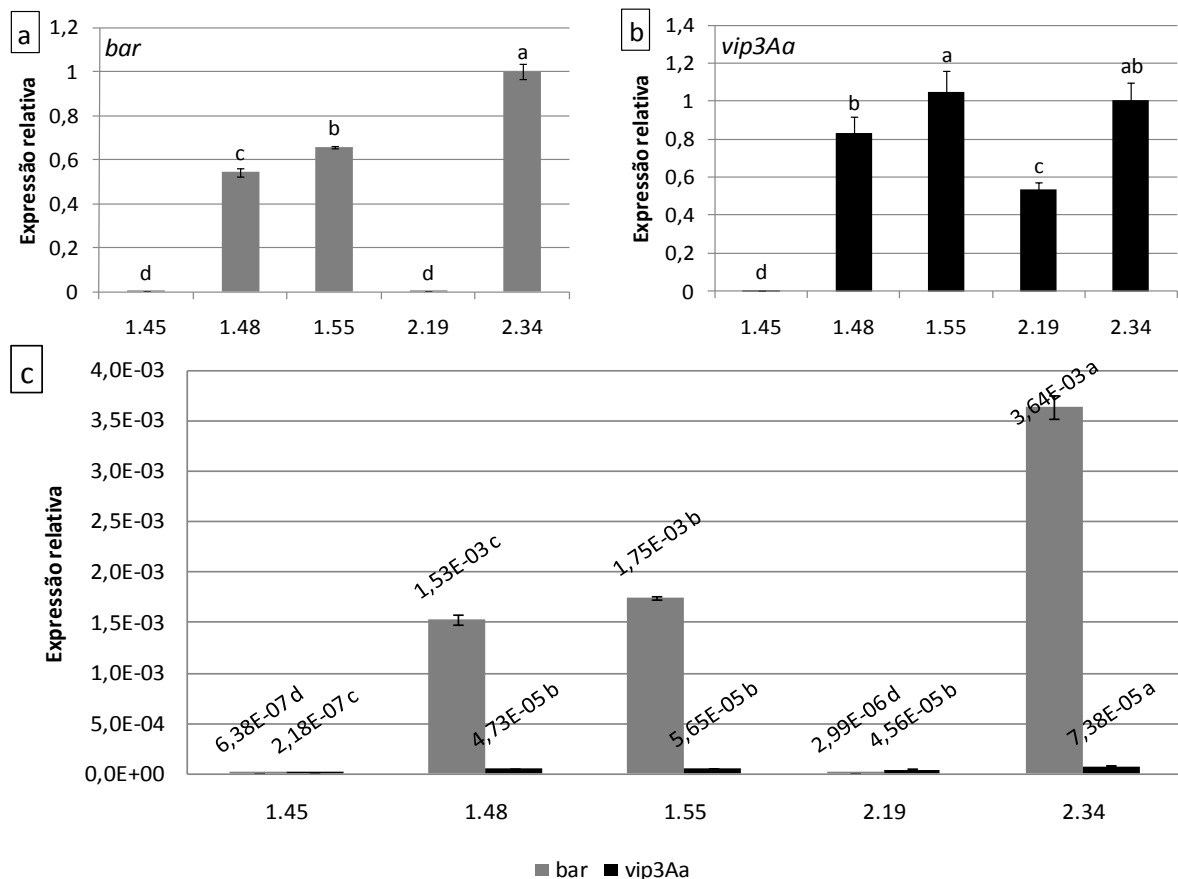


Figura 7. Expressão relativa dos genes *bar* e *vip3Aa* de eventos transgênicos de cana-de-açúcar. a e b - quantificação relativa normalizada por gene de referência, valores de Ct dos genes *bar* e *vip3Aa* foram normalizados com o gene de referência *GAPDH*, e calibrados com evento transgênico 2.34; c - quantificação relativa normalizada por unidade de massa, valores de Ct dos genes *bar* e *vip3Aa* foram calibrados contra o vetor pMCG1005::*vip3Aa*, utilizando 0,133 ng de DNA plasmidial. Médias acompanhadas de letras iguais não diferem significativamente entre eventos. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

Variações de expressão entre eventos transformados com uma mesma construção gênica são tipicamente encontradas e podem ser justificadas pela incapacidade dos métodos em controlar a quantidade, o arranjo e a posição das cópias inseridas no genoma do hospedeiro (Hood e Howard, 2002; Schubert et al., 2004).

Outro importante fator envolvido na transformação genética que afeta a expressão gênica são os promotores, que controlam em quais células, tecidos e estágio de desenvolvimento as sequências sob seu controle serão expressas (Datta et al., 1997). A presença de um intron após o promotor também pode ter influência, sua interação pode alterar inúmeras vezes o nível de expressão gênica, em um efeito conhecido como “intron-mediated enhancement” (IME) (Mascarenhas et al., 1990). Embora se conheça seus efeitos, o mecanismo subjacente do IME permanece incerto, com identificação somente de possíveis características comuns ou importantes (Pan et al., 2016).

Para a transformação de monocotiledôneas, trabalhos relatam que o promotor da ubiquitina gera maiores níveis de expressão que o CaMV35S, o que fez com que tenha sido amplamente utilizado para transformação de cana-de-açúcar por mais de duas décadas (Mohan, 2017; Qamar et al., 2017). No entanto, em nossos experimentos, os menores níveis de expressão foram obtidos para o gene *vip3Aa*, que se encontra sob controle do promotor da ubiquitina fusionado ao intron *adh1*. Neste caso, há que se considerar como sendo possível que a presença do intron *adh1* localizado após o promotor tenha limitado o nível de expressão do gene *vip3Aa*.

Em várias monocotiledôneas, a adição do primeiro intron *adh1* de milho após o promotor eleva inúmeras vezes o nível de expressão do gene (Callis et al., 1987; McElroy et al., 1991; Takumi et al., 1994). No entanto, redução na expressão entre 30% a 70% foram observadas quando o intron *adh1* foi inserido após os promotores 35S e NOP em protoplastos de cana-de-açúcar (Rathus et al., 1993). Adicionalmente, a influência do intron pode ser também gene dependente. Em milho, uma mesma montagem de promotor e o intron (P35S *salT*) para os genes *cat* e *bar*, estimulou a expressão apenas do primeiro gene (Rethmeier et al., 1997).

Outro fator que pode exercer influência na expressão de um transgene são os mecanismos de silenciamento gênico. Os mecanismos de silenciamento estão divididos em dois grupos, o silenciamento gênico transcricional que resulta da inativação do promotor, e assim opera no nível de prevenção da transcrição e o silenciamento gênico pós-transcricional, neste caso o promotor é ativo, mas o mRNA não chega a ser traduzido, o que pode ocorrer em consequência da degradação precoce e/ou broqueio da tradução (Stam et al., 1997; Sijen et al., 2001; De Buck et al., 2013). Diante das possibilidades de ocorrência de silenciamento gênico, também é provável que a baixa expressão gênica obtida para o gene *vip3Aa* tenha ocorrido pela ativação de algum destes mecanismos.

2.5. Conclusões

Para o gene *bar*, foi observado que os eventos com maiores níveis de expressão não foram afetados pelo herbicida, demonstrando-se eficientes, enquanto os com menores níveis foram significativamente afetados pelo herbicida.

Quanto ao gene *vip3Aa*, não se obteve efeitos tóxicos em *D. saccharalis* e se constatou níveis inferiores de expressão gênica em relação aos obtidos para o gene *bar*, com isso, alerta-se para o possível efeito negativo do intron *adh1* em cana-de-açúcar e/ou ocorrência de mecanismos de silenciamento.

2.6. Referências

Andrade LM, Santos BM, Fávero PJR, Marchiori PER, Nóbile PM, Martins APB, Ribeiro RV, Creste S (2017) Reference genes for normalization of qPCR assays in sugarcane plants under water deficit. **Plant Methods** 13:1–9.

Aragão FJL, Rech E leopoldo (2015) Isolamento de vetores para transformação direta. In.: Brasileiro ACM, Carneiro VTC (eds.) **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, p. 39–54.

Arencibia A, Vázquez RI, Prieto D, Téllez P, Carmona ER, Coego A, Hernández L, La Riva GA, Selman-Housein G (1997) Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding** 3:247–255.

Arruda LA, Leite RC, Tonquelski GV, Leal AF, Borges FSP, Rodrigues LA (2014) Eficiência do parasitismo de três espécies de *Trichogramma* (*T. galloi*, *T. atopovirilia* e *T. bruni*) sobre ovos da praga *Diatraea saccharalis*. **Global Science and Technology** 7:67–75.

Arruda P (2012) Genetically modified sugarcane for bioenergy generation. **Current Opinion in Biotechnology** 23:315–322.

Áy Z, Mihály R, Cserhádi M, Éva K, Pauk J (2012) The effect of high concentrations of glufosinate ammonium on the yield components of transgenic spring wheat (*Triticum aestivum* L.) constitutively expressing the *bar* gene. **The Scientific World Journal** 2012:1–9.

BioRad (2006) Real-Time PCR **Applications Guide. Bulletin 5279**. Disponível em: <http://www.bio-Rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2018.

Buck S, Paepe A, Depicker A (2013) Transgene Expression plant transgene expression in Plants, Control of. In.: Christou P, Savin R, Costa-Pierce BA, Misztal I, Whitelaw BA (Eds.) **Sustainable Food Production**. New York: Springer, p. 1570–1593.

Callis J, Fromm M, Walbot V (1987) Introns increase gene expression in cultured maize cells. **Genes & development** 1:1183–200.

CIB (2017) **CTB141175/01-A (CTC20BT)**. Disponível em: <<https://cib.org.br/produtos-aprovados/ctb141175-01-a/>>. Acesso em: 31 dez. 2018.

CTNBio (2019) **Liberação Comercial**. Disponível em: <<http://ctnbio.mcti.gov.br/inicio>>. Acesso em: 2 nov. 2019.

Datla R, Anderson JW, Selvaraj G (1997) Plant promoters for transgene expression. **Biotechnology Annual Review** 3:269–296.

Dayan FE, Owens DK, Corniani N, Silva FML, Watson SB, Howell J, Shaner DL (2015) Biochemical Markers and Enzyme Assays for Herbicide Mode of Action and Resistance Studies. **Weed Science** 63:23–63.

Dinardo-Miranda LL (2008) Pragas. In.: Dinardo-Miranda L. L., Vasconcelos A. C. M., Landell M. G. A. (Eds.) **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, p. 349–404.

Dong S, Delucca P, Geijskes RJ, Ke J, Mayo K, Mai P, Sainz M, Caffall K, Moser T, Yarnall M, Setliff K, Jain R, Rawls E, Smith-Jones M, Dunder E (2014) Advances in Agrobacterium-Mediated Sugarcane Transformation and Stable Transgene Expression. **Sugar Tech** 16:366–371.

Duke S, Lydon J (1987) Herbicides from Natural Compounds. **Weed Technology** 1:122–128.

FAO (2019) **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 26 mar. 2019.

Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, et al. (2002) **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 920p.

Gao S, Yang Y, Wang C, Guo J, Zhou D, Wu Q, Su Y, Xu L, Que Y (2016) Transgenic sugarcane with a *cry1Ac* gene exhibited better phenotypic traits and enhanced resistance against sugarcane borer. **PLoS ONE** 11:1–16.

Gao S, Yang Y, Xu L, Guo J, Su Y, Wu Q, Wang C, Que Y (2018) Particle bombardment of the *cry2A* gene cassette induces stem borer resistance in sugarcane. **International Journal of Molecular Sciences** 19:1–16.

Hood EE, Howard JA (Eds) (2002) **Plants as Factories for Protein Production**. Springer, 209p.

Islam N, Laksana C, Chanprame S (2016) Agrobacterium-mediated transformation and expression of Bt gene in transgenic sugarcane. **J. Issaas** 22:84–95.

Ismail RM (2013) Evaluation of genetically modified sugarcane lines carrying *cry1Ac* gene using molecular marker techniques. **GM crops & food** 4:58–66.

Kalunke RM, Kolge AM, Babu KH, Prasad DT (2009) Agrobacterium mediated transformation of sugarcane for borer resistance using *cry1Aa3* gene and one-step regeneration of transgenic plants. **Sugar Tech** 11:355–359.

Lacorte C, Ramano E (2015) Transferência de vetores para *Agrobacterium* spp. In.: Brasileiro ACM, Carneiro VTC (Eds.) **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, p. 55–72.

Lemes ARN, Davolos CC, Legori PCBC, Fernandes OA, Ferré J, Lemos MVF, Desiderio JA (2014) Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PloS one** 9:1–8.

Lemes ARN, Figueiredo CS, Sebastião I, Marques da Silva L, Costa Alves R, Siqueira HÁA, Lemos MVF, Fernandes OA, Desidério JA (2017) Cry1Ac and Vip3Aa proteins from *Bacillus thuringiensis* targeting Cry toxin resistance in *Diatraea flavipennella* and *Elasmopalpus lignosellus* from sugarcane. **PeerJ** 5:1–16.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods** 25:402–408.

Mascarenhas D, Mettler IJ, Pierce DA, Lowe HW (1990) Intron-mediated enhancement of heterologous gene expression in maize. **Plant Molecular Biology** 15:913–920.

McElroy D, Blowers AD, Jenes B, Wu R (1991) Construction of expression vectors based on the *rice actin 1 (Act1)* 5' region for use in monocot transformation. **Molecular & general genetics** 231:150–60.

Mohan C (Eds.) (2017) **Sugarcane biotechnology: challenges and prospects**. Springer, p. 176.

Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum** 15:473–497.

Naqvi RZ, Asif M, Saeed M, Asad S, Khatoon A, Amin I, Mukhtar Z, Bashir A, Mansoor S (2017) Development of a Triple Gene Cry1Ac-Cry2Ab-EPSPS Construct and Its Expression in *Nicotiana benthamiana* for Insect Resistance and Herbicide Tolerance in Plants. **Frontiers in Plant Science** 8:1–9.

Pan Y, Chen R, Zhu L, Wang H, Huang D, Lang Z (2016) Utilizing modified ubi1 introns to enhance exogenous gene expression in maize (*Zea mays* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Integrative Agriculture** 15:1716–1726.

Qamar Z, Riaz S, Nasir IA, Ali Q, Husnain T (2017) Transformation and evaluation of different transgenic lines for Glyphosate tolerance and cane borer resistance genes in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Cytology and Genetics** 51:401–412.

Ramos VS (2013) **Clonagem, expressão e avaliação do potencial biotecnológico de um inibidor de tripsina de Inga laurina em relação aos insetos pragas *Diatraea saccharalis* e *Heliothis virescens***. 142 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – UNICAMP, Campinas.

Rathus C, Bower R, Birch RG (1993) Effects of promoter, intron and enhancer elements on transient gene expression in sugar-cane and carrot protoplasts. **Plant Molecular Biology** 23:613–618.

Rethmeier N, Seurinck J, Montagu M Van, Cornelissen M (1997) Intron-mediated enhancement of transgene expression in maize is a nuclear, gene-dependent process. **Plant Journal** 12:895–899.

Rodrigues JC, Gama MIC dos S, Aragão FJL (2015) Análise de plantas transgênicas por reação em cadeia da polimerase (PCR). In.: Brasileiro ACM, Carneiro VTC (Eds.) **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, p. 181–198.

Romano E, Leal-Bertioli SCM (2015) Extração e quantificação de DNA de tecidos vegetais. In.: Brasileiro ACM, Carneiro VTC (Eds.) **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, p. 165–180.

Rossetto R, Santiago AD (2019) **Pragas no colmo - Broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*)**. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_131_272200817517.html>. Acesso em: 8 jul. 2019.

Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. In.: Krawetz S, Misener S (Eds.) **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology Humana Press**. Totowa, p. 365–386.

Schnepf E, Crickmore N, Rie J Van, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and molecular biology reviews** 62:775–806.

Schubert D, Lechtenberg B, Forsbach A, Gils M, Bahadur S, Schmidt R (2004) Silencing in *Arabidopsis* T-DNA Transformants: The Predominant Role of a Gene-Specific RNA Sensing Mechanism versus Position Effects. **the Plant Cell** 16:2561–2572.

Sena JAD, Hernández-Rodríguez CS, Ferré J (2009) Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. **Applied and environmental microbiology** 75:2236–2237.

Sijen T, Vijn I, Rebocho A, Blokland R Van, Roelofs D, Mol JNM, Kooter JM (2001) Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. **Current Biology** 11:436–440.

Stam M, Mol JNM, Kooter JM (1997) The Silence of Genes in Transgenic Plants. **Annals of Botany** 79:3–12.

Takumi S, Otani M, Shimada T (1994) Effect of six promoter-intron combinations on transient reporter gene expression in einkorn, emmer and common wheat cells by particle bombardment. **Plant Science** 103:161–166.

UNICA (2017) **Genetically modified sugarcane developed by CTC in Brazil is approved at CTNBio.** Disponível em: <<http://english.unica.com.br/news/16900437920334804993/genetically-modified-sugarcane-developed-by-ctc-in-brazil-is-approved-at-ctnbio>>. Acesso em: 31 dez. 2018.

Wang WZ, Yang BP, Feng XY, Cao ZY, Feng CL, Wang JG, Xiong GR, Shen LB, Zeng J, Zhao TT, Zhang SZ (2017) Development and Characterization of Transgenic Sugarcane with Insect Resistance and Herbicide Tolerance. **Frontiers in Plant Science** 8:1–10.

Weng LX, Deng H, Xu JL, Li Q, Wang LH, Jiang Z, Hai BZ, Li Q, Zhang LH (2006) Regeneration of sugarcane elite breeding lines and engineering of stem borer resistance. **Pest Management Science** 62:178–187.

Weng LX, Deng HH, Xu JL, Li Q, Zhang YQ, Jiang Z De, Li QW, Chen JW, Zhang LH (2011) Transgenic sugarcane plants expressing high levels of modified *cry1Ac* provide effective control against stem borers in field trials. **Transgenic Research** 20:759–772.

3. Capítulo 3 – Atividade inseticida contra *Spodoptera frugiperda* do sobrenadante livre células de alta estabilidade térmica produzido por *Burkholderia* sp.

3.1. Resumo

O objetivo deste trabalho foi prospectar e caracterizar novos isolados bacterianos pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia* com atividade inseticida contra *Spodoptera frugiperda* e iniciar a caracterização de suas moléculas ativas. Uma vez que a principal bactéria entomopatogênica utilizada para o controle de pragas o tem sido *Bacillus thuringiensis*, seu uso recorrente e falhas de manejo, tem proporcionado sucessivos casos de resistência às suas toxinas, o que torna necessária a prospecção de novos isolados e moléculas inseticidas. Neste sentido, foi realizada a avaliação da atividade inseticida de isolados de *Pseudomonas* e *Burkholderia*, confirmação do gênero por sequenciamento, caracterização da curva de crescimento, determinação da necessidade de utilização de células vivas e/ou em qual extrato celular encontra-se a atividade e avaliações sobre a natureza proteica ou não da substância ativa. Na prospecção de isolados ativos, destacou-se o B2 (*Burkholderia* sp. isolado 2) com 91% de mortalidade, o qual foi utilizado para as posteriores análises. Na curva de crescimento obteve-se que o cultivo bacteriano a partir de 24 horas proporcionou 100% de mortalidade. Para a avaliação dos extratos celulares, destacaram-se o meio completo, sobrenadante e meio completo aquecido a 60 °C por 2 horas, que proporcionaram 100% de mortalidade, desta forma não há necessidade de adição a dieta de células bacterianas viáveis para que ocorra o efeito, encontrando-se predominantemente a atividade inseticida secreta no meio de cultivo. O componente ativo do sobrenadante demonstrou possuir estabilidade frente a enzima pronase E, ao tratamento de 100°C por 30 minutos, a autoclave por 20 minutos e permaneceu no sobrenadante durante a extração proteica com acetona, o que indica não se tratar de uma proteína. Também a filtração em Millipore com 0,22 µm não alterou os resultados de mortalidade quando avaliada em larvas de *Spodoptera frugiperda*, indicando a ausência de microrganismos tais como bactérias e vírus. 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.

Palavras-chave: controle biológico, entomopatógenos, bioinseticidas, moléculas inseticidas

3.2. Introdução

O controle biológico destaca-se como uma alternativa promissora para a maior sustentabilidade da produção agrícola (Péchy-Tarr et al., 2008). As metodologias mais variadas são utilizadas e abrangem diferentes agentes microbianos (como bactérias, fungos, vírus), criação massal de organismos predadores e parasitoides naturais de insetos, nematoides entomopatogênicos, compostos naturais extraídos de plantas e semioquímicos (Ruiu, 2015).

Em relação aos bioinseticidas bacterianos, destacam-se vantagens como a segurança para organismos não alvo e ao homem, tendência a rápida biodegradação no meio ambiente, menores custos de desenvolvimento e compatibilidade com programas de manejo integrado de pragas (Chattopadhyay et al., 2017), fatores estes que resultaram em seu domínio em todo o mundo do mercado de biopesticidas (Glare et al., 2017).

Embora haja certa diversidade de gêneros e espécies bacterianas com atividade inseticida, há o predomínio da utilização de uma única espécie, *Bacillus thuringiensis*, que detém a maior parcela do mercado de bioinseticidas microbianos (Glare et al., 2012; Arthurs e Dara, 2019), este microrganismo tem sido a principal fonte de genes inseticidas para o desenvolvimento de plantas transgênicas. No entanto, devido a sua massiva utilização estão ocorrendo sucessivos casos de evolução da resistência de pragas, principalmente em plantas transgênicas (van Rensburg, 2007; Liu et al., 2010; Storer et al., 2010; Gassmann et al., 2011; Farias et al., 2014; Glare et al., 2017).

Frente a necessidade de integração de novas alternativas para o controle biológico de pragas, destacam-se os gêneros bacterianos *Pseudomonas* e *Burkholderia*. Atualmente mais de 250 espécies compõem o gênero *Pseudomonas*

(Parte, 2018), distribuídas por uma ampla gama de ambientes (Rangel et al., 2016), possui espécies classificadas desde patogênicas a humanos até benéficas a plantas (Flury et al., 2016).

No controle de pragas, trabalhos têm demonstrado seu potencial de utilização e identificado as moléculas envolvidas no processo, como as proteínas Fit de *Pseudomonas fluorescens* CHA0 e *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 (Ruffner et al., 2013); o cianeto de hidrogênio e diferentes tipos de lipopeptídeos cíclicos de *Pseudomonas protegens* CHA0, *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 e *Pseudomona* sp. CMR12a (Flury et al., 2017); de lipopeptídeos xantholysins A e B de *Pseudomonas* sp. DJ15 (Lim et al., 2017); de análogos de rizoxina, orfamida A e quitinase de *Pseudomonas protegens* Pf-5 (Loper et al., 2016). Além das proteínas IPD072A e PIP-47Aa que demonstraram ser também eficientes quando expressas por plantas de milho (Schellenberger et al., 2016; Wei et al., 2018).

O gênero *Burkholderia* atualmente com mais de 120 espécies (Parte, 2018) surgiu a partir da reclassificação de espécies anteriormente pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (Yabuuchi et al., 1992), e assim como este, demonstra grande potencial para aplicações biotecnológicas (Eberl e Vandamme, 2016). Embora ainda pouco explorado no controle biológico, foi identificada a influência da presença intestinal de *Burkholderia* sp. no número de ovos e no tempo da primeira ovoposição de *Riptortus pedestris* e a atividade inseticida da *Burkholderia cepacia* contra larvas de *Drosophila*. Outro interessante relato foi o isolamento e caracterização de uma nova espécie de *Burkholderia*, a *B. rinojensis* (isolado A396), que apresentou forte atividade inseticida e acaricida (Cordova-Kreylos et al., 2013). Atualmente o isolado A396 é o ingrediente ativo do bioinseticida Venerate® produzido pela Marrone® Bio Innovations nos Estados Unidos (Marrone Bio Innovations, 2019).

Assim, objetivou-se prospectar e caracterizar novos isolados bacterianos pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia* com atividade inseticida contra *Spodoptera frugiperda* e iniciar a caracterização das moléculas ativas.

3.3. Materiais e métodos

3.3.1. Isolados e condições de cultura

Foram utilizados 9 e 6 isolados dos gêneros *Burkholderia* e *Pseudomonas* respectivamente, estes foram obtidos a partir do isolamento de solo e encontravam-se armazenados no banco de isolados do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) (FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP), previamente haviam sido classificados por sequenciamento parcial do gene rRNA 16S. Os isolados encontravam-se armazenados em freezers -80°C do LBMP. Previamente à montagem do bioensaio, os isolados foram cultivados em meio Luria-Bertani (LB) a 30°C e 150 rpm por 36 horas. Utilizou-se para validação dos ensaios as seguintes testemunhas: meio LB estéril (controle negativo) e *B. thuringiensis* (Bt) HD125 (controle positivo) cultivado sob as mesmas condições.

3.3.2. Bioensaios com *Spodoptera frugiperda*

O bioensaio com *S. frugiperda* (posturas obtidas do Laboratório de Ecologia Aplicada – FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP) foram conduzidos com dieta artificial (Greene et al., 1976), em placas de poliestireno de 128 poços, (Cell Wells, Corning Glass Works), com aproximadamente 1 mL de dieta por poço. Sobre a superfície da dieta solidificada, foram adicionados 60 µL do cultivo bacteriano ou extratos em cada poço da placa, que possui área de 2 cm², cada parcela foi constituída de 16 poços.

Após a confecção dos tratamentos, aguardou-se até que o líquido adicionado estivesse completamente seco e em seguida uma lagarta neonata de *S. frugiperda* foi transferida para cada poço da placa e selada com adesivo. Posteriormente as bandejas foram transferidas para câmara climatizada com temperatura de 27 °C ± 2 e fotoperíodo de 14 horas de luz/10 horas de escuro. Decorrido sete dias foi verificada a mortalidade das lagartas.

3.3.3. Sequenciamento parcial do gene rRNA 16S

O isolado B2 foi submetido ao resequenciamento parcial do gene rRNA 16S, a fim de confirmar a identificação prévia de gênero *Burkholderia*. Foi realizada a extração do DNA total de acordo com o método descrito por Marmur (1961), análise de integridade do DNA por eletroforese em gel de agarose e quantificação por nanodrop (NanoDrop 1000 Spectrophotometer – Thermo Scientific). Posteriormente foi realizada a amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene rRNA 16S, fD1 (5'-CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G - 3') e rD1 (5'-CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC - 3') (Weisburg et al., 1991), o produto amplificado foi então analisado em sequenciador capilar modelo ABI 3100 – Perkin Elmer utilizando o kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing conforme recomendações do fabricante. As sequências obtidas foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos no banco de dados GenBank acessado através do “site” do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”), por meio da ferramenta BLAST local - “Basic Local Alignment Search Tools”.

3.3.4. Curva de crescimento e atividade inseticida

Para a curva de crescimento, o pré-inóculo bacteriano foi inoculado em frasco Erlenmeyer de 50 mL contendo 30 mL de meio LB e incubado a 30 °C e 150 rpm por 18 horas. Após este período, alíquotas do pré-inóculo foram transferidas para frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio LB até atingir a DO 0,015, este foi o ponto zero da curva. Em intervalos de 8 horas foram coletas alíquotas do meio e realizados os seguintes procedimentos: mensuração de densidade óptica a 600 nm (DO); determinação do número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), por meio de diluições seriadas e plaqueamento em meio LB sólido, com posterior incubação a 30°C por 24 horas, seguida da contagem do número de colônias formadas e verificação da atividade inseticida por meio da mortalidade de lagartas, conforme descrito no item “bioensaios com *Spodoptera frugiperda*”.

3.3.5. Identificação da atividade inseticida nos extratos

A fim de determinar em qual extrato celular encontra-se a atividade inseticida e/ou a necessidade de adição de células bacterianas vivas a dieta para a mortalidade, foram avaliados os seguintes extratos:

I. Meio LB – Meio LB estéril (controle negativo).

II. Meio completo – cultura bacteriana;

III. Sobrenadante (metabólitos secretados) – obtidos pela centrifugação da cultura bacteriana (30 minutos a 16.000 g, 4 °C) e filtração do sobrenadante em membrana de 0,22 µm;

IV. Células ressuspendidas – centrifugação da cultura bacteriana e ressuspensão do “pellet” ao volume original com meio LB, o procedimento foi repetido duas vezes;

V. Células lisadas – centrifugação da cultura bacteriana, idem item IV, com posterior ruptura celular do “pellet” por sonicação e resuspensão ao volume original com meio LB;

VI. Fração solúvel do lisado celular – o extrato de células lisadas total foi centrifugado e o sobrenadante obtido foi então submetido a filtração em membrana de 0,22 µm.

VII. Fração insolúvel do lisado celular - o extrato de células lisadas total foi centrifugado, e o “pellet” obtido foi então ressuspendido ao volume original com meio LB.

VIII. Meio completo aquecido a 60°C por 2 horas – para inativação das células bacterianas (Cordova-Kreylos et al., 2013).

Para confirmar a presença ou inativação de células bacterianas após os procedimentos, realizou-se a inoculação de placas contendo meio LB sólido com alça microbiológica dos tratamentos: meio completo, sobrenadante, células ressuspendidas, meio completo aquecido a 60°C por 2 horas.

Após a obtenção dos extratos foi verificado a atividade inseticida por meio da mortalidade de lagartas, conforme descrito no item “bioensaios com *Spodoptera frugiperda*”.

3.3.6. Caracterização inicial da molécula ativa

Após verificar que a atividade inseticida se encontra no sobrenadante bacteriano, este foi analisado para determinar sua natureza proteica ou não, realizaram-se diferentes métodos de extração de proteica, ensaios de estabilidade térmica e com enzima proteolítica.

Pronase E – ao sobrenadante foi adicionado 10 mg/mL de pronase E (Sigma-Aldrich, CAS Number 9036-06-0, mistura de enzimas proteolíticas obtida de *Streptomyces griseus*) e incubado por 1 hora a 37 °C.

Precipitação com sulfato de amônio (S.A.) – foi realizada seguindo o protocolo descrito por Duong-Ly & Gabelli (2014) com modificações, foi adicionado ao sobrenadante quantidade equivalente a 90% de saturação por sulfato de amônio, demais procedimento permaneceram inalterados. Após a precipitação, o pellet foi ressuspensionado ao volume original com meio LB.

Precipitação com acetona – foi realizada conforme o protocolo descrito por Pierce (2004), após a obtenção o “pellet”, este foi ressuspensionado ao volume original com meio LB, e o sobrenadante contendo a mistura de meio de cultivo e acetona, foi submetido a evaporação em capela para a eliminação da acetona. Posteriormente, ambas as frações (“pellet” e sobrenadante), foram utilizados nas análises.

Aquecimento – o sobrenadante foi aquecido a 100 °C por 30 minutos.

Autoclave – o sobrenadante foi autoclavado por 20 minutos, 121 °C e 1 atm.

LB controles – os procedimentos de tratamento com enzima proteolítica e de precipitação proteica realizados com o sobrenadante, foram também desenvolvidos com o meio LB, a fim de verificar a ocorrência de qualquer efeito nocivo ao bioensaio devido aos reagentes ou procedimentos adicionais.

Bt HD125 – como controle da inativação proteica por temperatura, uma alíquota do cultivo de Bt HD125 foi submetido ao aquecimento a 100 °C por 30 minutos, posteriormente, ambos, aquecido e não aquecido foram avaliadas por bioensaio. Para confirmar a presença ou inativação de células e esporos, realizou-se a inoculação em placas contendo meio LB sólido com alça microbiológica dos dois tratamentos.

Após a obtenção dos extratos foi verificado a atividade inseticida por meio da mortalidade de lagartas, conforme descrito no item “bioensaios com *Spodoptera frugiperda*”.

3.3.7. Eletroforese em SDS-PAGE corado com nitrato de prata

Amostras da “caracterização inicial da molécula ativa” foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE) (LAEMMLI, 1970) com o propósito de verificar a presença de bandas proteicas. Foi utilizado o gel de empacotamento na concentração de 5% e o de separação a 13% de poliacrilamida, cada poço do gel recebeu uma mistura composta por 55 µL de amostra e 15 µL de tampão de amostra. Após o período a migração, a revelação das proteínas presentes no gel foi realizada com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Blum, Beier & Gross (1987).

3.4. Resultados e discussão

3.4.1. Atividade inseticida dos isolados e confirmação de gênero

Na análise da atividade inseticida (Figura 1), observa-se que houve variação no desempenho dos isolados avaliados, dentre estes destacou-se o B2 (*Burkholderia* sp. isolado 2), que apresentou 91% de mortalidade. Os demais isolados avaliados não diferiram significativamente do controle negativo (meio LB), e o controle positivo (Bt HD125), como esperado, proporcionou 100% de mortalidade.

No resequenciamento parcial do gene rRNA 16S do isolado B2 e consulta da sequência no banco de dados GenBank, foi confirmada a similaridade do isolado com o gênero *Burkholderia*.

A diversidade e eficácia de metabolitos secundários produzidos por bactérias variam entre as espécies e até mesmo dentro de uma mesma espécie (Eroglu et al., 2019), assim, torna-se necessária e promissora as recorrentes prospecções em novos isolados para utilização no biocontrole. Devido à alta porcentagem de mortalidade obtida com o isolado B2, procederam-se as demais análises com este.

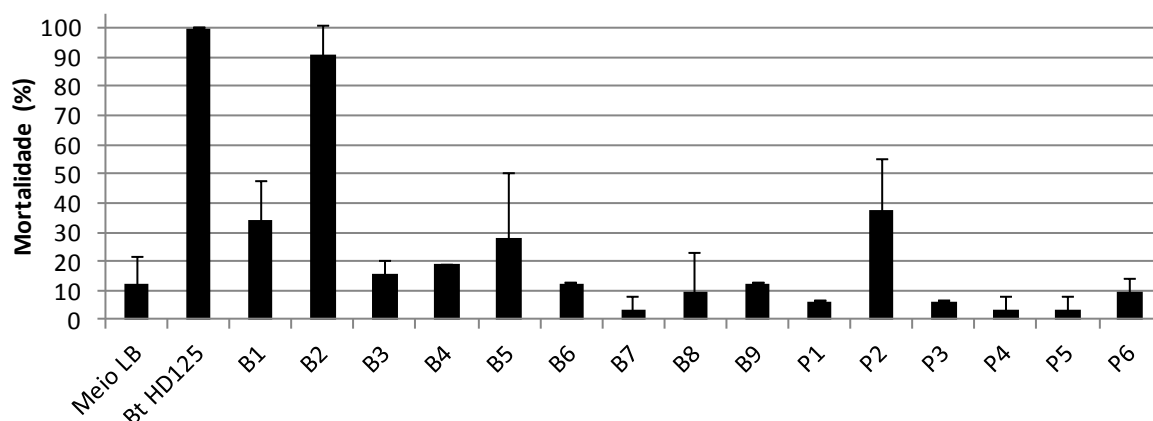


Figura 1. Mortalidade de lagartas neonatas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial tratada com isolados de *Burkholderia* (B) e *Pseudomonas* (P); meio LB, controle negativo; *B. thuringiensis* (Bt) HD125, controle positivo, n = 2. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

3.4.2. Caracterização da curva de crescimento

Observa-se na curva de crescimento (Figura 2) desenvolvida com o isolado B2 que houve constante incremento da DO no período, enquanto a UFC/mL aumentou até 40 horas de cultivo, quando atingiu $1,95 \times 10^9$ UFC/mL, e, posteriormente, decresceu. Com relação a mortalidade, no controle negativo (meio LB) e até 8 horas de cultivo do isolado não se observaram efeitos, as 16 horas de cultivo, embora não tenha ocorrido aumento da mortalidade, as lagartas apresentaram subdesenvolvimento. A partir de 24 horas até o final do período de avaliação, se observou 100% de mortalidade, com isso, visando atingir o crescimento bacteriano que propiciasse 100% de mortalidade, padronizou-se para as demais avaliações que o isolado seria cultivado até que atingisse a DO 5,5.

A caracterização da curva de crescimento e sua reposta na mortalidade apresentam variação entre os diferentes gêneros e espécies, para a *Burkholderia cepacia*, avaliada contra larvas de *Drosophila*, atingiu-se a máxima mortalidade (80%) com dois dias de cultivo, a qual posteriormente decresceu até atingir zero com 4 dias de cultivo, a DO apresentou comportamento semelhante ao da mortalidade, com valor máximo aos 2 dias e posterior decréscimo (Hsu et al., 2014). Para *Pseudomonas tamsuii* avaliada em diferentes meios de cultivo ao longo de 5 dias, também contra *Drosophila*, observaram-se diferentes taxas de crescimento e

mortalidade entre os meios avaliados e tendência crescente de mortalidade e DO, sendo que somente a DO apresentou leve declínio nos últimos dias de cultivo. Além destes resultados, também observou-se drástica alteração na mortalidade em função de mudanças na temperatura durante o cultivo da bactéria (Liang et al., 2015). Resultados como estes reforçam a necessidade da caracterização do crescimento bacteriano previamente à condução das análises.

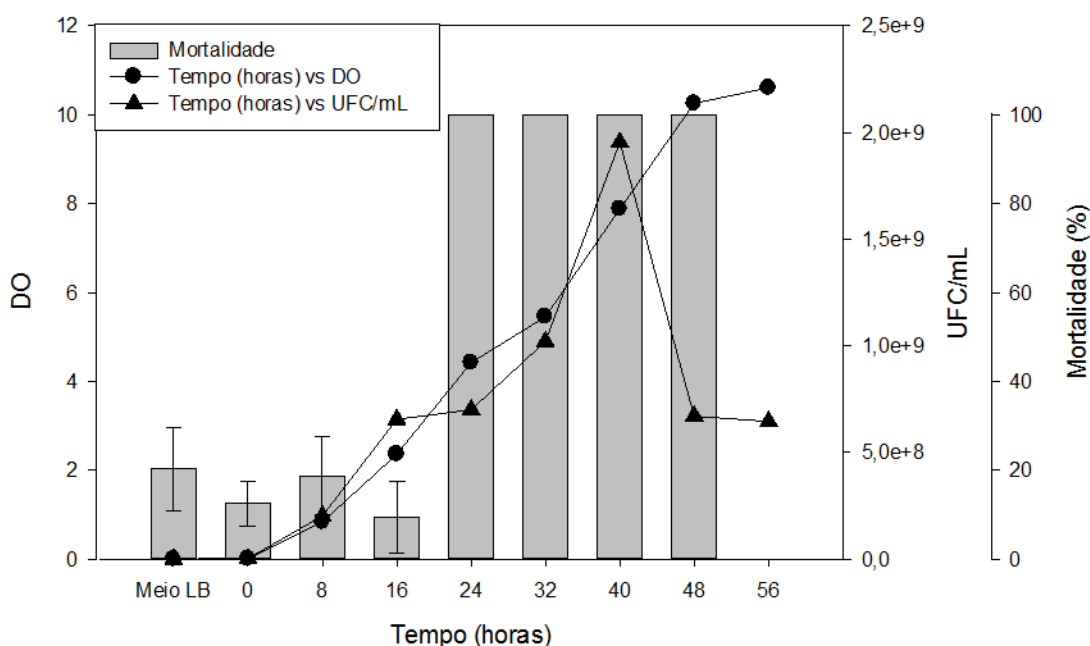


Figura 2. Caracterização da curva de crescimento do isolado B2 pela determinação da densidade óptica (DO) e unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) por 56 horas, e mortalidade de lagartas neonatas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial tratada com o isolado, por 48 horas; Meio LB, controle negativo, n = 4. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

3.4.3. Identificação de atividade inseticida nos extratos

Na determinação do(s) extrato(s) ativo(s) e necessidade de adição de células bacterianas vivas na dieta para a atividade inseticida (Figura 3), obteve-se que células ressuspendidas, células lisadas, fração solúvel do lisado e fração insolúvel do lisado, apresentaram baixas taxas de mortalidade, embora as células ressuspendidas tenham causado o subdesenvolvimento das lagartas (Figura 4). O meio completo, sobrenadante, e meio completo aquecido a 60 °C por 2 horas

proporcionaram 100% de mortalidade. Com isso observou-se que não há necessidade de adição à dieta de células bacterianas viáveis para que ocorra a mortalidade, e que a molécula ativa se encontra predominantemente secretada no meio de cultivo.

Quanto à confirmação da viabilidade ou inativação de células bacterianas após os procedimentos, obteve-se que o meio completo e células ressuspendidas (Figura 5 **a** e **d**) apresentaram crescimento celular, enquanto o sobrenadante e meio completo aquecido a 60°C por 2 horas (Figura 5 **c** e **b**) não o demonstraram.

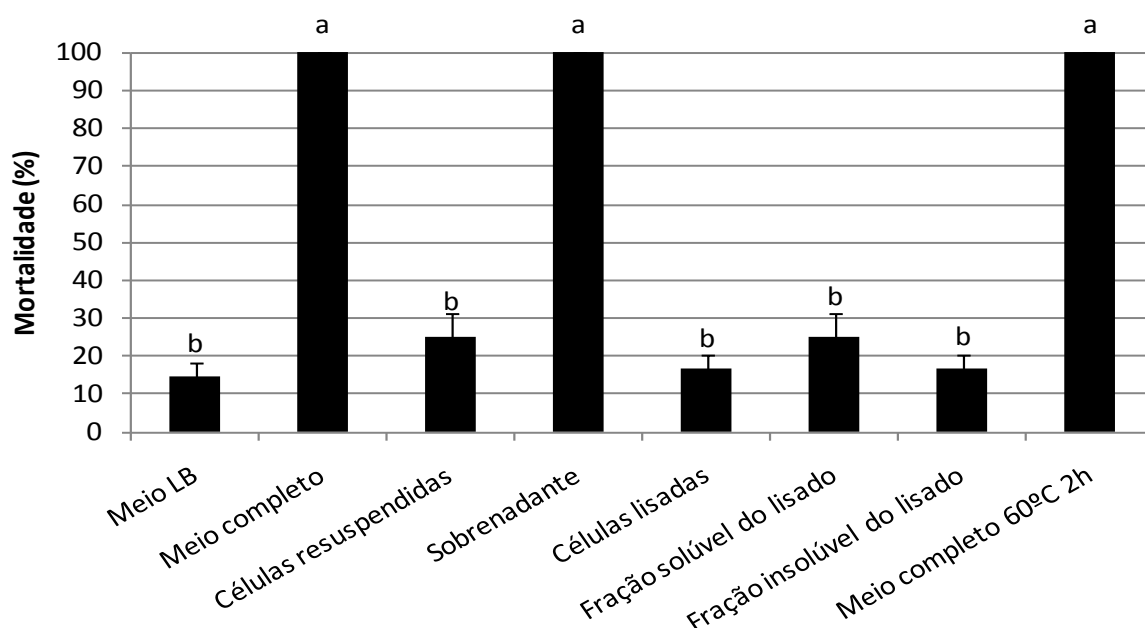


Figura 3. Mortalidade de lagartas neonatas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial tratada com diferentes extratos celulares e tratamento térmico, obtidos a partir do isolado B2; Meio LB, controle negativo. Valores acompanhados de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de significância, $n = 3$. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

Para *Burkholderia rinojensis*, obteve-se menores taxas de mortalidade de larvas de *Spodoptera exigua* quando utilizado o sobrenadante livre de células em comparação ao uso do meio com células inteiras, ambos diluídos entre 0,5 a 4%, o que segundo os autores pode ter ocorrido devido a retenção de componentes ativos associados as célula bacterianas durante o processo de filtração (Cordova-Kreylos et al., 2013). Ainda neste estudo foi realizado o tratamento térmico sob as mesmas condições aplicadas ao isolado B2, como resultados obtiveram a ausência de

células vivas e mínima perda de atividade inseticida, o que evidenciou a estabilidade térmica dos componentes ativos. Estes resultados demonstram a não essencialidade de células vivas para a atividade inseticida, semelhante ao que ocorreu com o isolado B2.

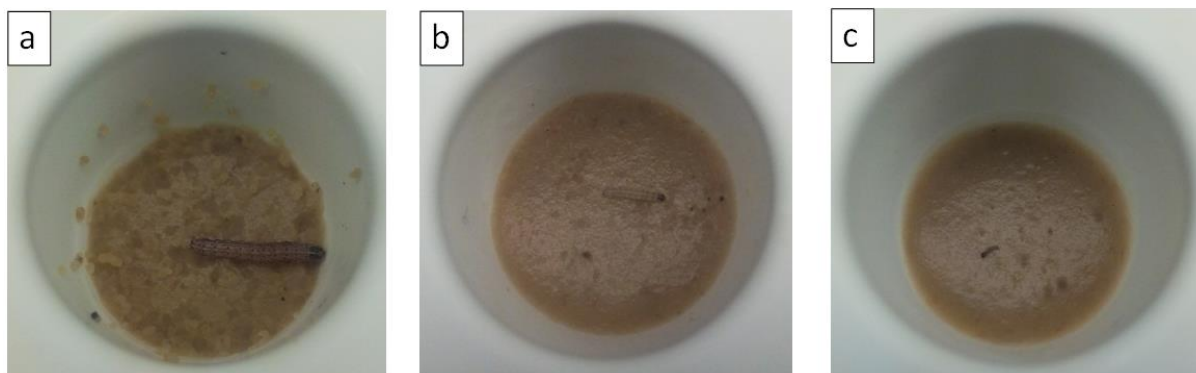


Figura 4. Bioensaio com lagartas de *S. frugiperda* após 6 dias de alimentação em dieta artificial tratada com: a - meio LB (controle negativo), desenvolvimento normal; b - células ressuspendidas, subdesenvolvimento e c - sobrenadante, lagarta morta.

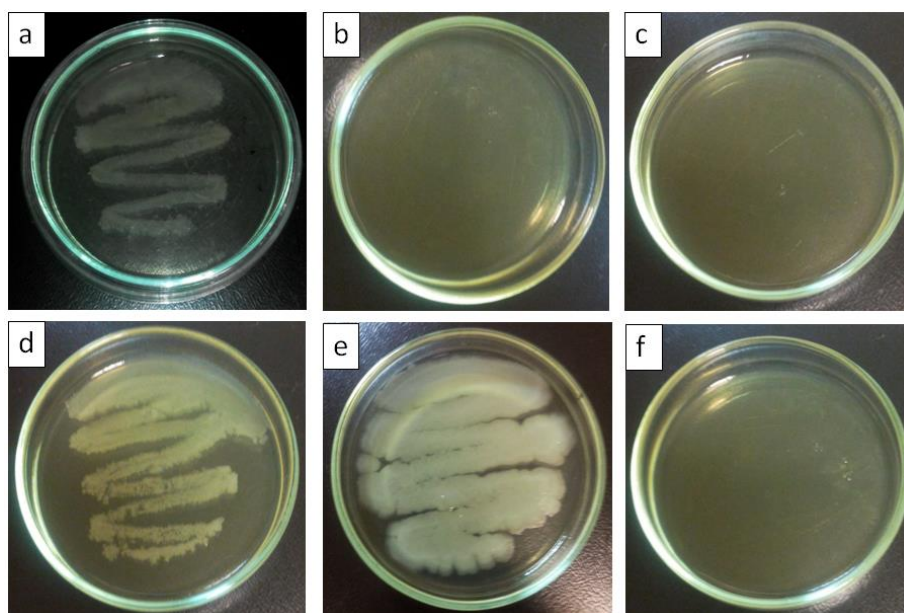


Figura 5. Inoculação em placa contendo meio LB sólido com alça microbiológica: a - B2, meio completo; b - B2, meio completo aquecido a 60°C por 2 horas; c - B2, sobrenadante; d - B2, células ressuspendidas (Item IV); e - *B. thuringiensis* (Bt) HD125; f - Bt HD125 aquecido a 100 °C por 30 minutos.

Na avaliação da *Pseudomonas taiwanensis*, células inteiras ressuspendidas em PBS e ajustada para DO entre 0,5 e 2,0 apresentaram de 92,7 a 94,5% de

mortalidade de *P. xylostella*, enquanto seus extratos celulares (células lisadas, lisado insolúvel, lisado solúveis e proteínas secretadas), promoveram entre 31,3 e 67,3% de mortalidade (Chen et al., 2014), o que diverge parcialmente dos resultados obtidos para o isolado B2 e ressalta a variabilidade de mecanismos de ação que podem ser desenvolvidos pelos organismos entomopatogênicos.

Outros trabalhos têm focado somente no conteúdo intracelular, tendo em vista que utilizaram na prospecção inicial da atividade o lisado celular ou as proteínas extraídas a partir do pellet de células (Schellenberger et al., 2016; Yalpani et al., 2017; Wei et al., 2018). Estes identificaram como responsáveis pela mortalidade moléculas inseticidas proteicas.

3.4.4. Caracterização inicial da molécula ativa

Na caracterização inicial da molécula (Figura 6), o “pellet” obtido na precipitação do sobrenadante com sulfato de amônia (S.A.) promoveu 100% de mortalidade e perfil proteico (Figura 7) semelhante ao do sobrenadante, o que demonstra que o método foi eficaz em precipitar as proteínas presentes no meio e a molécula ativa.

Para a extração com acetona, o sobrenadante resultante do método apresentou 100% de mortalidade e presença de uma banda com massa molecular inferior a 15 kDa e de baixa intensidade, no entanto, esta banda também estava presente no “pellet” da extração, o qual não gerou mortalidade, a tornando improvável de ser a molécula ativa. O meio LB quanto aplicado diretamente ou submetidos aos métodos de precipitação não apresentaram qualquer banda proteica.

No tratamento com a enzima pronase E, embora tenha sido observada sua atividade pela modificação do perfil proteico, houve 100% mortalidade, isso demonstra que a molécula ativa não foi inativada pela enzima.

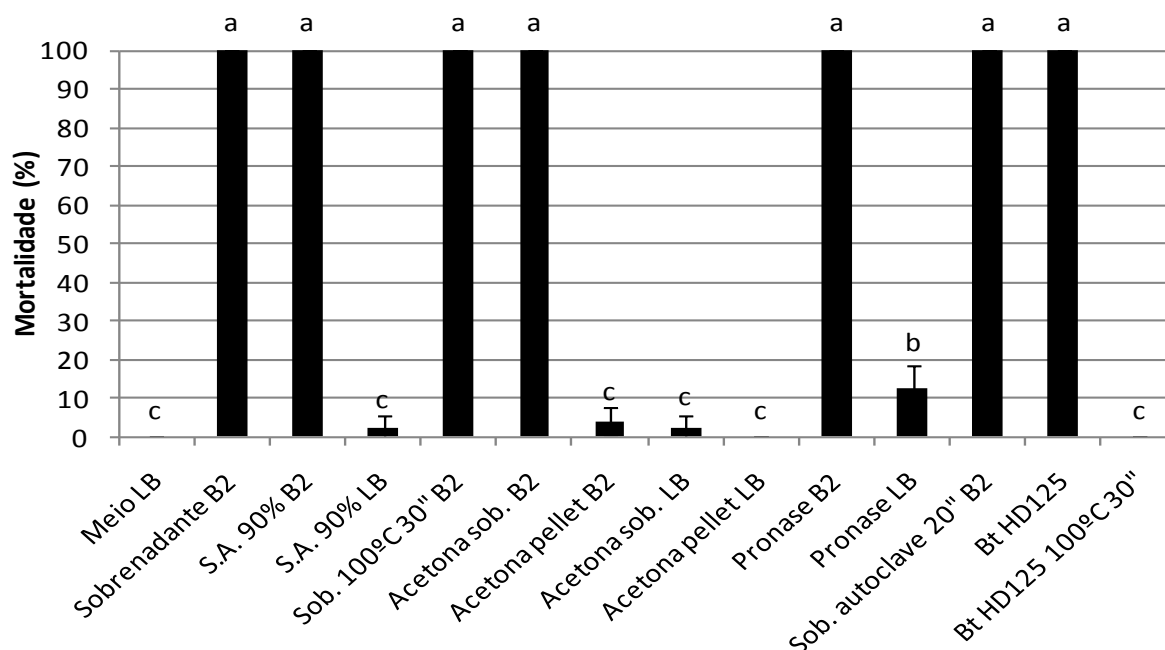


Figura 6. Caracterização inicial da molécula ativa secretada pelo isolado B2 por precipitação com sulfato de amônio (S.A.) e acetona, tratamento com pronase E e térmico, além do controle positivo Bt HD125 e seu tratamento térmico sobre a mortalidade de lagartas neonatas de *S. frugiperda*. Valores acompanhados de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de significância, $n = 3$. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

Para todos os métodos de extração e tratamentos anteriormente citados, quando realizados com o uso meio LB (controle negativo), houve baixos níveis de mortalidade, o que indica a ausência de efeitos nocivos aos bioensaios devido ao emprego dos reagentes ou procedimento.

Nos tratamentos térmicos do sobrenadante, os elevados níveis de mortalidade foram mantidos mesmo após aquecimento a 100°C por 30 minutos ou autoclave a 121°C por 20 minutos, o que demonstra que a molécula ativa é termo resistente. Enquanto o Bt HD125 apresentou a completa perda de atividade após aquecimento a 100°C por 30 minutos, isto justifica-se já que a ocorrência de mortalidade em lagartas após a ingestão de cultivos de *B. thuringiensis* é atribuída a sua capacidade de produzir proteínas inseticidas durante a fase de esporulação (Bravo et al., 2005). Na confirmação da presença de células viáveis por plaqueamento em meio sólido do Bt HD125, obteve-se que quando não submetido ao aquecimento apresenta crescimento celular, no entanto, após o tratamento térmico ocorreu sua inativação (Figura 5 e e f). Com isso, ao analisar os resultados

obtidos na precipitação com acetona, no tratamento com enzima proteolítica e de estabilidade térmica, temos indicativos que a molécula ativa não é de natureza proteica.

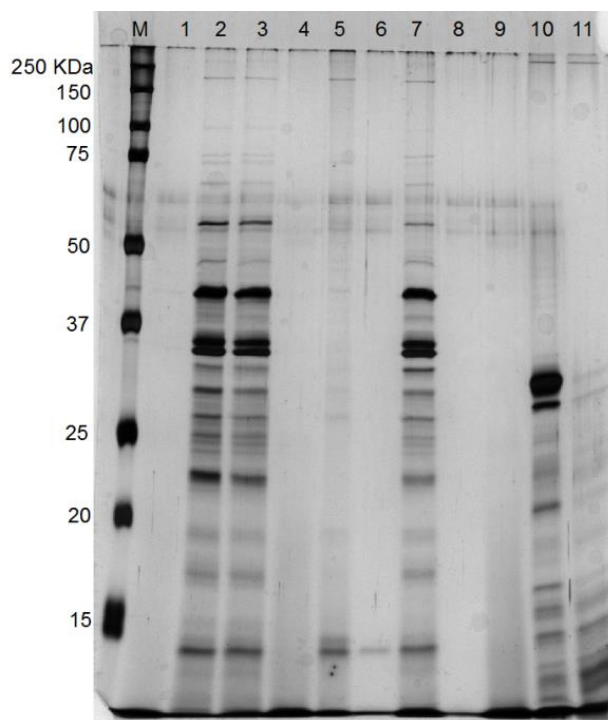


Figura 7. Perfil protéico em SDS-PAGE corado com nitrato de prata de: M - marcador proteico; 1 - Meio LB; 2 - B2, sobrenadante (metabolitos secretados); 3 - B2, “pellet” da precipitação com sulfato de amônia a 90%; 4 - LB, “pellet” da precipitação com sulfato de amônia a 90%; 5 - B2, sobrenadante aquecido a 100°C por 30 minutos; 6 - B2, sobrenadante da precipitação com acetona; 7 - B2, “pellet” da precipitação com acetona; 8 - LB, sobrenadante da precipitação com acetona; 9 - LB, “pellet” da precipitação com acetona; 10 - B2, tratamento com pronase E; 11 - LB, tratamento com pronase E.

A utilização de enzimas proteolíticas e aquecimento são estratégias amplamente utilizadas em caracterizações iniciais de extratos ativos para determinar se a molécula inseticida é proteica, esta informação é crucial para a escolha dos métodos a serem posteriores empregados na purificação e identificação do componente ativo. Neste sentido, o tratamento de um extrato ativo de *Pseudomonas mosselii* com proteinase K e temperatura resultou na perda de atividade inseticida, com a continuidade das análises neste mesmo trabalho foi identificada a proteína PIP-47Aa (Wei et al., 2018).

No entanto, há também situações em que é provável que haja a atuação de ambos os tipos de moléculas, em *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* SL0708, após o tratamento do extrato ativo com proteinase K houve drástica redução da mortalidade de *G. mellonella* e *S. frugiperda*. Porém, observou-se ainda baixos níveis de mortalidade, o que indica haver o predomínio de componente(s) proteico(s), porém, é possível que não exclusivamente (Salazar-Gutiérrez et al., 2017).

Na elucidação de novas moléculas inseticidas não proteicas no gênero *Burkholderia*. Para *B. rinojensis* (isolado A396), classificada como uma nova espécie, o aquecimento de seu meio causou mínima perda da atividade inseticida, o que em um primeiro momento possibilitou atribuir ao componente ativo estabilidade térmica (Cordova-Kreylos et al., 2013). Com a utilização de sucessivas purificações por cromatografia acompanhada de ensaios de atividade biológica, identificou-se a produção dos compostos templamida A e B, FR901465 e FR901228 com propriedades inseticidas (Patente nº US 9,701,673 B2). Atualmente o cultivo bacteriano do isolado A396, que tem suas células inativadas por calor, é o ingrediente ativo do bioinseticida Venerate® produzido pela Marrone® Bio Innovations nos Estados Unidos (Marrone Bio Innovations, 2019).

A avaliação do sobrenadante livre de células de 6 espécies dos gêneros bacterianos *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, ambos simbioses de nematoides entomopatogênicos, demonstrou potencial para controle do ácaro *Tetranychus urticae*. Destacaram-se os sobrenadantes das espécies *X. szentirmaii* e *X. nematophila*, que resultaram em elevada taxa de mortalidade para vários estágios de desenvolvimento da praga, exceto para a fase de ovo. As demais espécies avaliadas embora também tenham causado efeitos significativos, apresentaram menor eficiência (Eroglu et al., 2019). Estudos como este ressaltam a variabilidade e amplo potencial de gêneros e espécies bacterianas a serem explorados como fonte de moléculas para o biocontrole.

Vários dos avanços relacionados ao controle biológico estão ocorrendo em um período em que sucessivos casos de evolução da resistência de pragas a toxinas proteicas e inseticidas químicos estão sendo relatados. Com isso, a medida que as alternativas químicas tornam-se mais limitadas, métodos baseados no

controle biológico ganham cada vez mais mercado (Chattopadhyay et al., 2017). A esta situação, agrega-se ainda as vantagens dos biopesticidas serem considerados mais seguros ao meio ambiente específicos para a praga alvo, eficazes em pequenas quantidades e de rápida decomposição no meio ambiente, o que reduz as possibilidades de ocorrência de resíduos problemáticos (Damalas e Koutroubas, 2018). Outro destaque dos biopesticidas em comparação aos químicos, encontra-se nas facilidades de registro nas agências regulatórias, que tem sido em países como os Estados Unidos, mais rápidos, menos dispendiosos e complexos (Braverman, 2010).

Este conjunto de características favorece o constante aumento do mercado de produtos biológicos, segundo a DunhamTrimmer, empresa especializada em pesquisa de mercado global de produtos biológicos. Atualmente o biocontrole detém aproximadamente 5% do mercado de proteção de plantas, com taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 17%, enquanto o mercado convencional encontra-se com CAGR abaixo de 6% a estagnado (DunhamTrimmer, 2018).

Como relatado, vários trabalhos recentes obtiveram sucesso na prospecção de novos isolados e suas moléculas, dos quais alguns já se consolidaram como inovadores produtos comerciais para o controle de pragas, isso demonstra o vasto potencial ainda inexplorado dos microrganismos. Neste sentido, também é notável a aptidão biotecnológica do gênero *Burkholderia*, sendo conhecida sua capacidade de secreção de enzimas com atividades proteolítica, lipolítica e hemolítica, além de toxinas, antibióticos e sideróforos (Campbell, 2007).

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.