

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

**TAXONOMIA DE BACTÉRIAS NÃO ESPORULANTES  
TESTADAS NO CONTROLE BIOLÓGICO CONTRA A  
*Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)**

**Mariana Davanzo Miranda**  
Engenheira Agrônoma

**2020**

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

**TAXONOMIA DE BACTÉRIAS NÃO ESPORULANTES  
TESTADAS NO CONTROLE BIOLÓGICO CONTRA A  
*Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)**

**Mariana Davanzo Miranda**

**Orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza**

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

**2020**

M672t Miranda, Mariana Davanzo  
Taxonomia de bactérias não esporulantes testadas no controle biológico contra a Spodoptera frugiperda (J.E. SMITH) / Mariana Davanzo Miranda. -- Jaboticabal, 2020  
58 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal  
Orientador: Jackson Antônio Marcondes de Souza

1. Controle biológico. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

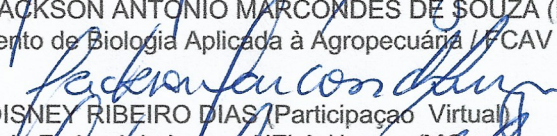
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: TAXONOMIA DE BACTÉRIAS NÃO ESPORULANTES TESTADAS NO CONTROLE BIOLÓGICO CONTRA A *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)

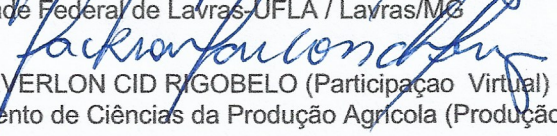
**AUTORA: MARIANA DAVANZO MIRANDA**

**ORIENTADOR: JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA**

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

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

  
Prof. Dr. DISNEY RIBEIRO DIAS (Participação Virtual)  
Universidade Federal de Lavras-UFLA / Lavras/MG

  
Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELO (Participação Virtual)  
Departamento de Ciências da Produção Agrícola (Produção Vegetal) / FCAV - UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 30 de novembro de 2020

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

Mariana Davanzo Miranda, nascido no dia 30 de março de 1993 na cidade de Ribeirão Preto – SP. Graduada em Engenharia Agrônômica, pela Universidade do Estado de São Paulo, Campus de Jaboticabal-SP. Durante a graduação foi estagiária no Departamento de Fitossanidade e Nutrição de Plantas. Participou do projeto de monitoria na matéria disciplinar: Doenças em Grandes Culturas (2016). Atualmente é mestranda no programa de Microbiologia Agropecuária, com dedicação exclusiva, na Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal (UNESP - FCAV), atuando na linha de pesquisa Genética Molecular de Microrganismos. Tem experiência na área de microbiologia geral. Desenvolve pesquisas na área de Microbiologia Agropecuária, principalmente nos seguintes temas: controle biológico de grandes pragas e prospecção de microrganismos entomopatogênicos.

*“A verdadeira viagem de descobrimento  
não consiste em procurar novas  
paisagens, mas ter novos olhos.”*

(Marcel Proust)

Dedico este trabalho a minha Mãe Rita, meu Pai André e toda minha família que nunca mediram esforços para que eu conseguisse alcançar meus objetivos, sempre me amparando e dando forças para continuar em todos os momentos.

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

Dedico todo apoio da Universidade Estadual Paulista por permitir o respaldo necessário por todos esses anos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por estar ao meu lado sempre e me capacitando dia a dia por esse trabalho.

A minha mãe Rita e meu pai André que, com muito carinho e atenção sempre esteve ao meu lado para ajudar com o que fosse necessário.

A toda minha família pela força e incentivo que me deram para fazer com que eu chegasse aqui.

Ao Higor, meu companheiro de mestrado e de laboratório que esteve dia a dia comigo durante essa fase.

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

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

Ao Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada e a Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério por me conceder a estrutura e materiais utilizados durante a realização do projeto.

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

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

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

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

Aos amigos que fiz e carrego em meu coração.

Ao Programa de Pós-Graduação de Microbiologia Agropecuária por todo apoio e incentivo que tive durante esses anos de mestrado.



## RESUMO

A análise completa do gene *16S rRNA* de alguns isolados bacterianos não-esporulantes do solo nos levou a uma confiável classificação taxonômica, permitindo explorar seu potencial entomopatogênico contra inseto-praga *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho). Muitos estudos mostraram o rápido desenvolvimento de resistência da *S. frugiperda* em relação aos métodos que vem sendo utilizados nas últimas décadas. Sendo assim, torna-se importante novas pesquisas que explorem o potencial de novos isolados do solo. Com isso, um estudo comparativo entre a classificação completa e parcial, previamente determinada, do gene *16S rRNA* foi a base para realizar bioensaios comparativos com bactérias esporulantes, do tipo *Bacillus thuringiensis* (Bt), e o produto Dipel®. Os resultados mostraram que não existem diferenças significativas utilizando esses isolados bacterianos, pois em todos os bioensaios as lagartas se desenvolveram normalmente até a fase adulta, demonstrando a forte resistência da lagarta-do-cartucho. Os dados obtidos foram comparados com demais autores que citam essa resistência, associada a um alelo de resistência presente nos membros da Ordem Lepidoptera. De acordo com os resultados, novas pesquisas devem ser feitas com novos isolados bacterianos a fim de descobrir seu potencial para controlar *S. frugiperda*, auxiliando assim o *B. thuringiensis* no controle das pragas.

**Palavras-chave:** *Zea mays*. *Spodoptera frugiperda*. *16S rRNA*. Controle biológico.

## ABSTRACT

A complete analysis of the *16S rRNA* gene of some non-sporulating bacteria in the soil led to a reliable taxonomic classification, allowing to explore its entomopathogenic potential against insect pest *Spodoptera frugiperda* (cartridge caterpillar). Many studies show the rapid development of resistance of *S. frugiperda* in relation to the methods that have been used in recent decades. Therefore, new research that explores the potential for new soil gains becomes important. Thus, a comparative study between a complete and partial classification, provided, of the *16S rRNA* gene was a basis for carrying out comparative bioassays with sporulating bacteria, type *Bacillus thuringiensis* (Bt), and the product Dipel®. The possible results are that there are no relevant differences using these bacteria, because in all bioassays as caterpillars they normally developed until adulthood, demonstrating a strong resistance of the caterpillar. The collected data were compared with other authors who cite this resistance, associated with a resistance allele present in the members of the Order Lepidoptera. According to the results, further research must be done with new bacteria in order to discover their potential to control *S. frugiperda*, thus assisting *B. thuringiensis* in pest control.

**Keywords:** *Zea mays*. *Spodoptera frugiperda*. *16S rRNA*. B-iological control.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Bt:** Bacillus thuringiensis

**FeSO<sub>4</sub>:** Sulfato de Ferro

**Mg SO<sub>4</sub>:** Sulfato de Magnésio

**MIP:** Manejo Integrado de Pragas

**MnSO<sub>4</sub>:** Sulfato de Manganês

**NaCl:** Cloreto de Sódio

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**PCR:** Reação em Cadeia de Polimerase

**PEG:** Polietileno Glicol

**PVC:** Policloreto de Vinila

**SDS:** Dodecil Sulfato de Sódio

**TY:** Tryptone-Yeast

**ZnSO<sub>4</sub>:** Sulfato de Zinco

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências similares de 16S rRNA com base no banco de dados Gen Bank.....	31
Tabela 2 - Bioensaio de teste da mortalidade de Spodeoptera frugiperda usando os isolados não esporulantes.....	35
Tabela 3 - Bioensaio de teste de mortalidade de <i>S. frugiperda</i> usando as linhagens selvagens de <i>B. thurigiensis</i> seguidos dos respectivos pesos das lagartas comparadas com a testemunha (H <sub>2</sub> O).....	36
Tabela 4 - Bioensaio de teste avaliando peso das pupas de <i>S. frugiperda</i> utilizando esporos de linhagens selvagens de <i>Bt</i> .....	37
Tabela 5 - Bioensaio de teste entre o peso e pupas <i>S. frugiperda</i> utilizando Dipel®.....	38

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1 - Localização geográfica dos sítios de coleta na Fazenda Itaquere, Nova Europa/SP, Brasil. (A) Região correspondente a Usina Santa Fé S.A, com área de plantio. (B) Detalhe do canal mestre de distribuição de vinhaça.....22**

**Figura 2 - Dendrograma evidenciando os isolados do solo parcialmente caracterizados por Almeida (2017). Ramo A: representa o gênero Bacillus; Ramo B: Acinetobacter; Ramo C: Chromobacterium e ramo D: gêneros Arthrobacter, Corynebacterium e Sinomonas.....23**

**Figura 3 - Avaliação do DNA genômico extraído dos cinco isolados não esporulantes, através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. MM-padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®).....29**

**Figura 4 - Avaliação do produto de PCR dos cinco isolados não esporulantes e através de eletroforese em gel de agarose 1%. P-padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®).....30**

**Figura 5 - Dendrograma evidenciando os isolados não esporulantes LGA-V20G, LGA-V05D, LGA-V20B e LGA-EV05 usando o método de Neighbor Joining (SAITOU; NEI, 1987). Foram realizados 1000 “bootstrap”.....33**

**Figura 6 - Dendrograma evidenciando os isolados não esporulantes LGA-EV08 usando o método de Neighbor Joining (SAITOU; NEI, 1987).....34**

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	A cultura do milho ( <i>Zea mays</i> ): características gerais.....	15
2.2	Inseto-praga: <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).....	15
2.3	Controle biológico.....	16
2.4	O gene <i>16S RNA</i> .....	18
3	OBJETIVOS.....	20
3.1	Objetivos Gerais.....	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1	Origem e manutenção dos isolados bacterianos não esporulantes.....	21
4.2	Extração de DNA e amplificação do gene <i>16S rRNA</i> .....	22
4.3	Sequenciamento dos amplicons <i>16S rRNA</i> .....	25
4.4	Análises das assinaturas moleculares dos isolados bacterianos através de bioinformática.....	26
4.5	Obtenção, criação e manutenção de <i>S. frugiperda</i> .....	26
4.6	Preparo e bioensaio das suspensões bacterianas não esporulantes.....	27
4.7	Preparo e bioensaios com bactérias esporulantes.....	28
4.8	Análise de resultados.....	28
5	RESULTADOS.....	29
5.1	Qualidade do DNA genômico.....	29
5.2	Qualidade da purificação do produto da PCR.....	29
5.3		

	<b>Análise de isolados bacterianos por sequenciamento total do gene</b>	<b>30</b>
	<b>16S rRNA.....</b>	
<b>5.4</b>		
	<b>Filogenia bacteriana dos isolados com base no sequenciamento</b>	<b>32</b>
<b>5.5</b>	<b>parcial 16S rRNA.....</b>	<b>35</b>
<b>5.6</b>	<b>Mortalidade da <i>S. frugiperda</i>.....</b>	
	<b>Mortalidade da <i>S. frugiperda</i> na fase lagarta com isolados</b>	<b>35</b>
<b>5.7</b>	<b>esporulantes.....</b>	
	<b>Mortalidade da <i>S. frugiperda</i> na fase pupa com isolados</b>	<b>36</b>
<b>5.8</b>	<b>esporulantes.....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>Mortalidade da <i>S. frugiperda</i> utilizando Dipel®.....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

O milho tem assumido um importante papel socioeconômico no Brasil, colocando-se em posição de destaque no que se refere a valor da produção agropecuária, área plantada e volume produzido, em especial nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) sua produção na safra 2017/18 foi de 461,2 kg por hectares e uma área em torno de 11,57 milhões de hectares (CONAB, 2018).

Os danos causados por pragas podem comprometer o rendimento e a qualidade dos grãos, ocasionando sérios prejuízos para os agricultores (SILVA *et al.*, 2016). Na maioria dos casos são utilizados produtos fitossanitários, e mesmo assim continua-se observando grandes perdas nas culturas. E com isso, muitas pragas estão expressando resistência tanto aos produtos químicos quanto as plantas geneticamente modificadas. Um exemplo são as doses de produtos fitossanitários aplicados além do recomendado, como uma tentativa de controlar as pragas que ocorrem (FIGUEIREDO; MARTINS-DIAS; CRUZ, 2006).

Popularmente conhecida como, lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) é considerada umas das pragas que mais causam perdas na cultura do milho, podendo chegar a 100% lavoura (MICHELOTTO *et al.*, 2011). As larvas de *S. frugiperda* se alimentam de folhas de milho reduzindo assim sua capacidade fotossintética e sua produção por causa de danos as estruturas reprodutivas (WAQUIL *et al.*, 2016). Essa praga tem enfrentado a ação dos mecanismos de produtos químicos na forma de resistência. Entretanto, a situação tornou-se mais complicada com a resistência de *S. frugiperda* a piretróides, organofosforados, carbamatos, neonicotinóides e crescimento de reguladores (YU, 2008).

Com todas essas dificuldades em controlar o inseto-praga e manter a produção elevada, a busca por meios mais seletivos a praga-alvo e menos agressivos ao meio ambiente estão sendo cada vez mais procurados (BOBROWSKI *et al.*, 2003). Entre um dos meios, as associações entre o controle químico e biológico têm grande importância, o chamado manejo integrado de pragas (MIP), que combina várias estratégias de controle de pragas, diminuindo também os gastos excessivos com defensivos na cultura (EMBRAPA, 2011).

Uma das bactérias amplamente utilizada para essa finalidade é o *Bacillus thuringiensis*, encontrada naturalmente no solo e muito usada nas plantas



geneticamente modificadas, conhecidas como plantas Bt. O controle biológico com a utilização de *B. thuringiensis* tem sido uma ferramenta promissora, por conta do desenvolvimento de uma proteína na forma de cristais, com função bioinseticida. A ação patogênica ocorre após a ingestão dos cristais, através da alimentação dos insetos a partir dos tecidos das plantas. E essas proteínas interagem no intestino do inseto levando a lise celular e conseqüentemente a morte (RUIU, 2015).

O *B. thuringiensis* tem sido utilizado em torno de duas décadas, e nesse curto espaço de tempo foram encontradas quatro espécies resistentes aos híbridos de milho (TABASHNIK *et al.*, 2014), sendo uma delas a lagarta do cartucho (STORER *et al.*, 2010). E com isso, as descobertas de novos isolados do solo que poderiam ter a mesma função do Bt, seriam de grande ajuda para driblar a resistência existente. Como o solo é um meio rico em microrganismos, principalmente para as bactérias (WAGG; BENDER; WIDMER, 2014), é uma oportunidade de expandir os estudos para encontrar novos microrganismos que possam ser prospectados na prevenção dos ataques das pragas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A cultura do milho (*Zea mays*): características gerais

O milho tem se tornado uma cultura muito importante no cenário mundial, representando cerca de 13% da área agrícola total (DIDONÉ *et al.*, 2018), podendo ser utilizada diretamente como alimento, forragem ou matéria-prima para produtos industrializados. Portanto, é uma cultura que se tornou autossuficiente no mercado interno, e um dos mais importantes exportadores do grão (TROJAN; PRIA, 2018).

A cultura do milho pertence à família das *Póaceas*, e seu nome científico é *Zea mays* L. A sua domesticação levou a produção de uma planta robusta e ereta, podendo chegar a 4 metros de altura, e visando a produção de grãos (MAGALHÃES; DURAES; PAIVA, 1995).

O milho é cultivado em todos os estados brasileiros, e a Região Centro-Oeste, Sudeste e Sul são as que mais se destacam em produção agrícola. Dentro dessas regiões os estados do Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul, contribuem com 52% da produção total brasileira (CUENCA *et al.*, 2005). A partir de então, diferentes tecnologias de milho Bt foram lançadas visando o controle da *S. frugiperda*, com isso o milho Bt representa cerca de 80% nas áreas de cultivo do país (CÉLERES, 2014).

Esse avanço na produção do milho é devido ao melhoramento genético, que vem desenvolvendo variedades da cultura que são capazes de se adaptarem nas mais diversas regiões, como do Equador até o limite das terras temperadas e desde o nível do mar até altitudes superiores a 3.600 metros (CARVALHO *et al.*, 1995).

### 2.2 Inseto-praga: *Spodoptera Frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

A lagarta *S. Frugiperda* é uma praga polifágica que ataca preferencialmente as culturas da família *Poaceae*, e como consequência é a principal praga do milho na América do Norte e do Sul (BLANCO *et al.*, 2010). O milho é cultivado em duas épocas do ano, conhecida como safra e safrinha (BARROS; TORRES; BUENO, 2010). Esse

milho safrinha cultivado na estação seca, aumenta ainda mais a taxa de reprodução das lagartas, multivoltinismo, ampla gama de hospedeiros (CAPINERA, 1999), e a capacidade de migrar longas distâncias (SPARKS, 1979).

A *S. Frugiperda* é conhecida popularmente como lagarta do cartucho (FAW), devido ao seu nicho preferido ser o cartucho do milho. O principal efeito da *S. frugiperda* é destruição das folhas e danos indiretos à produção de grãos, que acaba acarretando em uma menor área foliar, diminuindo assim a fotossíntese realizada pela planta (VILARINHO *et al.*, 2011).

Com isso, as lagartas nos primeiros instares raspam as folhas, e com seu desenvolvimento estas passam a fazer furos no limbo foliar ocorrendo ataque em todos os estádios de desenvolvimento do milho, infestando espigas e alimentando-se diretamente dos grãos em crescimento (SIEBERT *et al.*, 2012), o que pode causar perda no rendimento nos grãos de até 60% (SILVA; BESERRA; DANTAS, 2008) e causaram perdas anuais de US\$ 12,0 bilhões para a economia brasileira (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Entretanto, quando se observa a praga no milho à infestação já está muito avançada, e as aplicações acabam sendo tardias e em quantidades acima do recomendado, com isso não atingindo as lagartas dentro do cartucho do milho. Podendo gerar problemas como, eliminação de inimigos naturais e seleção de populações pragas resistentes aos inseticidas (LIMA *et al.*, 2008).

Com isso, essa espécie mostra grandes dificuldades em seu manejo, com base em suas características biológicas, rápida resistência ao controle químico (por exemplo, ao organofosfato e piretróide) e genético como é o caso do transgênico *B. thuringiensis* (REISIG; REAY-JONES, 2015). E devido à forte pressão de seleção imposta pelo uso extensivo de culturas transgênicas, o crescimento da resistência é um grande desafio que está sendo enfrentado nos últimos anos (JAMES, 2014).

### **2.3 Controle biológico**

Com o aumento da resistência dos insetos aos produtos fitossanitários e ao mesmo tempo visando uma maior sustentabilidade no meio ambiente, o controle biológico tende a ser cada vez mais utilizado (SILVA *et al.*, 2017). Essa demanda crescente levou a aumentos das áreas de monoculturas, que acarretaram perdas na

produção da cultura, devido assim aos crescimentos das espécies de pragas (BRADSHAW *et al.*, 2016).

O controle biológico consegue reduzir, ao invés de controlar totalmente as pragas, de modo que permaneçam na cultura em baixas populações (BUENO *et al.*, 2012). Como vantagem, outros métodos devem agir em conjunto com o controle biológico, por exemplo, plantas resistentes, técnicas culturais, barreiras físicas e, como último recurso, o uso de produtos fitossanitários, em menor quantidade do que o recomendado (STERN *et al.*, 1959).

No Brasil, a maioria dos produtos fitossanitários aceitos é proibida nos demais países, gerando assim uma grande preocupação em relação ao ambiente e a saúde no país (BOMBARDI, 2017). Entretanto, tem ocorrido destaque em relação à resistência dos insetos aos produtos químicos, pois são feitas cada vez mais aplicações para o controle, como no caso da cultura do milho, e assim ocorre à extinção de predadores naturais, aumento das pragas, seleção para resistência e contaminação no meio ambiente (GOULD; BROWN; KUZMA, 2018).

Uma tecnologia do controle biológico que se intensificou principalmente a partir de 1996, conhecida como milho transgênico, o Bt, e foi muito bem aceito pelos produtores, principalmente aqueles que sofriam com as grandes perdas (JAMES, 2014). Porém, com o seu uso intensivo nas últimas décadas já foram observados insetos pragas resistentes a ele, pois aumenta a pressão de seleção, diminuindo assim sua eficiência (RESENDE *et al.*, 2014).

Com isso, a crescente resistência em campo a vários milhos Bt, produtos referentes às proteínas expressas Cry1F e Cry1Ab já foram relatados no Brasil, e isso fez com que o uso de inseticidas químicos contra *S. frugiperda* no milho aumentassem nos últimos anos (BURTET *et al.*, 2017).

O controle biológico é considerado a regulação de populações de organismos vivos resultante de interações como o parasitismo, predação e competição (SILVA; BRITO, 2015). E com isso devemos explorar cada vez mais o controle biológico, visando manter a população da praga em níveis satisfatórios, ou seja, em níveis abaixo daqueles que causariam danos econômicos (FERNANDES; CARNEIRO, 2006).

## 2.4 O gene 16S rRNA

Na década de 80, houve a descoberta de novas técnicas para amplificação e sequenciamento de DNA, o chamado gene 16S rRNA, destacando uma etapa importante para a classificação bacteriana (GÜRTLER, V.; MAYALL, 2001; COENYE; VANDAMME, 2004; KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2007).

Poucos anos depois, essa técnica foi aprofundada e revelou o sequenciamento de um genoma completo, tendo como consequência a informação genética completa de uma cepa (JANSSEN *et al.*, 2003). Pois anteriormente, as bactérias eram classificadas com bases morfológicas, por exemplo, porém essas classificações não estavam mais sendo o suficiente para ter uma caracterização completa (LEHMANN; NEUMANN, 1896).

A determinação taxonômica por meio do gene 16S rRNA, é essencial para a determinação da filogenia e a sua identificação da diversidade bacteriana (TRINGE; HUGENHOLTZ, 2008), e tendo também como objetivo a identificação confiável de isolados microbianos de amostras ambientais (MOORE *et al.*, 2010). E hoje em dia tornou-se rotina e uma das tecnologias mais utilizadas para caracterizar comunidades bacterianas (MUINCK *et al.*, 2017).

Hoje em dia, o 16S rRNA é o processo mais indicado para a classificação taxonômica de uma cepa procariótica no mesmo gênero ou espécie (STACKEBRANDT; EBERS, 2006). Os DNAs ribossomais das bactérias compreendem três genes conservados, e são divididos em subunidades chamadas de rRNA 16S, 23S e 5S (INNUI *et al.*, 2012). O gene 16S rRNA é o mais preservado dos três RNAs, e foi citado como um “relógio evolutivo”, e atualmente vem sendo utilizada como um estudo para identificar uma bactéria desconhecida ao nível de gênero ou espécie (SACCHI *et al.*, 2002).

O uso da sequência do gene 16S rRNA tem sido utilizada para as aplicações como, por exemplo: (a) identificação e classificação de culturas isoladas e (b) estimativa de diversidade bacteriana em amostras ambientais, através de abordagens metagenômicas (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2011). E o que mais chamada à atenção desse gene, é a sua possibilidade de ser comparado não apenas entre todas as bactérias, mas também com o gene 16S rRNA das arqueobactérias e o gene 18S rRNA de eucariotos (PALYS; NAKAMURA; COHAN, 1997).

Essa conservação do gene *16S rRNA* pode ser explicada pela função celular, isto está em contraste com os genes necessários para produzir enzimas. As mutações desses genes geralmente podem ser toleradas com mais frequência, pois pode afetar estruturas essenciais quanto o rRNA (THORNE; KISHINO; PAINTER, 1998). Assim, poucos outros genes são tão altamente conservados como o gene *16S rRNA*, com isso pode-se marcar a distância evolutiva e a relação dos organismos (HARMSEN; KARCH, 2004).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos Gerais

- O objetivo deste estudo foi avaliar 10 isolados bacterianos da comunidade microbiana de solos fertirrigados com vinhaça, pertencentes ao Laboratório de Genética e Bactéria de Biotecnologia Aplicada, (LGBBA) da FCAV-UNESP Jaboticabal.

- O objetivo desse trabalho foi prospectar, selecionar e sequenciar completamente os 10 isolados promissores, através do gene *16S rRNA* dos isolados retirados do solo.

- Avaliar seu potencial entomopatogênico prospectado contra a praga (*S. frugiperda*) do milho (*Zea mays*).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Departamento de Biologia no Laboratório de Genética e Bactéria de Biotecnologia Aplicada, e juntamente com o Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga no Departamento de Fitossanidade, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho em Jaboticabal, São Paulo.

### 4.1 Origem e manutenção dos isolados bacterianos não esporulantes

Os isolados utilizados foram: LGA-V05\_13, LGA-V05\_6, LGA-V20C, LGA-V20F, LGA-V05\_22, LGA-V05D, LGA-EV05, LGA-EV08, LGA-V20B e LGA-V20G. A coleta das amostras de solo foi realizada em profundidade 0-20 cm conforme descrito por Omori *et al.* (2016), localizada em uma área de plantio de cana-de-açúcar da Fazenda Itaquerê de propriedade da Usina Santa Fé S.A. (Figura 1), no município de Nova Europa, estado de São Paulo. A análise das características físicas e químicas do solo foi realizada pelo Laboratório de Análise de Solo e Planta do Departamento de Solos e Adubos, localizado na UNESP (Universidade Estadual Paulista). O isolamento em cultura pura e manutenção em meio de cultivo dos isolados utilizado neste trabalho foram descritos por Omori *et al.* (2016). O crescimento foi realizado em meio PEG (Polietileno glicol) [composto por (g/L): com conteúdo para 1 Litro (L): 0,6 gramas (g) de  $K_2HPO_4$ , 0,2 g de  $MgSO_4$ , 0,1 g de NaCl, 1,0 g de extrato de levedura e 10,0 gramas de glicose; pH 6,9 e acrescido de cicloheximida (300  $\mu\text{g/mL}$ ) e incubadas por 15 dias a 28°C.



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

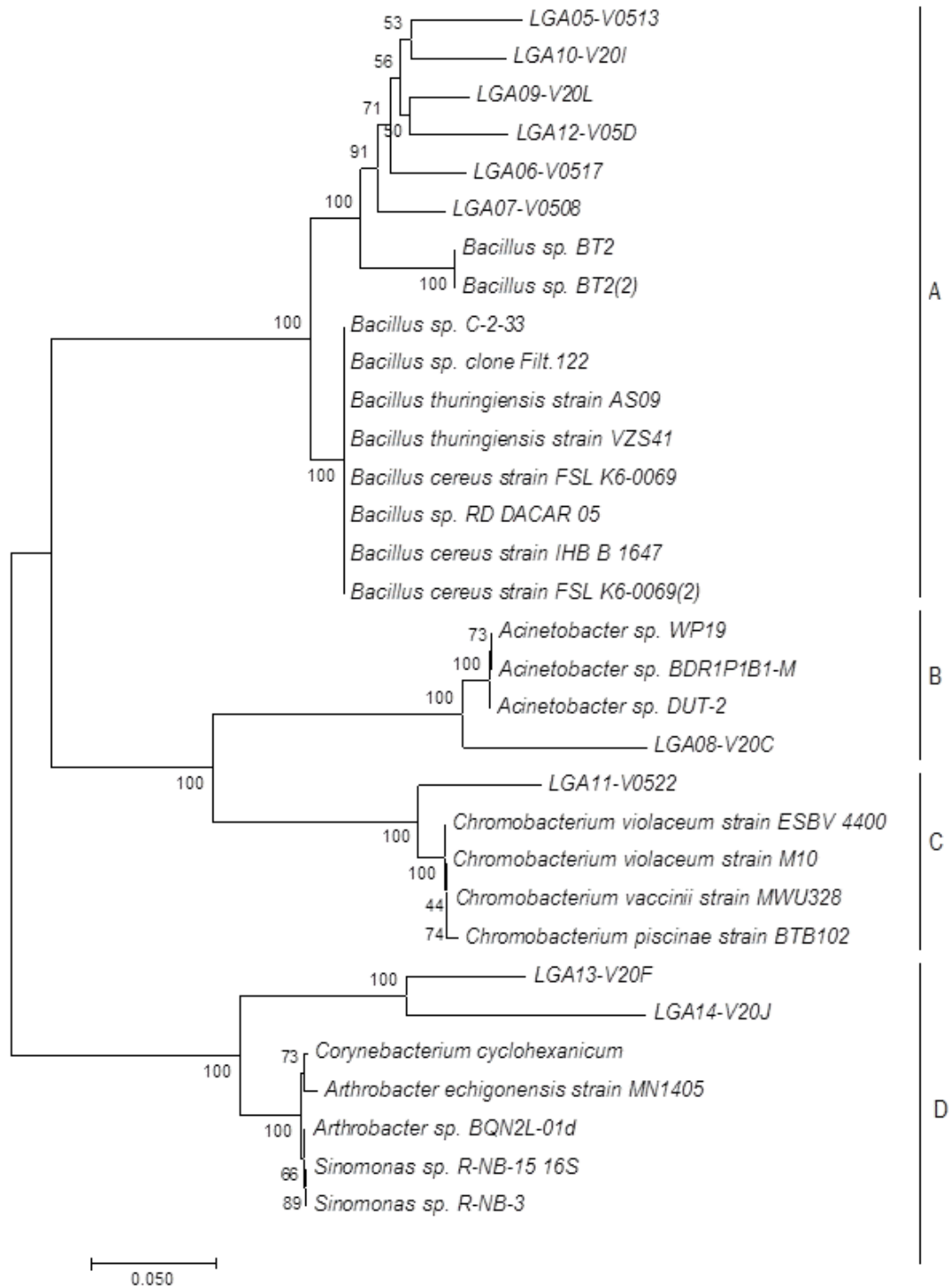


Fonte: *Google Earth, Wikipedia e Omori et al. (2016).*

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

Neste trabalho, foram selecionados 10 isolados bacterianos, designados: LGA-V05\_13, LGA-V05\_6, LGA-V20C, LGA-V20F, LGA-V05\_22, LGA-V05D, LGA-EV05, LGA-EV08, LGA-V20B e LGA-V20G. A nomenclatura “EV” refere-se ao solo do canal mestre de distribuição de vinhaça, enquanto “V” refere-se ao solo sob cultivo de cana-de-açúcar, fertirrigado com vinhaça, caracterizados parcialmente por Almeida (2017), como mostra a Figura 2.

**Figura 2 – Dendrograma evidenciando os isolados do solo parcialmente caracterizados por Almeida (2017). Ramo A: representa o gênero *Bacillus*; Ramo B: *Acinetobacter*; Ramo C: *Chromobacterium* e ramo D: gêneros *Arthrobacter*, *Corynebacterium* e *Sinomonas***



Fonte: ALMEIDA (2019).

Após cultivo em meio PEG líquido, as culturas tiveram suas D. O. (600 nm) padronizadas em aproximadamente 0,800, no período de 17 – 48 horas. Cerca de 1 ml da cultura, correspondente a 50 mg de células, foram sedimentados e lavados em solução salina [NaCl 0.85% (p/v)] para proceder-se a extração de DNA, baseado na adaptação do método desenvolvido para obtenção de DNA total de bactérias (MARMUR, 1961). A lise celular foi realizada através da adição de enzima lisozima (20 mg/mL), na presença de RNase (50 µg/mL). Em seguida, procedeu-se a dissociação do complexo DNA/proteínas por meio da desnaturação com 2,0 % (p/v) do detergente Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e aumento da força iônica com 1 M Acetato de Sódio, pH 5,2. A separação do DNA de outras macromoléculas aconteceu pela extração orgânica com um volume de Clorofórmio: Álcool Isoamílico [24:1 (v/v)] e a precipitação do DNA com 2 volumes de Etanol. As amostras tiveram o excesso de etanol evaporado em Concentrator Plus (Eppendorf), na opção D-AL e sem ajuste de temperatura. O DNA foi ressuspensionado em 100 µL de TE (10:1) pH 8,0, overnight a 4 °C. Após caracterização eletroforética [Agarose 0,8 % (p/v)] e quantificação do DNA em aparelho Nanodrop 1000 Spectrophotometer (ThermoScientific – Uniscience), as amostras de DNA foram estocadas em freezer -20 °C.

Foram obtidos amplicons de 1,5 Kb a partir do gene *16S rRNA*, para determinação da assinatura molecular de cada isolado, através de PCR. Foram aplicados os oligonucleotídeos iniciadores (primers) universais fd1 (8-27) <5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'> e rD1 (1525-1541) <5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'> (WEISBURG *et al.*, 1991), descritos para as regiões alvo de *Escherichia coli* K12. A reação de amplificação consistiu em: 40,0 ng DNA molde; 7,5 pmol de cada primer universal; 1,75 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de Desoxirribonucleotídeos Trifosfatos (dNTPs); 2,0 µl de Tampão 10X; 1U da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen); em um volume final de 20 µL. O programa de amplificação foi: 94°C/5 min; 35 ciclos a 94°C/30 s, 56°C/40 s, 72°C/90 s; 72°C/7 min, realizados em um termociclador PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.). O tamanho e pureza dos amplicons gerados foram verificados por eletroforese [Agarose 1,5 % (p/v)].

Os amplicons processados e analisados nesse estudo foram os isolados LGA-V05D, LGA-EV05, LGA-EV08, LGA-V20B e LGA-V20G, enquanto aos demais isolados não esporulantes usados neste trabalho LGA-V0513, LGA-V056, LGA-V20C, LGA-V20F, LGA-V0522 foram processados por Alves (2020).

### 4.3 Sequenciamento dos amplicons 16S rRNA

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

As reações de sequenciamento foram padronizadas para um volume final de 10 µl, utilizando os seguintes reagentes: 0,5 pmol de primer; tampão de sequenciamento 1X; 1,0 µl de enzima BigDye (Thermo Fisher Scientific); 7 ng de DNA total bacteriano (para os primers fD1 e rD1) ou 7 ng de amplicon 16S rRNA (para os primers 362f, 786f e 1203f). O programa de amplificação foi: 96°C/2 min; 40 ciclos a 96°C/10 s, 52°C/20 s, 60°C/4 min. Cada reação de sequenciamento foi precipitada com 80 µl de isopropanol 75% (v/v) e submetida a sucessivas lavagens em etanol 70% (v/v) gelado, para remoção dos Dideoxynucleotídeos Trifosfatos (ddNTPs) marcados não incorporados à reação. As amostras foram secas em fluxo laminar por 1 h, ressuspendidas com 9,0 µl de Hi-Di Formamide (4311320 - ABI Prism) e desnaturadas a 95°C por 5 min. O sequenciamento dos amplicons foi realizado no sequenciador capilar modelo ABI 3100 Automated Sequencer (PerkinElmer).

### 4.4 Análises das assinaturas moleculares dos isolados bacterianos através de bioinformática

Os eletroferogramas gerados pelo sequenciador capilar foram avaliados quanto à qualidade (Phred  $\geq$  20). O gene 16S rRNA foi concatenado nos seus

aproximadamente 1,5 Kb pelo pacote de programas Phred/Phrap/Consed (GORDON *et al.*, 1998). Após a montagem dos contigs *16S rRNA*, as sequencias foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos contra o banco de dados de nucleotídeos (não redundante) do GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI), utilizando a ferramenta nucleotide BLAST (BLASTn) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

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

#### **4.5 Obtenção, criação e manutenção de *S. frugiperda***

A população de *S. frugiperda* foi obtida através da EMBRAPA Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil. A criação e manutenção da espécie foram feitas no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga, junto ao Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal-SP. As lagartas foram mantidas em dieta artificial (adaptada GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976) em recipientes plásticos de 70 ml, onde foram individualizadas uma lagarta por pote, até a fase de pupa. As pupas foram retiradas e colocadas em recipientes de 1 L contendo papel filtro no fundo. Após a eclosão, os adultos foram colocados em gaiolas cilíndricas de PVC (30,0 cm de altura x 28 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel sulfite branco e cobertas com “nylon” para não fugirem. Os adultos foram alimentados com uma solução líquida de mel a 10%. A cada dois dias foram coletados os ovos, e colocados em recipientes de 1 L contendo dieta artificial no fundo. Após a eclosão das lagartas, cerca de 95% dos neonatos foram utilizadas para os bioensaios, e o restante utilizado para a manutenção população.

#### 4.6 Preparo e bioensaio das suspensões bacterianas não esporulantes

Para o preparo das suspensões dos isolados de selecionados, serão cultivados em Placa de Petri com meio de cultura TY (Tryptone-Yeast Medium) (conteúdo para 1 L: 5,0 g de Triptona, 3,0 g de extrato de levedura e 0,87 g de NaCl; pH 7,0) e incubados a 25°C durante 5 a 7 dias, permitindo assim seu crescimento. Após este período, o conteúdo bacteriano será transferido, com auxílio de alça de platina, para Erlenmeyer contendo 50 ml de meio TY líquido e cada Erlenmeyer foi vedado com algodão e envolto em tecido e papel alumínio, sendo autoclavado durante 20 minutos. Após esse processo, foram encaminhados para um Shaker rotativo, o pré inóculo foi realizado a 28°C e 120 rpm por 12 horas para o “starter” da bactéria. Após as 12 horas, o pré inóculo foi vertido para outro Erlenmeyer contendo 75 ml de meio TY líquido, que também foram vedados com algodão e envoltos em tecido e papel alumínio, sendo autoclavado durante 20 minutos, e levados para um Shaker rotativo, realizado a 28°C e 200 rpm por 48 horas e armazenados sob refrigeração para uso. Esse processo foi realizado para cada um dos isolados não esporulantes. Na condução dos experimentos foram utilizados os inóculos preparados anteriormente, sendo retirados uma alíquota de 75 µL e pipetados em cada pote de 5 ml contendo a dieta artificial (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976), e mantidas em fluxo laminar por aproximadamente 10 min para secagem. Em seguida, foi depositada em potes individualizados, uma lagarta de neonatas de *S. fugiperda* para o teste de mortalidade. Para cada tratamento e a testemunha negativa (H<sub>2</sub>O), foram utilizadas 50 lagartas separadas em 5 repetições, contabilizando um total de 11 tratamentos e 550 lagartas. O bioensaio foi mantido sob condições controladas (UR: 75 % ±12 e T: 25 °C ±2). Após 10 dias foram realizadas as avaliações de mortalidade para cada tratamento.

#### 4.7 Preparo e bioensaios com bactérias esporulantes

As bactérias crescidas nas placas foram transferidas, com auxílio de alça de platina, para 50 ml de meio LB líquido (conteúdo para 1L: Glicose 1,0 g; Caldo Nutritivo 8,0 g; Extrato de Levedura 5,0 g; MgSO<sub>4</sub> 0,3 g; Triptona 10,0 g; FeSO<sub>4</sub> 0,02 g; ZnSO<sub>4</sub> 0,02 g; MnSO<sub>4</sub> 0,02 g; NaCl 5,0 g; pH 7,5). Após esse processo, o pré-inóculo foi

incubado a 120 rpm, 28°C por 12 horas em um Shaker rotativo (Shaker Incubador Modelo G25 New Scientific) para o “starter” da bactéria. Após as 12 horas, o pré inóculo foi vertido em 75 ml de meio LB líquido e incubado a 200 rpm, 28°C por 48 horas em um Shaker rotativo e armazenados sob refrigeração para uso.

Uma alíquota de 75 µL de cada cultura foram pipetados em cada pote de 5 ml contendo dieta artificial (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976), e após a secagem foi depositada uma lagarta neonata de *S. fugiperda* por pote, para o teste de mortalidade. O bioensaio foi realizado utilizando-se uma solução originalmente na concentração  $3 \times 10^9$  esporos. mL<sup>-1</sup> e diluindo-a na proporção 1:10 até uma concentração de  $3 \times 10^4$  esporos. mL<sup>-1</sup> (totalizando 6 concentrações). Cada concentração consistia de um tratamento de 30 repetições, seguido de um tratamento com testemunha positiva do bioensetocida Dipel®, onde foram utilizados 16, 80 g do produto dissolvido em 0,5 L de água, e a testemunha negativa (H<sub>2</sub>O), totalizando 8 tratamentos de 30 repetições para cada um dos isolados. A condução do experimento foi realizada em temperatura ambiente (25±2°C) e a avaliação da mortalidade de lagartas realizada 7 dias após a aplicação das suspensões.

#### **4.8 Análise de resultados**

Os resultados dos bioensaios foram obtidos através de análise no software AgroEstat (Sistema de análises estatísticas de ensaios agrônômicos) 1.1.0.712, (BARBOSA; MALDONADO, 2008), com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Qualidade do DNA genômico

Foi relatado um perfil de qualidade na extração do DNA genômico devido ao aparecimento de uma única banda de alto peso molecular. Foi utilizado o padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®) como padrão de tamanho molecular. O DNA extraído foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%. O aparecimento de uma única banda íntegra de alto peso molecular indica que o processo de extração do DNA foi bem-sucedido, e o mesmo não se encontra degradado (Figura 3).

**Figura 3 – Avaliação do DNA genômico extraído dos cinco isolados não esporulantes, através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. MM-padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®)**



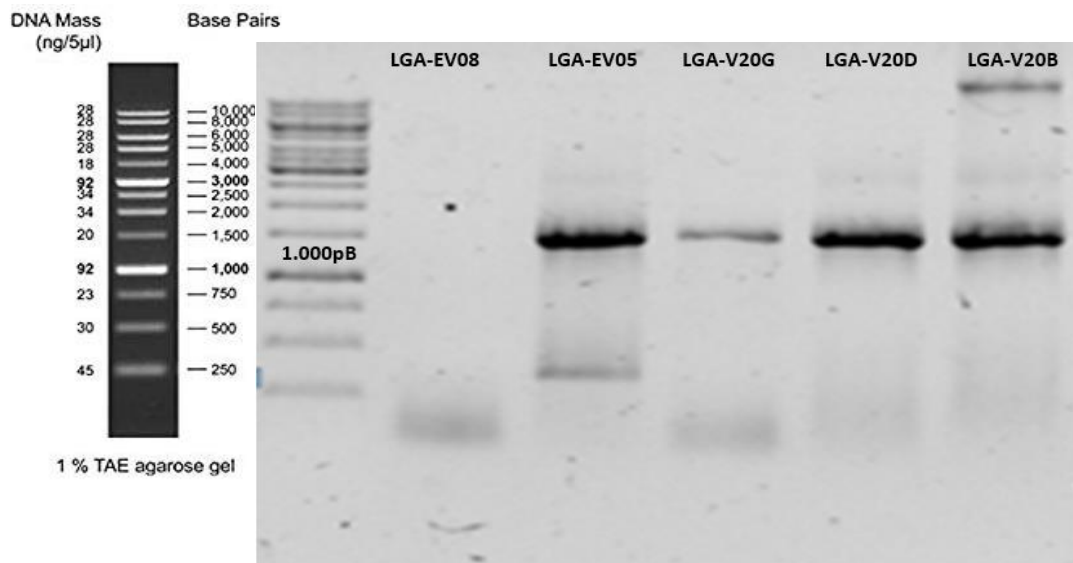
Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.2 Qualidade da purificação do produto da PCR

A qualidade do produto da amplificação da PCR foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando o padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®) como padrão de tamanho molecular. O aparecimento de uma banda de forte intensidade na posição de 1500 bp indica o amplicon *16S rRNA* esperado (Figura 4).



**Figura 4 – Avaliação do produto de PCR dos cinco isolados não esporulantes e através de eletroforese em gel de agarose 1%. P-padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®)**



Fonte: Elaborado pela autora.

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

Pela a análise do sequenciamento completo, o tamanho concatenado das sequencias *16S rRNA* envolvidas no alinhamento variou de 957 a 1436pb e quando comparadas ao Banco GenBank (Tabela 1), observa-se que o percentual de cobertura para os isolados pelo alinhamento com sequencias do banco correspondeu a 100% de similaridade aos seus respectivos gêneros e espécies, para todos os isolados.

Tabela 1 – Sequências similares de 16S rRNA com base no banco de dados Gen Bank

Isolados	Tamanho (pB)*	Acesso	Família	Linhagem	Cobertura %	Identidade
LGA-EV08	1436	NR_112926.1	Paenibacillaceae	<i>Brevibacillus nitrificans</i> strain DA2	100	99
LGA-EV05	1142	CP017580.1	Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium</i> sp. strain BH-2-1-1	100	99
LGA-V20B	957	GU326383.1	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter echigonensis</i> strain MN1405	100	99
LGA-V20G	1396	GU326383.1	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter echigonensis</i> strain MN1405	100	99
LGA-V05D	1390	GU326383.1	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter echigonensis</i> strain MN1405	100	99

Fonte: Elaborado pela autora.

\*Número de pares de bases sequenciadas

#### 5.4 Filogenia bacteriana dos isolados com base no sequenciamento parcial 16S rRNA

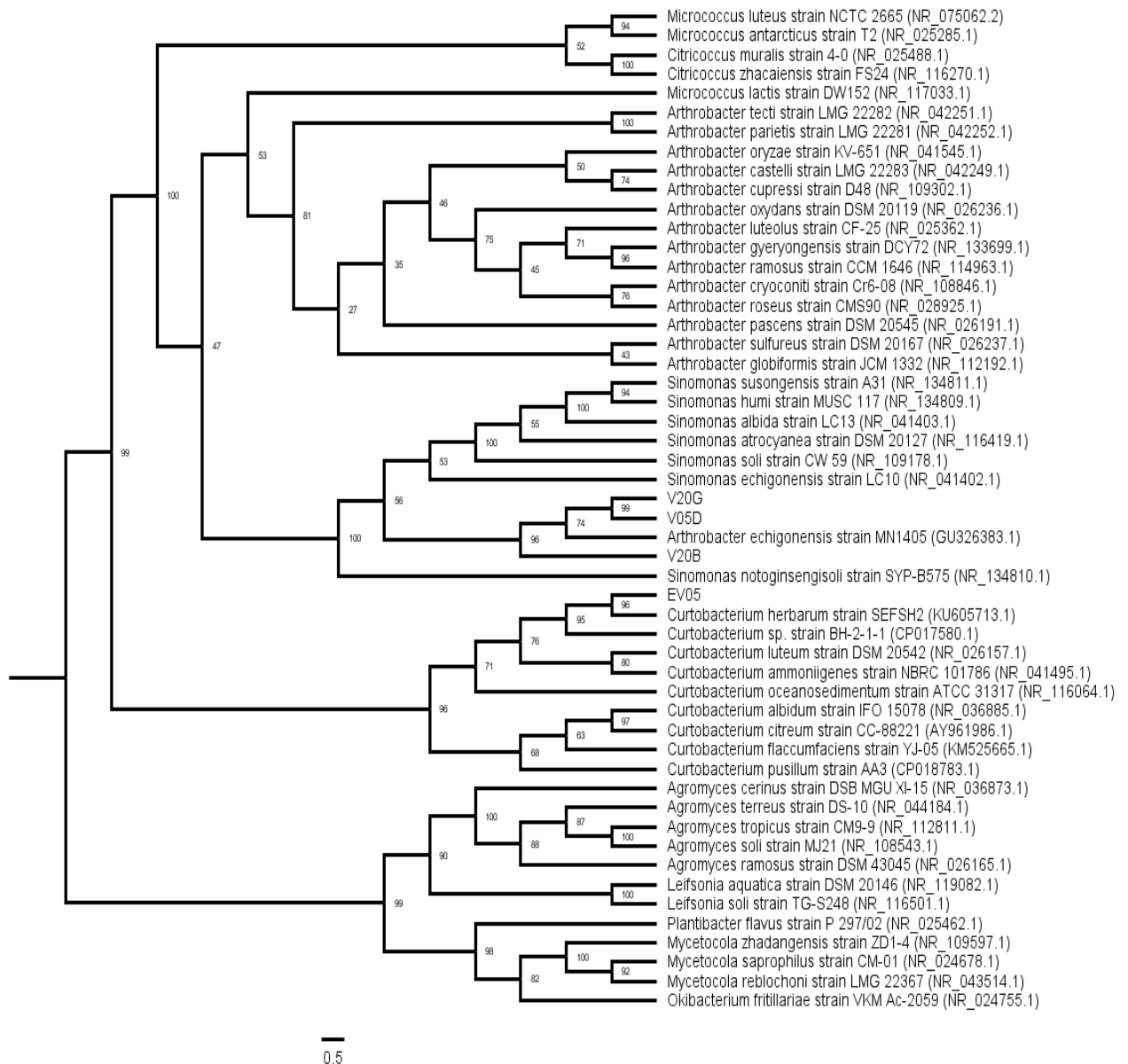
A análise filogenética com base em sequências de 16S rRNA completo, permitiu um agrupamento mais coerente e confiável entre todos os gêneros, distribuídos na árvore filogenética. Os isolados V20B, V20G, V05D mostraram alta similaridade ao gênero *Arthrobacter*, pertencente ao filo Actinobacteria (Figura 5). O gênero *Sinomonas* (espécie-tipo *Sinomonas flava*) foi proposto pela primeira vez por Zhou *et al.* (2009) com a descrição da cepa recém-isolada *S. flava* CW 108 T e a reclassificação de *Arthrobacter atrocyaneus* como *Sinomonas atrocyanea* (cepa tipo DSM 20127 T) (ZHOU *et al.*, 2009; KUHN; STARR, 1960). As células são aeróbicas e não móveis, o isolado cresceu a uma temperatura ótima de 30 - 37 °C e a um pH ótimo de 6,0-8,0. Sendo um novo isolado de actinomiceto, designada CW 59T, foi isolada de uma amostra de solo de floresta poluída na província de Anhui, China. Os açúcares de células inteiras continham galactose, manose, ribose e glicose; os principais aminoácidos da parede celular foram lisina, alanina e ácido glutâmico. A análise filogenética mostrou que CW 59T pertenceu ao gênero *Sinomonas* e agrupou-se com membros das espécies *Sinomonas atrocyanea*, *Sinomonas flava*, *Arthrobacter echigonensis* e *Arthrobacter albidus*. As semelhanças de sequência do gene 16S rRNA de CW 59T com *S. atrocyanea* DSM 20127T, *S. flava* CW 108T, *A. echigonensis* LC10T e *A. albidus* LC13T foram 99,5, 99,3, 98,2 e 98,0%, respectivamente. A hibridização DNA-DNA do isolado mostrou valores de parentesco de 58,3% (DSM 20127T), 41,8% (CW 108T), 21,6% (LC10T) e 25,5% (LC13T) com seus quatro vizinhos mais próximos (ZHOU *et al.*, 2012).

Porém, os demais isolados se mostraram similares aos respectivos gêneros: EV05 se mostrou similar ao gênero *Curtobacterium* após ser realizada a caracterização completa do gene 16s rRNA (Figura 5). Deriva esse nome devido ao significado bactéria de bastão curto, gram-positivo, não ácido-resistente e não formador de esporos.

O isolado EV08 se mostrou similar ao gênero *Brevibacillus* (Figura 6), após ser realizado a caracterização completa do gene 16s rRNA. Uma bactéria nitrificante heterotrófica, designada cepa DA2 (T), foi isolada de um agente

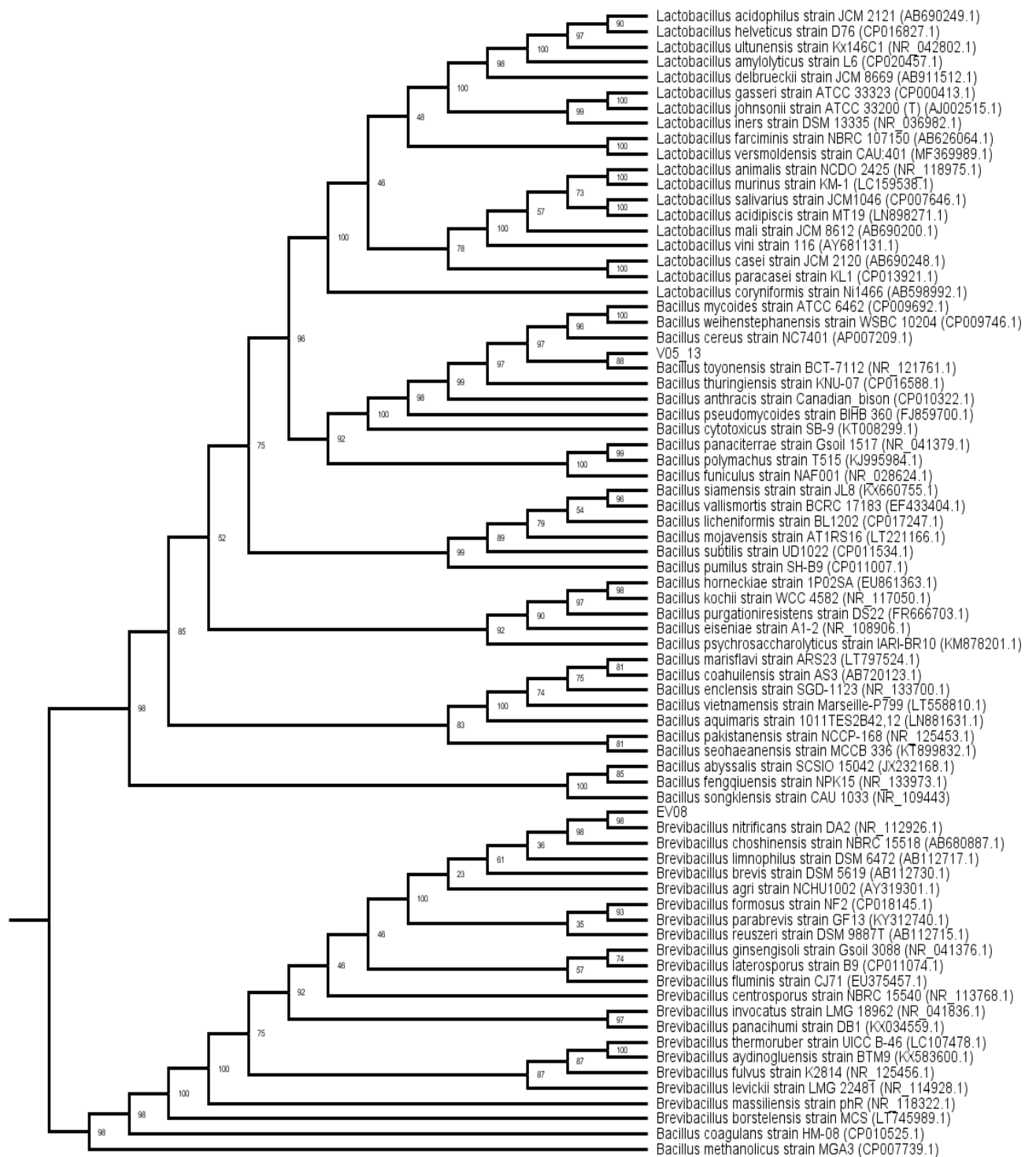
microbiológico para melhorar a digestão microbiana em tanques de tratamento de esgoto (TAKEBE *et al.*, 2012).

**Figura 5 – Dendrograma evidenciando os isolados não esporulantes LGA-V20G, LGA-V05D, LGA-V20B e LGA-EV05 usando o método de Neighbor Joining (SAITOU; NEI, 1987). Foram realizados 1000 “bootstrap”**



Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 6 – Dendrograma evidenciando os isolados não esporulantes LGA-EV08 usando o método de Neighbor Joining (SAITOU; NEI, 1987)**



0.5

Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.5 Mortalidade da *S. frugiperda*

De acordo com os resultados obtidos através dos bioensaios, pode-se verificar que não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey, entre os isolados e o controle sobre o valor de peso (g) para as lagartas incluindo os isolados LGA-V05D, LGA-EV05, LGA-EV08, LGA-V20B e LGA-V20G caracterizados por Alves (2020) (Tabela 2).

**Tabela 2 – Bioensaio de teste da mortalidade de *Spodeoptera frugiperda* usando os isolados não esporulantes**

Isolados de bactérias não esporulantes (R)	Peso de lagartas (g.lag <sup>-1</sup> )
LGA-V05-13	0.5169 b
LGA-V20F	0.5663 ab
LGA-V05-6	0.5996 a
LGA-EV05	0.5769 a
LGA-EV08	0.5796 a
LGA-V20C	0.5615 ab
LGA-V20G	0.5674 ab
LGA-V20B	0.5569 ab
LGA-V05-22	0.5564 ab
LGA-V05D	0.5432 ab
<b>Controle (H<sub>2</sub>O)</b>	0.5572 ab

Fonte: Elaborado pela autora.

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

### 5.6 Mortalidade da *S. frugiperda* na fase lagarta com isolados esporulantes

Através dos resultados obtidos, pode-se observar que todas as concentrações  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^8$  e  $3 \times 10^9$  tiveram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey, quando comparadas às testemunhas, entre as concentrações de esporos do isolado LGBBA - 1321 aplicadas e o peso de cada lagarta (Tabela 3).

As médias dos isolados LGBBA - 1355 apresentaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey, quando comparados à testemunha. Contudo, pode-se observar que a testemunha não teve diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey, quando analisadas somente as concentrações  $3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^6$  e  $3 \times 10^7$  de esporos da LGBBA -1355 (Tabela 3).

**Tabela 3 – Bioensaio de teste de mortalidade de *S. frugiperda* usando as linhagens selvagens de *B. thurigiensis* seguidos dos respectivos pesos das lagartas comparadas com a testemunha (H<sub>2</sub>O)**

Concentrações	Peso das lagartas (g)	
	LGBBA-1355	LGBBA-1321
$3 \cdot 10^4$	0.0414 a	0.0181 b
$3 \cdot 10^5$	0.0270 b	0.0134 bc
$3 \cdot 10^6$	0.0343 ab	0.0171 b
$3 \cdot 10^7$	0.0319 b	0.0128 bc
$3 \cdot 10^8$	0.0099 c	0.0102 c
$3 \cdot 10^9$	0.0109 c	0.1323 bc
<b>Testemunha (H<sub>2</sub>O)</b>	0.0308 b	0.0308 a

Fonte: Elaborado pela autora.

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

### 5.7 Mortalidade da *S. frugiperda* na fase pupa com isolados esporulantes

De acordo com os resultados observados na tabela, pode-se notar que não houve diferenças significativas ( $P>0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey, quando comparados a testemunha, em relação às aplicações de esporos do isolado LGBBA - 1321 e o peso das pupas (Tabela 4). Com os resultados observados na tabela, pode-se notar que não houve diferenças significativas ( $P>0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey, quando comparados a testemunha, em relação às aplicações de esporos do isolado LGBBA - 1355 e o peso das pupas (Tabela 4).

**Tabela 4 – Bioensaio de teste avaliando peso das pupas de *S. frugiperda* utilizando esporos de linhagens selvagens de *Bt***

Concentrações	Peso das pupas (g)	
	Isolado 1355	Isolado 1321
3.10 <sup>4</sup>	0.2352 ab	0.2703 a
3.10 <sup>5</sup>	0.2775 ab	0.2250 a
3.10 <sup>6</sup>	0.2516 ab	0.2210 a
3.10 <sup>7</sup>	0.2891 a	0.2416 a
3.10 <sup>8</sup>	0.1903 b	0.2236 a
3.10 <sup>9</sup>	0.2691 ab	0.1653 a
<b>Testemunha</b>	0.2669 ab	0.2669 a

Fonte: Elaborado pela autora.

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

### 5.8 Mortalidade da *S. frugiperda* utilizando Dipel®

De acordo com os resultados observados na tabela, pode-se notar que não houve diferenças significativas ( $P>0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey, quando comparados a testemunha, em relação as aplicações de Dipel ® e o peso das lagartas (Tabela 5).



**Tabela 5 – Bioensaio de teste entre o peso e pupas *S. frugiperda* utilizando Dipel®**

	<b>Peso lagartas (g)</b>	<b>Peso pupas (g)</b>
Testemunha	0.0308 a	0.2669 a
Dipel®	0.0660 a	0.2207 a

Fonte: Elaborado pela autora.

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

## 6 DISCUSSÃO

O sequenciamento total do gene *16S rRNA* permitiu uma classificação taxonômica mais confiável e apurada para cada isolado, quando comparada o sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* realizado por Almeida (2017).

Observando o dendrograma e o sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* do isolado LGA-V20D, nota-se que ele estava classificado como *B. thuringiensis*, tendo uma identidade de 96% dessa espécie. Entretanto, quando comparado ao sequenciamento total do gene *16S rRNA*, os isolados LGA-V20B, LGA-V20G e LGA-V20D foram classificados taxonomicamente como *Arthrobacter echigonensis*, da família Micrococcaceae, tendo uma identidade de 100% e uma cobertura de 99% quando comparada a essa espécie (Figura 5). Avanços na classificação taxonômica mostraram que *A. echigonensis* deve ser reclassificado dentro do gênero Sinomonas, com base na similaridade da composição dos principais ácidos graxos, lipídios polares e aminoácidos da parede celular (ZHOU *et al.*, 2009).

Com base em análises de sequenciamento do gene *16S rRNA*, pode-se dizer que os isolados representam espécie do gênero, Sinomonas, e com isso os isolados do tipo *A. echigonensis* devem ser reclassificadas como *S. echigonensis* comb. nov. classificada como uma descrição emendada do gênero Sinomonas (DING; HIROSEM; YOKOTA, 2009; ZHOU *et al.*, 2012). Membros do gênero Sinomonas são capazes de sintetizar nanopartículas de prata com atividade antimicrobiana (MANIKPRABHU *et al.*, 2016), hidrolisar amido (SER *et al.*, 2015), biodesulfurar o carvão (MISHRA *et al.*, 2014), capacidade de degradar óleo no mar (WU *et al.*, 2010) e degradar o antioxidante sesamina (KUMANO *et al.*, 2016). Em pesquisas mais recentes membros deste gênero exibiram efeitos promotores de crescimento de plantas e atividade antagônica contra muitos patógenos radiculares e foliares, implicando em seu potencial uso na agricultura sustentável (ADHIKARI *et al.*, 2017). Estes estudos também mostraram que esse gênero pode possuir atividade inibitória contra fungos fitopatogênicos, como o *Exserohilum turcicum*, isolado de uma amostra de solo (FU *et al.*, 2019). A Sinomonas também apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias multirresistente *Staphylococcus aureus*, podendo ser usada em estudos futuros

para minimizar os problemas voltados para a resistência dessa bactéria (MANIKPRABHU *et al.*, 2016).

O isolado LGA-EV05, após a realização do sequenciamento completo do gene *16S rRNA*, foi classificado como *Curtobacterium herbarum* linhagem BH-2-1-1, através do dendrograma (Figura 5), A família Microbacteriaceae, proposta por Park *et al.* (1993), é composta por mais de 20 gêneros, incluindo o gênero *Curtobacterium*. Este gênero foi classificado por Yamada e Komagata (1972) para incluir as demais espécies: *Curtobacterium albidum*, *C. citreum*, *C. luteum*, *C. pusillum*, *C. saperdae* e *C. testaceum*, *C. flaccumfaciens* (HEDGES, 1922), *C. herbarum* (BEHRENDT *et al.*, 2002) e *C. ammoniigenes* (AIZAWA *et al.*, 2007), *C. saperdae* e *C. testaceum*. Pode-se observar que esse isolado LGA-EV05 possui uma identidade de 100% e cobertura de 99% quando relacionada a essa espécie *Curtobacterium herbarum* strain BH-2-1-1. Com isso, suas células são gram-positivas, estritamente aeróbico, sem formação de esporos e móvel, uma temperatura ótima de crescimento em média de 25 °C (BEHRENDT *et al.*, 2002).

Este gênero é muito conhecido por compor bactérias promotoras de crescimento de plantas (VIMAL; PATEL; SINGH, 2019), contudo possui também espécies patogênicas para plantas como o caso da espécie *C. flaccumfaciens* (SOARES *et al.*, 2013). Há estudos também que mostram a capacidade das bactérias desse gênero que conseguem realizar a degradação de hidrocarbonetos, ou seja, solos contaminados com petróleo (LUMACTUD *et al.*, 2016). Assim conhecidos como biorremediadores, são bactérias que conseguem de alguma forma fazer diminuir o estresse tóxico, controlando a contaminação causada pelo óleo, tornando assim o ambiente menos poluído. Outra atividade promissora consiste na redução da toxicidade causada por Alumínio (Al), de modo que as plantas possam se desenvolver na presença deste metal tóxico (MA *et al.*, 2016).

Entretanto, quando se analisa o isolado LGA-EV08 após a realização do sequenciamento completo do gene *16S rRNA*, observa-se que a classificação taxonômica direciona para *Brevibacillus nitrificans* strain DA2, tendo uma identidade de 100% e uma cobertura de 99% quando comparado a essa espécie (Figura 6). São bactérias gram-positivos, facultativamente anaeróbicos, móveis e são capazes de crescer a pH 5-8. A caracterização da sequência do gene *16S*

*rRNA* propõe que o isolado é um membro do gênero *Brevibacillus*, com maior semelhança em porcentagem, quando comparados com as bactérias *Brevibacillus choshinensis* (99,7%), *B. formosus* (99,4%), *B. brevis* (99,4%), *B. agri* (99,0%), *B. reuszeri* (98,8 %), *B. parabrevis* (98,7%), *B. centrosporus* (98,6%), *B. limnophilus* (97,4%), *B. panacihumi* (97,3%) e *B. invocatus* (97,3%), o isolado merece uma classificação como nova espécie, tendo o nome de indicação *Brevibacillus nitrificans* (TAKEBE *et al.*, 2012). Sendo assim uma bactéria nitrificante, por isso seu nome foi escolhido, pois ocorre a remoção do nitrogênio por meio da nitrificação e desnitrificação biológica, podendo ser aplicado em tratamentos de águas residuais (CARRERA *et al.*, 2003; RUIZ; JEISON; CHAMY, 2003; SCHMIDT *et al.*, 2003).

Com isso, após os estudos sobre a classificação do gene *16S rRNA* realizada neste trabalho e por Almeida (2017), considerando estas bactérias não-esporulantes, foram realizados os bioensaios para avaliar seu potencial entomopatogênico contra *S. frugiperda*. As práticas para controle biológico adotadas nos últimos anos contra esta praga já mostraram sua evolução com a resistência no controle dos insetos-pragas. Pode-se observar que existem estudos que também mostram a capacidade de novas bactérias, incluindo não-esporulantes, em controlar esse inseto-praga, e como isso é vantajoso conhecer cada isolado e como ele reage a praga, como é o caso da bactéria entomopatogênica, gram negativa *Xenorhabdus nematophila* contra a lagarta *S. frugiperda* (NUÑEZ-VALDEZ *et al.*, 2019). A bactéria produz uma diversidade de moléculas e proteínas, sendo uma delas a rabduscina, e com isso o sistema imunológico dos insetos-pragas não consegue combater, matando assim o inseto (CRAWFORD *et al.*, 2012). Entretanto, os resultados no controle das lagartas-do-cartucho nos mostram o tamanho da resistência, pois os 5 isolados sequenciados completamente pelo gene *16s rRNA* e os 5 isolados sequenciados por Alves (2020) não se mostraram tão eficazes em combater a *S. frugiperda* não alterando seu peso e nem seu desenvolvimento durante o ciclo, chegando a fase adulta.

Com esses experimentos e leituras de outros artigos, conseguimos entender a alta resistência da *S. frugiperda* e como é difícil o seu controle. Esses insetos pertencem à ordem Lepidoptera e família Noctuidae, e demonstram também a sua resistência em relação ao uso do *B. thuringiensis*, pois as toxinas

das proteínas produzidas por essas bactérias possuem os mesmos locais de ligação nas lagartas, diminuindo assim seu efeito de mortalidade (HECKEL, 2015).

Com isso, utilizamos também duas linhagens selvagens de *B. thuringiensis* para comprar sua resistência e avaliar sua eficácia contra esse inseto-praga. As linhagens são: LGBBA-1321 e LGBBA-1355 foram similares nas respostas. Quando aplicada a menor concentrações de esporos,  $3 \times 10^9$ , a linhagem LGBBA – 1355 reduziu o peso das lagartas e as mesmas se desenvolveram lentamente, com menos ganho de peso, que quando comprados às outras concentrações de esporos. A linhagem LGBBA – 1321 Não apresentou mortalidade considerável. Entretanto mostrou o tamanho da resistência da praga à essas linhagens selvagens de Bt, e com isso através de mais leituras podemos observar a evolução da resistência ao Bt nas demais regiões do mundo.

O primeiro caso observado de resistência da *S. frugiperda* ao milho Bt foi detectada pela primeira vez nos campos de milho TC1507 em Porto Rico, em 2006 (STORER *et al.*, 2010). A resistência da lagarta no campo de milho tem sido observada em várias regiões do Brasil (FARIAS *et al.*, 2014) e nos Estados Unidos (HUANG *et al.*, 2014). Como observado, *S. frugiperda* possui resistência em vários países e, até o momento, a única espécie-alvo de pragas que desenvolveu resistência no campo às culturas Bt em várias áreas do mundo (DANGAL; HUANG, 2015).

Na Índia, já é observado também a resistência no controle da *S. frugiperda*, e um meio que está sendo adotado por esse país é a utilização de biopesticidas microbianos baseados em novas bactérias. Seus compostos bioativos têm sido utilizados contra muitas pragas de artrópodes (KUMAR; SINGH, 2015). Esses biopesticidas tem tido uma boa aceitação devido aos seus benefícios como redução da toxicidade ambiental, especificidade do alvo e segurança para organismos não-alvo, fazendo parte do Manejo Integrado de Pragas (MIP) (SENTHIL-NATHAN, 2015).

Com a produção crescente de novos compostos químicos, devido à resistência desenvolvida pelos insetos-pragas existentes, e à necessidade de moléculas específicas para o alvo e sustentáveis ao meio ambiente (SPARKS, 1979), um produto inovador foi lançado na Argentina: o Herculex I (TC1507). Esta tecnologia consiste em plantas que expressam a proteína Cry1F, sendo

lançada durante as temporadas de 2005-2006 e foi amplamente adotado devido ao seu alto nível de eficácia contra a lagarta-do-cartucho. No entanto, a resistência aumentou em relação ao milho Cry1F no país e ameaça a durabilidade dessa característica de controle (CHANDRASENA *et al.*, 2017). Com isso, conhecer e estudar demais microrganismos torna-se fundamental, pois sempre se mostram uma ótima alternativa na produção de novas substâncias, como proteínas e toxinas (CARR *et al.*, 2012).

Mesmo as culturas transgênicas que expressam um ou mais genes que codificam proteínas cristalinas inseticidas (Cry) de várias linhagens da bactéria *B. thuringiensis* apresentam resistências. As proteínas Bt são eficazes inseticidas contra vários insetos agronomicamente importantes, entretanto com a espécie *Spodoptera spp.* são menos sensíveis a esse modo de ação (VOJTECH; MEISSLE; POPPY, 2005; DUTRA *et al.*, 2012; OMOTO *et al.*, 2016). Entretanto, agora é preciso plantar a cultura do milho que produzem duas proteínas Bt e ainda para conseguir um melhor resultado é necessário acrescentar pulverizações de inseticidas sintéticos (HUTCHISON *et al.*, 2015). Em algumas regiões da América Latina, o milho Bt que produz uma ou duas toxinas é pulverizado até 4 vezes com produtos fitossanitários para obter controle desejado da *S. frugiperda* (BLANCO *et al.*, 2016).

Essa aceleração nos últimos anos em relação à resistência é uma preocupação séria para o uso do Bt contra a lagarta-do-cartucho. Em muitas hipóteses, a herança da resistência ao Cry1F em populações da lagarta foi caracterizada como autossômica recessiva e monogênica em Porto Rico, Brasil e Argentina (CHANDRASENA *et al.*, 2017).

A resistência das lagartas às culturas Bt representa um grande desafio nos últimos anos, especialmente para culturas em regiões tropicais e subtropicais onde a lagarta se desenvolve normalmente mesmo com a aplicação dos bioinseticidas e milhos transgênicos. Tem como consequência o uso intensivo de produção agrícola (safra/safrinha) e de características bioecológicas da espécie da lagarta, que possui alta densidade populacional e sobreposição de gerações no agroecossistema (BURTET *et al.*, 2017). Além disso, o limitado uso de práticas alternativas de MIP e estratégias de manejo da resistência a insetos (MRI) também favorecem a rápida evolução da resistência (MALAQUIAS *et al.*, 2017).

O Bt é a principal bactéria utilizada na formulação de bioinseticidas, sendo o Dipel® um dos mais utilizados e conhecidos (ROH, Choi, Li, Jin, & Je, 2017). Produzindo toxinas e proteínas que levam a morte do inseto (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). Nesse estudo, pode-se observar que com a aplicação de Dipel® não houve controle das lagartas, pois as mesmas se desenvolveram normalmente em peso (g) e chegaram à fase de pupa sem nenhuma dificuldade. Para entender melhor o mecanismo de resistência, outros autores também escreveram sobre essas lagartas que são resistentes ao inseticida Bt. Os primeiros relatos ocorreram no início da década de 90, como é o caso das lagartas de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), que foram resistentes ao Dipel® (Abbott Laboratories North Chicago, OL). Outros autores observaram também o desenvolvimento de resistência em *Sesamia nonagroides* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) em campos de milho geneticamente modificados na Espanha (KRANTHI *et al.*, 2006), além da resistência em *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) em culturas de milho GM Cry2Ab na África do Sul (Melo, V. T. Soccol., & C. R. Soccol, 2014). Essa ordem Lepidoptera possui uma característica de resistência devido a uma herança de um gene autossômico recessivo (Hernández-Rodríguez, Hernández-Martínez, Van Rie, Escriche, & Ferré, 2012).

Contudo, um recurso que está começando a se desenvolver é a exploração de inovações na biotecnologia nos últimos anos. A diversidade dos microrganismos associados a insetos e as pressões seletivas sobre eles, deve-se à variedade de habitats de cada espécie. Com isso, aumenta o estímulo a pesquisa sobre o conhecimento de novos organismos entomopatogênicos (BRACHMANN; BODE, 2013), incluindo aqueles não esporulantes.

## 7 CONCLUSÃO

O sequenciamento completo do gene *16s rRNA* e a classificação taxonômica de cada um dos isolados utilizados foram possíveis através da utilização de primers que cobriram toda a região de cada um deles, com isso podendo ter uma maior confiabilidade no dendrograma. Os isolados não esporulantes, as linhagens selvagens de Bt e o Dipel®, não tiveram efeitos de mortalidade sobre *S. frugiperda* e as lagartas desenvolveram normalmente.

O correto posicionamento taxonômico dos isolados não esporulantes do solo revelam novas possibilidades biotecnológicas a serem futuramente prospectados.



## REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, M. *et al.* Biological control of bacterial fruit blotch of watermelon pathogen (*Acidovorax citrulli*) with rhizosphere associated bacteria. **The Plant Pathology Journal**, Daejeon, v. 33, n. 2, p. 170–183, 2017. Available at: <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2016.0187>. Access in: 14 Aug. 2020.
- AIZAWA, T. *et al.* *Curtobacterium ammoniigenes* sp. nov., an ammonia-producing bacterium isolated from plants inhabiting acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 57, n. 7, p. 1447–1452, July 2007. Available at: <https://doi.org/10.1099 / ijs.0.011569-0>. Access in: 20 July 2020.
- ALMEIDA, W. E. S. **Caracterização parcial do gene 16S rRNA de isolados do solo e seus potenciais na solubilização de fosfato e influência crescimento de soja (*Glicine max*) e milho (*Zea mais*)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabau, 2017. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/148901>. Acesso em: 10 de nov. 2019.
- ALVES, H. O. Caracterização integral do gene 16s rrna de bactérias não esporulantes e sua ação contra *Anticarsia gemmatalis* (Hübner 1818) (Lepidoptera, Noctuidae). **Comunicação direta**. 2020.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct 1990. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2). Access in: 10 Jan. 2020.
- BARBOSA J.C., MALDONADO JUNIOR W. **AgroEstat** - Sistema para Análises Estatística de Ensaio Agrônomicos, UNESP, Jaboticabal. 2008.
- BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposition, development and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different hosts of economic importance. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 6, p. 996- 1001, Nov./Dec. 2010. Available at: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-566X2010000600023](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2010000600023). Access in: 10 Aug. 2020.
- BEHRENDT, U. *et al.* Diversity of grass-associated Microbacteriaceae isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 52, n. 5, p. 1441-1454, Sept. 2002. Available at: <https://doi.org/10.1099 / 00207713-52-5-1441>. Access in: 09 July 2020.
- BLANCO, C. A. *et al.* Susceptibility of isofamilies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac and Cry1Fa proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Southwestern Entomologist**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 409–415, Oct. 2010. Available at: [doi:10.3958/059.035.0325](https://doi.org/10.3958/059.035.0325). Access in: 05 Sept. 2020.

- BLANCO, C. *et al.* Current situation of pests targeted by Bt crops in Latin America. **Current Opinion in Insect Science**, [S. l.], v. 15, p. 131-138, June 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.04.012>. Access in: 14 Aug. 2020.
- BOBROWSKI, V. L. *et al.* Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 843–850, set./out. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000500008>. Acesso em: 12 ago. 2020.
- BOMBARDI, L. M. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a união europeia**. São Paulo: FFLCH-USP, 2017.
- BRACHMANN, A. O, & BODE H. B. Identification and bioanalysis of natural products from insect symbionts and pathogens. **Adv Biochem Eng Biotechnol.** (2013). 135:123–155. [https://doi.org/10.1007/10\\_2013\\_192](https://doi.org/10.1007/10_2013_192)
- BRADSHAW, C. J. A. *et al.* Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. **Nature Communications**, [S. l.], v. 7, n. 12986, Oct. 2016. Available at: <https://www.nature.com/articles/ncomms12986>. Access in: 12 Aug. 2020.
- BRAVO, A., GILL, S.S., & SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon.**; (2007). 49:423–435. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>.
- BUENO, A. F. *et al.* Inimigos naturais das pragas da soja. *In*: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. **Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-praga**. Brasília: Embrapa, 2012, p. 493-629.
- BURTET, L. M. *et al.* Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. **Pest Management Science**, [S. l.], v. 73, n. 12, p. 2569–2577, Dec. 2017. Available at: <https://doi.org/10.1002/ps.4660>. Access in: 25 July 2020.
- CAPINERA, J. L. **Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)**. Florida: University of Florida, IFAS Extension, 1999.
- CARR, G. *et al.* Microtermolides a and B from termite-associated *Streptomyces* sp. and structural revision of vinylamycin. **Organic Letters**, [S. l.], v. 14, n. 11, p. 2822–2825, May 2012. Available at: <https://doi.org/10.1021/ol301043p>. Access in: 11 July 2020.
- CARRERA, J. *et al.* Inhibition of nitrification by fluoride in high-strength ammonium wastewater in activated sludge. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 73–79, Sept. 2003. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00313-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00313-8). Access in: 20 July 2020.

Carvalho, C. H. S., Paiua, E., & Lagoas, S. (1995). **Milho transgenico**. *Fisiologia Da Planta Do Milho*, 20, 26.

Céleres, **Informativo Biotecnologia**, IB14.03, 16 December 2014. Céleres, Uberlândia, MG, Brazil (2014).

CHANDRASENA, D. I. *et al.* Characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis*-derived Cry1F  $\delta$ -endotoxin in *Spodoptera frugiperda* populations from Argentina. **Pest Management Science**, [S. l.], v. 74, n. 3, p. 746–754, Mar. 2017. Available at: <https://doi.org/10.1002/ps.4776>. Access in: 06 Aug. 2020.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Use of the genomic signature in bacterial classification and identification. **Systematic and Applied Microbiology**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 175–185, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1078/072320204322881790> Get rights and content. Access in: 15 May 2020.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**. *Boletim Acompanhamento Da Safra de Grãos 2017/18*, 178. Retrieved from <http://conab.gov.br>

CRAWFORD, J. *et al.* Small molecule perimeter defense in entomopathogenic bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences on the United States of America**, New York, v. 109, n. 27, p. 10821-10826, July 2012. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1201160109>. Access in: 07 Aug. 2020.

CUENCA, M. A. G. *et al.* Aspectos da Cultura do Milho: características e evolução da cultura no Estado do Maranhão entre 1990 e 2003. **Embrapa**, Aracaju, p. 1-31, dez. 2005.

DANGAL, V.; HUANG, F. Fitness costs of Cry1F resistance in two populations of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), collected from Puerto Rico and Florida. **Journal Invertebrate Pathology**, [S. l.], v. 127, p. 81–86, May 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.03.004>. Access in: 11 Feb. 2020.

DIDONÉ, D. A. *et al.* Increased transient genetic transformation in immature embryos of Brazilian BR 451 maize co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens*. **Acta Scientiarum: agronomy**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 1–6, 2018. Available at: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v40i1.36475>. Access in: 23 May 2020.

DING, L.; HIROSEM T.; YOKOTA, A. Four novel *Arthrobacter* species isolated from filtration substrate. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 59, n. 4, Apr. 2009. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65301-0>. Access in: 02 June 2020.

DUTRA, C. C. *et al.* (2012). *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) exhibits no preference between Bt and non-Bt maize fed *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **PLoS ONE** 7, California, v. 7, n. 9, Sept. 2012. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044867>. Access in: 28 Jan. 2020.

FARIAS, J. R. *et al.* Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, [S. l.], v. 64, p.150-158, Oct. 2014. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S026121941400204X>. Access in: 13 Jan. 2020.

FERNANDES, O. A.; CARNEIRO, T. R. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* no Brasil. *In*: PINTO, A. S.; NAVA, D. E.; ROSSI, M. M.; MALERBO-SOUZA, D. T. (Eds.). **Controle Biológico na Prática**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006. Cap. 2, p. 75-82.

FIGUEIREDO, M. D. L. C.; MARTINS-DIAS, A. M. P.; CRUZ, I. Relação entre a lagarta-do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1693–1698, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2006001200002>. Acesso em: 20 fev. 2020.

FU, Y. *et al.* Characterization of *Sinomonas gamaensis* sp. nov., a Novel Soil Bacterium with Antifungal Activity against *Exserohilum turcicum*. **Microorganisms**, [S. l.], v. 7, n. 6, June 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060170>. Access in: 10 Feb. 2020.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, [S. l.], v. 8, n. 3., p. 195-202, 1998. Available at: <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.195>. Access in: 10 Jan. 2020.

GOULD, F.; BROWN, Z. S.; KUZMA, J. Wicked evolution: can we address the sociobiological dilemma of pesticide resistance? **Science**, [S. l.], v. 360, n. 6390, p. 728–732, May 2018. Available at: <https://science.sciencemag.org/content/360/6390/728/tab-pdf>. Access in: 01 Sept. 2020.

GREENE, G. L.; LEPPLA; N. C., DICKERSON, W. A. Velvetbean catterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v. 69, n. 4, p. 487-488, Aug. 1976. Available at: <https://doi.org/10.1093/jee/69.4.487>. Access in: 04 Dec. 2019.

GÜRTLER, V.; MAYALL, B. C. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 3–16, Jan. 2001. Available at: <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-3>. Access in: 22 Feb. 2020.

HARMSSEN, D.; KARCH, H. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. **ASM News**, [S. l.], v. 70, n. 1, p. 19–24, Jan. 2004.

HECKEL, D. G. Roles of ABC Proteins in the Mechanism and Management of Bt Resistance. *In*: SOBERÓN, M.; GAO, Y.; BRAVO, A. (eds.). **Bt resistance – characterization and strategies for GM crops producing *Bacillus thuringiensis* toxins**. Boston: CABI biotechnology, 2015. Cap. 9, p. 138-149. Available at: <https://doi.org/10.1079/9781780644370.0098>. Access in: 20 Feb. 2020.

HEDGES, F. A bacterial wilt of bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* nov. sp. **Science**, [S. l.], v. 55, n. 1425, p. 433-434, Apr. 1922. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.55.1425.433>. Access in: 15 Dec. 2019.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S., HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P., VAN RIE, J., ESCRICHE, & B., FERRÉ, J. Specific binding of radiolabeled Cry1Fa insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* to midgut sites in lepidopteran species. **Appl Environ Microbiol**, (2012). 78, 4048–50. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.07591-11>

HUANG, F. *et al.* Cry1F Resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. **PLoS ONE**, California, v. 9, n. 11, Nov. 2014. Available at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112958>. Access in: 15 Nov. 2019.

HUTCHISON, W. D. *et al.* Areawide suppression of European corn borer with Bt maize reaps saving to non-Bt maize growers. **Science**, [S. l.], 2015, v. 330, n. 6001, p. 222-225, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1190242>. Access in: 02 Dec. 2019.

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

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. **ISAAA**, Ithaca, n. 49, 2014.

JANSSEN, P. *et al.* Beyond 100 genomes. **Genome Biology**, [S. l.], v. 4, n. 5, Apr. 2003. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC156585/>. Access in: 12 Feb. 2020.

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

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. **Current Opinion in Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 504–509, Oct. 2007. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.08.006>. Access in: 15 June 2020.

KRANTHI, K. R., DHAWAD, C. S., NAIDU, S. R., MATE, K., BEHERE, G. T., WADASKAR, R. M., KRANTHI, S. Inheritance of resistance in Indian *Helicoverpa armigera* (Hübner) to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Crop Protection**. (2006). V. 25, Pages 119-124. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.03.011>

KUHN, D. A.; STARR, M. P. *Arthrobacter atrocyaneus*, n. sp., and its blue pigment. **Archiv für Mikrobiologie**, [S. l.], v. 36, p. 175–181, June 1960. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00412285>. Access in: 14 Feb. 2020.

KUMANO, T. *et al.* Discovery of a sesamin-metabolizing microorganism and a new enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, New York, v. 113, n. 32, p. 9087–9092, July 2016. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1605050113>. Access in: 20 Jan. 2020.

KUMAR, S.; SINGH, A. Biopesticides: present status and the future prospects. **Journal of Fertilizers & Pesticides**, [S. l.], v. 6, n. 2, 2015. Available at: <https://doi.org/10.4172/2471-2728.1000e129>. Access in: 18 Jan. 2020.

LEHMANN, K. B.; NEUMANN, R. **Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik**. Munchen: J. F. Lehmann, 1896.

LIMA, J. F. M. *et al.* Ação de inseticidas naturais no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho cultivado em agroecossistema de várzea. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 607-613, 2008.

LUMACTUD, R. *et al.* Bacterial endophytes isolated from plants in natural oil seep soils with chronic hydrocarbon contamination. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 7, May 2016. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00755>. Access in: 21 Feb. 2020.

MA, Y. *et al.* Inoculation of *Brassica oxyrrhina* with plant growth promoting bacteria for the improvement of heavy metal phytoremediation under drought conditions. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 320, p. 36–44, Dec. 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.009>. Access in: 10 Dec. 2019.

MAGALHÃES, P. C.; DURAES, F. O. M.; PAIVA, E. **Fisiologia da planta de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 1995.

MANIKPRABHU, D. *et al.* Sunlight mediated synthesis of silver nanoparticles by a novel actinobacterium (*Sinomonas mesophila* MPKL 26) and its antimicrobial activity against multi drug resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 158, p. 202-205, May 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.01.018>. Access in: 15 Dec. 2019.

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

MELO, A. L. DE A., V. T. SOCCOL., & C. R. SOCCOL, *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, (2014). 36(2), 317–326. doi:10.3109/07388551.2014.960793

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

MICHELOTTO, M. D. *et al.* Interação entre transgênicos (Bt) e inseticidas no controle de pragas-chave em híbridos de milho-safrinha. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 71-79, jan./ março 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657v78p0712011>. Acesso em: 27 nov. 2010.

MISHRA, D. *et al.* Growth modes of nanoparticle superlattice thin films. **Nanotechnology**, [S. I.], v. 25, n. 20, Apr. 2014. Available at: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/20/205602>. Access in: 12 Nov. 2019.

MOORE, E. R. *et al.* Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons. **Research in Microbiology**, [S. I.], v. 161, n. 6, p. 430–438, July/ Aug. 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.007>. Access in: 16 Dec. 2019.

MUINCK, E. J. *et al.* A novel ultra high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing library preparation method for the Illumina HiSeq platform. **Microbiome**, [S. I.], v. 5, n. 68, July 2017. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0279-1>. Access in: 20 Jan. 2020.

NUÑEZ-VALDEZ, M. *et al.* Inhibition of *Spodoptera frugiperda* phenoloxidase activity by the products of the *Xenorhabdus rhabduscin* gene cluster. **PLoS One**, [S. I.], v. 14, n. 2, Feb. 2019. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212809>. Access in: 03 Dec. 2019.

OLIVEIRA, C. M. *et al.* Economic impact of exotic insect pests in Brazilian agriculture. **Journal of Applied Entomology**, [S. I.], v. 137, n. 1-2, p. 1–15, Feb. 2013. Available at: <https://doi.org/10.1111/jen.12018>. Access in: 12 Jan. 2020.

OMORI, W. P. *et al.* Influence of Vinasse Application in the Structure and Composition of the Bacterial Community of the Soil under Sugarcane Cultivation. **International Journal of Microbiology**, [S. I.], v. 2016, p. 1-11, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1155/2016/2349514>. Access in: 20 Jan. 2020.

OMOTO, C. *et al.* Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, [S. I.], v. 72, p. 1727–1736, 2016.

PALYS, T.; NAKAMURA, L. K.; COHAN, F. M. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 47, n. 4, p. 1145–1156, Oct. 1997. Available at: <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-1145>. Access in: 21 Feb. 2020.

PARK, Y. H. *et al.* Suprageneric classification of peptidoglycan group B actinomycetes by nucleotide sequencing of 5S ribosomal RNA. **Antonie Van Leeuwenhoek**, [S. l.], v. 64, p. 307–313, Sept. 1993. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00873089>. Access in: 21 Nov. 2019.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 166, n. 2, p. 99–110, Feb. 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.02.003>. Access in: 14 Dec. 2019.

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

REISIG, D. D.; REAY-JONES, F. P. F. Inhibition of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) growth by transgenic corn expressing Bt toxins and development resistance to Cry1Ab. **Environmental Entomology**, Oxford, v. 44, n. 4, 1275–1285, Aug. 2015. Available at: <https://doi.org/10.1093/ee/nvv076>. Access in: 12 July 2020.

RESENDE, D. C. *et al.* Adoção da área de refúgio e manejo de resistência de insetos em milho Bt. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 119–128, jan./ março 2014.

RUIU, L. **Insect pathogenic bacteria in integrated pest management**. *Insects*, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 352–367, Apr. 2015. Available at: <https://doi.org/10.3390/insects6020352>. Access in: 26 Feb. 2020.

ROH, J.Y., CHOI, J.Y., LI, M.S., JIN, B.R., & JE, Y.H. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. **J. Mol. Biol.** (2017). 17:547–559.

RUIZ, G.; JEISON, D.; CHAMY, R. Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. **Water Research**, [S. l.], v. 37, n. 6, p. 1371–1377, Mar. 2003. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00475-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00475-X). Access in: 24 Feb. 2020.

SACCHI, C. T. *et al.* Sequencing of 16S rRNA Gene: A Rapid Tool for Identification of *Bacillus anthracis*. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.] v. 8, n. 10, p. 1117–1123, Oct. 2002. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2730316/> Access in: 03 July 2020.



SAITOU AND NEI. **Mol. Biol. Evol.**, 1987. 4:406.

SCHLIEP, K. P. Phangorn: phylogenetic analysis in R. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 592-593, Feb. 2011. Available at: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>. Access in: 10 May 2020.

SCHMIDT, I. *et al.* New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 481–492, Oct. 2003. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00039-1](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00039-1). Access in: 12 Dec. 2019.

SENTHIL-NATHAN, S. A review of biopesticides and their mode of action against insect pests. *In*: TANGAVEL, P.; SRIDEVI, G. (Eds.). **Environmental Sustainability**. Springer: New Delhi, 2015. p. 49–63. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2056-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2056-5_3). Access in: 01 Aug. 2020.

SER, H. L. *et al.* Draft genome of amylolytic actinobacterium, *Sinomonas humi* MUSC 117T isolated from intertidal soil. **Marine Genomics**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 209–210, Dec. 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.margen.2015.05.012>. Access in: 17 Dec. 2019.

SIEBERT, M. W. *et al.* Evaluation of corn hybrids expressing Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry34Ab1/Cry35Ab1, and Cry3Bb1 against southern United States insect pests. **Journal of Economy Entomology**, Oxford, v. 105, n. 5, p. 1825–1834, Oct. 2012. Available at: <https://doi.org/10.1603/EC12155>. Access in: 20 Apr. 2020.

SILVA, A. B.; BESERRA, E. B.; DANTAS, J. P. Utilização de *Metarhizium anisopliae* e extratos vegetais para o controle de *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Revista Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 5, n. 1, p. 77-85, jan./ abr. 2008.

SILVA, S. M. *et al.* *Ocimum basilicum* essential oil combined with deltamethrin to improve the management of *Spodoptera frugiperda*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 41, n. 6, p. 665–675, Nov./ Dec. 2017. Available at: <https://doi.org/10.1590/1413-70542017416016317>. Access in: 20 Aug. 2020.

SILVA, T. R. F. B. *et al.* Effect of the flavonoid rutin on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Scientiarum: agronomy**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 165, 2016. Available at: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i2.27956>. Access in: 10 Dec. 2019.

SILVA, A. B.; BRITO, M. Controle biológico de insetos-pragas e suas perspectivas para o futuro. **Revista Agrotec**, João Pessoa, v. 36, n. 1, p. 248-258, 2015.

SOARES, R. M. *et al.* First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens* on soybean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 5, p. 452–454, Sept. /Oct. 2013. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762013000500012>. Access in: 15 Jan. 2020.

- SPARKS, A. N. A review of the biology of the fall armyworm. **The Florida Entomologist**, [S. l.], v. 62, n. 2, p. 82–87, June 1979.
- STACKEBRANDT, E.; EBERS, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. **Microbiology Today**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 6-9, Jan. 2006.
- STERN V. M. van den Bosch R. Experimentos de campo sobre os efeitos dos inseticidas. **Hilgardia**. 1959. 29 (2): 103-30. DOI: 10.3733
- STORER, N. P. *et al.* Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, Aug. 2010. Available at: <https://doi.org/10.1603/EC10040>. Access in: 14 Aug. 2020.
- TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to genetically engineered crops: successes and failures. **Information Systems for Biotechnology**, [S. l.], p. 1-4, 2014.
- TAKEBE, F. *et al.* *Brevibacillus nitrificans* sp. nov., a nitrifying bacterium isolated from a microbiological agent for enhancing microbial digestion in sewage treatment tanks. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 62, n. 9, Sept. 2012. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.032342-0>. Access in: 03 Dec. 2020.
- THORNE, J. L.; KISHINO, H.; PAINTER, I. S. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 15, n. 12, p. 1647–1657, Dec. 1998. Available at: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025892>. Access in: 12 Aug. 2020.
- TRIFINOPOULOS, J. *et al.* W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 232-235, July 2016. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>. Access in: 10 Aug. 2020.
- TRINGE, S. G.; HUGENHOLTZ, P. A renaissance for the pioneering 16S *rRNA* gene. **Current Opinion in Microbiology**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 442-446, Oct. 2008. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.011>. Access in: 20 Aug. 2020.
- TROJAN, D. G.; PRIA, M. D. Validação de escala diagramática para quantificação da severidade da antracnose da folha do milho. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 44, n. 1, p. 56–64, jan./mar. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/172675>. Acesso em: 12 abr. 2020.
- VILARINHO, E. C. *et al.* Movement of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) adults in maize in Brazil. **Florida Entomologist**, [S. l.], v. 94, n. 3, p. 480– 488, Sept. 2011.

VIMAL, S. R.; PATEL, V. K.; SINGH, J. S. Plant growth promoting *Curtobacterium albidum* strain SRV4: an agriculturally important microbe to alleviate salinity stress in paddy plants. **Ecological Indicators**, [S. l.], v. 105, p. 553–562, Oct. 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.05.014>. Access in: 10 Feb. 2020.

VOJTECH, E.; MEISSLE, M.; POPPY, G. M. Effects of Bt maize on the herbivore *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) and the parasitoid *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae). **Transgenic Research**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 133–144, Apr. 2005. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11248-005-2736-z>. Access in: 10 July 2020.

WAGG, C.; BENDER, S. F.; WIDMER, F. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. **Proceedings of the National Academy of the United States of America**, [S. l.], v. 111, n. 14, p. 5266–5270, March 2014. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1320054111>. Access in: 22 Oct. 2019.

WAQUIL, M. S. *et al.* Índice de adaptabilidade e tempo letal da lagarta-do-cartucho em milho Bt. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 5, p. 563–570, maio 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500017>. Acesso em: 19 fev. 2020.

WEISBURG, W. G. *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 173, n. 2, p. 697-703, Jan. 1991. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>. Access in: 20 July 2020.

WU, MN, JOINER, WJ, DEAN, T., YUE, Z., SMITH, CJ, CHEN, D., HOSHI, T., SEHGAL, A., KOH, K. SLEEPLESS, um membro da família Ly-6 / neurotoxina, regula os níveis, a localização e a atividade do Shaker. **Nat. Neurosci.** (2010). 13 (1) : 69--75.

YAMADA, K., & KOMAGATA, K. Taxonomic studies on coryneform bacteria V: Classification of coryneform bacteria. **Journal of General and applied Microbiology**, (1972). v.18, n.6, p. 417-431. <https://doi.org/10.2323/jgam.18.417>

YU, S. **The toxicology and biochemistry of insecticides**. Boca Raton: CRC Press, 2008.

ZHOU, Y. *et al.* Description of *Sinomonas soli* sp. nov., reclassification of *Arthrobacter echigonensis* and *Arthrobacter albidus* (Ding et al. 2009) as *Sinomonas echigonensis* comb. nov. and *Sinomonas albida* comb. nov., respectively, and emended description of the genus *Sinomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 62, n. 4, Apr. 2012. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.030361-0>. Access in: 13 June 2020.

ZHOU, Y. *et al.* Proposal of *Sinomonas flava* gen. nov., sp. nov., and description of *Sinomonas atrocyanea* comb. nov. to accommodate *Arthrobacter*

atrocyaneus. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 59, n. 2, Feb. 2009. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000695-0>. Access in: 25 Feb. 2020.