

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

Bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* de cana-de-açúcar: Isolamento, caracterização e potencial entomopatogênico contra *Telchin licus licus* (Drury) (Lepidoptera:Castniidae) em laboratório

Francine Yuriuko Otsuka Rocha

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO GÊNERO *Bacillus* DE CANA-DE-
AÇÚCAR: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL
ENTOMOPATOGÊNICO CONTRA *Telchin licus licus* (DRURY)
(LEPIDOPTERA:CASTNIIDAE) EM LABORATÓRIO**

FRANCINE YURIKO OTSUKA ROCHA

Sob a Orientação do
Ph.D. José Ivo Baldani

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutora em
Fitotecnia** no Curso de Pós-Graduação
em Fitotecnia, Área de concentração em
Produção Vegetal

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2020

R672b Rocha, Francine Yuriiko Otsuka, 1991-
Bactérias endofíticas do gênero Bacillus de cana-de
açúcar: Isolamento, caracterização e potencial
entomopatogênico contra *Telchin licus licus* (Drury)
(Lepidoptera:Castniidae) em laboratório / Francine
Yuriiko Otsuka Rocha. - Seropédica, 2020.
102 f.: il.

Orientador: José Ivo Baldani. Tese(Doutorado). -
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, 2020.

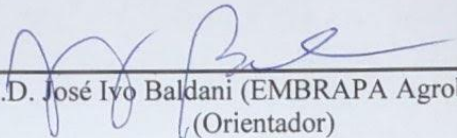
1. Controle biológico. 2. Broca gigante. 3.
Saccharum officinarum L.. I. Baldani, José Ivo, 1953
, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-graduação em Fitotecnia III.
Título.

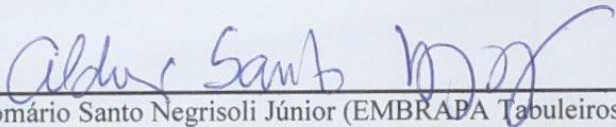
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

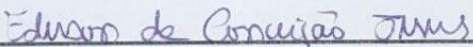
FRANCINE YURIKO OTSUKA ROCHA

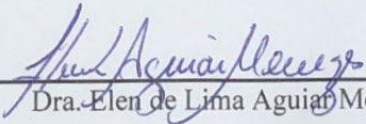
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Fitotecnia, no
Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Produção Vegetal.

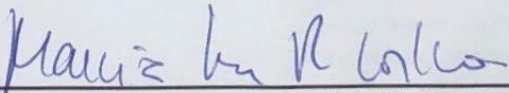
TESE APROVADA EM 20/02/2020


Ph.D. José Ivo Baldani (EMBRAPA Agrobiologia)
(Orientador)


Dr. Aldomário Santo Negrisoli Júnior (EMBRAPA Tabuleiros Costeiros)


Dr. Ederson da Conceição Jesus (EMBRAPA Agrobiologia)


Dra. Elen de Lima Aguiar Menezes (UFRRJ)


Dra. Márcia Reed Rodrigues Coelho (EMBRAPA Agrobiologia)

DEDICATÓRIA

Faço aqui uma dedicatória especial deste trabalho às mulheres da ciência, para que nunca deixem de brilhar e aos cientistas que contribuem para o avanço da humanidade mesmo em momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela possibilidade de realização do valioso curso de pós-graduação.

À Embrapa Agrobiologia pela estrutura para execução da pesquisa.

À Capes pelo subsídio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes) - Código de Financiamento 001 (PORTARIA Nº 206, DE 4 DE SETEMBRO DE 2018 DA CAPES).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ.

Ao meu orientador José Ivo Baldani pela prontidão em me orientar e ensinamentos.

À Embrapa Tabuleiros Costeiros, em especial ao pesquisador Aldomário Santo Negrisoli Júnior pela parceria e contribuição no projeto.

À pesquisadora Carolina Rodrigues de Araújo da Embrapa Agrobiologia pela colaboração e ensinamentos.

À banca examinadora pela disponibilidade em participar da defesa da tese.

Aos pesquisadores Alejandra Bravo e Mário Soberón por me receberem de braços abertos no laboratório durante o período do doutorado sanduíche na Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Aos meus pais, pelo incentivo, amor, carinho e dedicação com a minha educação. Sem o apoio de vocês não teria chegado aqui.

As minhas irmãs pela amizade e momentos de descontração.

Ao meu noivo Júlio, pelo incentivo, compreensão, auxílio e paciência durante as crises de ansiedade.

A minha família pela compreensão nos momentos de ausência.

A todos do Laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia, pelas conversas, troca de conhecimentos e por tornarem meu dia a dia no laboratório mais leve. Faço aqui um agradecimento especial a analista Carolina Nachi Rossi pela amizade, por sempre estar a postos para solucionar os problemas e por tornar o dia a dia do laboratório mais fácil.

A Patrícia Gitahy pela amizade e por sempre estar disposta a me auxiliar ao longo deste projeto de pesquisa.

Às amigas de Embrapa, de casa e de vida Amanda, Beth e Tati, que mesmo quando estamos longe, estão dispostas a ajudar. Obrigada pela amizade, carinho, ombro amigo e incentivo. Sem vocês teria sido difícil.

Ao Gustavo Feitosa pelo auxílio com as análises.

Às amigas Tackla e Nubia pelas conversas e por entenderem a ausência.

A Samira, Mary Carmen e Nathaly pela amizade e por tornarem meus dias no México mais divertidos.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento e finalização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

ROCHA, Francine Yuriko Otsuka. **Bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* de cana-de-açúcar: Isolamento, caracterização e potencial entomopatogênico contra *Telchin licus licus* (Drury) (Lepidoptera:Castniidae) em laboratório.** 2020. 102p Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Telchin licus licus (broca gigante) é uma praga que atinge a cultura da cana-de-açúcar, podendo ocasionar perdas elevadas na produção quando incidente na área de cultivo. Essa praga possui uma maior ocorrência na região Nordeste do Brasil e seu controle é bastante difícil. O uso de bactérias do gênero *Bacillus*, principalmente *B. thuringiensis* (*Bt*) tem se mostrado eficiente no controle de pragas das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hemiptera e Hymenoptera. Desta forma, este trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar estirpes endofíticas do gênero *Bacillus* de áreas produtoras de cana-de-açúcar e avaliar o potencial entomopatogênico contra larvas da broca gigante em condições de laboratório. Para tanto foram coletadas lagartas deste inseto, colmos e raízes de cana-de-açúcar de três usinas produtoras do estado de Alagoas para o isolamento de bactérias. Todas as amostras obtidas passaram pelo processo de pasteurização por duas vezes, tendo como resultados 425 isolados bacterianos (108 do líquido do apoplasto, 48 do trato digestivo da broca gigante, 94 das raízes e 175 da região central dos entrenós). Os isolados bacterianos foram caracterizados fenotipicamente através da coloração de Gram. A característica de Gram-positiva foi evidenciada para 161 dos 425 isolados (46 Gram-positivos originários do líquido do apoplasto, 19 do trato digestivo, 50 das raízes e 46 da região central dos entrenós). A caracterização taxonômica das bactérias, utilizando o método de amplificação da região 16S RNAr, mostrou que os isolados pertenciam em sua maioria ao gênero *Bacillus*, seguido dos gêneros *Paenibacillus*, *Lysinibacillus* e *Terribacillus*. As análises filogenéticas indicaram que 11,5% dos isolados foram filogeneticamente agrupados com a espécie *B. megaterium*, seguido de 10,8% para a espécie *B. safensis*, 10% para a espécie *B. cereus*, 8,9% para *B. oleronius*, 7% para *B. amyloliquefaciens* e 6% dos isolados para *B. pacificus*. A construção da árvore filogenética utilizando o programa MEGA v.7.0, permitiu dividir os isolados bacterianos em 18 grupos. Análises das regiões BOX foram realizadas de modo a separar os grupos bacterianos e determinar o grau de diversidade entre os isolados. Genes conservados (*housekeeping*) e genes *cry* foram amplificados através da técnica de PCR, respectivamente para a identificação das espécies de *Bacillus* e caracterização das bactérias quanto ao tipo de toxina produzida. Os agrupamentos com os genes conservados mostraram correspondência de sete isolados (FORCN075, FORCN076, FORCN089, FORCN090, FORNC091, FORCN092 e FORCN093) com a espécie *B. thuringiensis* serovar *berliner*. A partir da amplificação dos genes *cry*, foram identificados seis isolados (FORCN007, FORCN012, FORCN014, FORCN087, FORCN092 e FORCN096) contendo o gene *cry2*. O potencial de controle das espécies bacterianas contra lagartas da broca gigante foi avaliado em bioensaios utilizando as bactérias pertencentes ao grupo das espécies filogeneticamente próximas de *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. wiedmanni*, além das estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* estirpe S76 e a estirpe comercial HD-1. As bactérias FORCN014 (isolado do líquido do apoplasto) e FORCN066 (isolado a partir de raízes) apresentaram resultados interessantes nos bioensaios realizados, já que garantiram percentual de controle de 42,9% e 57,1%, respectivamente, no bioensaio 1. No bioensaio 2 o percentual de controle foi de 37,5% (FORCN014) e 50% (FORCN066) enquanto que no bioensaio 3 ambos os isolados tiveram percentual de controle de 50% das lagartas da broca gigante.

Palavras-chave: Controle biológico, Broca gigante, *Saccharum officinarum* L.

ABSTRACT

ROCHA, Francine Yuriko Otsuka. **Endophytic bacteria of the *Bacillus* genus in sugarcane: Isolation, characterization and entomopathogenic potential against *Telchin licus licus* (Drury) (Lepidoptera: Castniidae) in laboratory.** 2020. 102p Thesis (Doctorate degree in Crop Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Telchin licus licus (giant borer) is a pest that affects the sugarcane crop and can cause high yield losses when incident on the crop area. This pest has a greater occurrence in the Northeast region of Brazil and its control is quite difficult. The use of bacteria of the genus *Bacillus*, mainly *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) has been shown to be efficient in the control of pests of the orders Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hemiptera and Hymenoptera. Thus, this work aimed to isolate and characterize endophytic strains of the *Bacillus* genus from sugarcane producing areas and evaluate the entomopathogenic potential against larvae of the giant borer in laboratory conditions. For this purpose, larvae of this insect, stalks and roots of sugarcane were collected from three producing areas in the State of Alagoas for the isolation of bacteria. All samples obtained were pasteurized twice, resulting in 425 bacterial isolates (108 from the apoplast fluid, 48 from the digestive tract of the giant borer, 94 from the roots and 175 from the central region of the internodes). Bacterial isolates were phenotypically characterized by Gram staining. The Gram-positive characteristic was evidenced for 161 of the 425 isolates (46 Gram-positive originating from the apoplast fluid, 19 from the digestive tract, 50 from the roots and 46 from the central region of the internodes). The taxonomic characterization of the bacteria, using the 16S rRNA region amplification method, showed that the isolates belonged mostly to the genus *Bacillus*, followed by the *Paenibacillus*, *Lysinibacillus* and *Terribacillus* genera. Phylogenetic analyzes indicated that 11.5% of the isolates were phylogenetically grouped with *B. megaterium* species, followed by 10.8% for *B. safensis*, 10% for *B. cereus*, 8.9% for *B. oleronius*, 7% for *B. amyloliquefaciens* and 6% of the isolates for *B. pacificus*. The construction of the phylogenetic tree using the MEGA v.7.0 program allowed the bacterial isolates to be clustered in 18 groups. Analyzes of the BOX regions were performed in order to separate the bacterial groups and determine the degree of diversity between the isolates. Conserved genes (*housekeeping*) and *cry* genes were amplified through the PCR technique, respectively for the identification of *Bacillus* species and characterization of bacteria regarding the type of toxin produced. The clusters with the conserved genes showed correspondence of seven isolates (FORCN075, FORCN076, FORCN089, FORCN090, FORCN091, FORCN092 and FORCN093) with *B. thuringiensis* serovar *berliner*. From the amplification of the *cry* genes, six isolates (FORCN007, FORCN012, FORCN014, FORCN087, FORCN092 and FORCN096) were identified containing the *cry2* gene. The potential of control of bacterial species against larvae of the giant borer was evaluated in bioassays using bacteria belonging to the group of species phylogenetically close to *B. thuringiensis*, *B. cereus* and *B. wiedmanni*, in addition to the strains of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain S76 and the commercial strain HD-1. The bacteria FORCN014 (isolated from apoplast fluid) and FORCN066 (isolated from roots) showed interesting results in the bioassays performed, since they guaranteed a control percentage of 42.9% and 57.1%, respectively, in bioassay 1. In the bioassay 2 the control percentage was 37.5% (FORCN014) and 50% (FORCN066) and in bioassay 3 both isolates showed a control percentage of 50% of the giant borer larvae.

Key words: Biological control, Giant borer, *Saccharum officinarum* L.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Colmo de cana-de-açúcar oco devido ao ataque da broca gigante (*Telchin licus licus*). Alagoas, junho de 2016. 3
- Figura 2. Broca gigante (*Telchin licus licus*) na forma larval atacando colmo de cana-de-açúcar. Alagoas, junho de 2016. 3
- Figura 3. Área atacada pela broca gigante (*Telchin licus licus*), com falhas de brotação. Alagoas, junho de 2016. 3
- Figura 4. Sintoma de coração morto (secamento dos ponteiros) destacados com setas. Alagoas, junho de 2016. 4
- Figura 5. Ciclo biológico completo da broca gigante (*Telchin licus licus*). Fotos: Francine Yuriko Otsuka Rocha, 2016. 5
- Figura 6. Ciclo de vida da bactéria *Bacillus thuringiensis* (BIOSANI, sem data). 9
- Figura 7. Morfologia das inclusões parasporais da estirpe SY49-1 de *B. thuringiensis*. B) Bipiramidal, C) Cubóide, I) Esférica de forma irregular, S) Esférica e Sp) Esporo (AZIZOGLU et al., 2016). 11
- Figura 8. Modo de ação das proteínas 3D-Cry (adaptada de SOBERÓN, GILL & BRAVO, 2009). 13
- Figura 9. Tamanho das protoxinas Cry e local de clivagem pelas proteases. As listradas representam a toxina ativa. Setas sólidas representam sítios de clivagem N- e C-terminal e as pontilhadas representam local de clivagem intramolecular (BRAVO et al., 2007). 13
- Figura 10. Trato digestivo da broca gigante (*Telchin licus licus*). 23
- Figura 11. Lagarta de *Telchin licus licus* grande (tamanho acima de cinco centímetros). 29
- Figura 12. Lagarta de *Telchin licus licus* média (tamanho entre quatro e cinco centímetros). 29
- Figura 13. Lagarta de *Telchin licus licus* pequena (tamanho até quatro centímetros). 29
- Figura 14. Tubos de vidro utilizados no bioensaio contendo dieta inoculada com suspensão de esporos e cristais seguidos da introdução da lagarta da broca gigante. 30
- Figura 15. Toletes de cana-de-açúcar usados nos bioensaios contra *Telchin licus licus*. A) Inoculação da toxina de *Bacillus* nos toletes de cana-de-açúcar variedade RB 867515 e B) Toletes inoculados com a toxina acondicionados em tubos com capacidade de 150mL. 30
- Figura 16. Administração forçada de dieta líquida com a toxina produzida por isolados de *Bacillus* em lagartas da broca gigante. 31
- Figura 17. Visão geral da diversidade de colônias em meio BHI usado para o isolamento de bactérias presentes na região central dos entrenós (A), no líquido do apoplasto (B), nas raízes de cana-de-açúcar (C) e no trato digestivo da broca gigante (D). 33
- Figura 18. Eletroforese em gel de agarose a 2,0% mostrando os perfis de bandas dos isolados bacterianos de diferentes nichos de plantas de cana-de-açúcar e do trato digestivo da broca gigante. Perfis gerados após a amplificação por PCR das regiões BOX utilizando o iniciador A1R. Perfis de bandas de *Bt* S76 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* estirpe S76), FORCN001 (*B. licheniformis*), FORCN002 (*B. licheniformis*), FORCN003 (*B. megaterium*), FORCN004 (*B. aerius*), FORCN005 (*B. thuringiensis*), FORCN006 (*B. subtilis*), FORCN007 (*B. wiedmannii*), FORCN008 (*B. proteolyticus*), FORCN009 (*B. subterraneus*), FORCN010 (*B. cereus*), FORCN011 (*B. cereus*), FORCN012 (*B. cereus*), FORCN013 (*B. australimaris*), FORCN014 (*B. cereus*), FORCN016 (*Paenibacillus vulneris*), FORCN017 (*B. aerius*), FORCN018 (*B. aerius*), FORCN019 (*B. megaterium*), FORCN020 (*B. aerius*), FORCN021 (*B. aerius*), FORCN023 (*B. aerius*), FORCN025 (*B. megaterium*) e FORCN026 (*B. safensis*). 35
- Figura 19. Dendrograma de similaridade UPGMA de padrões BOX-PCR de 159 isolados bacterianos de plantas de cana-de-açúcar e do trato digestivo da broca gigante (Continua). 37

- Figura 20. Relações filogenéticas de bactérias isoladas de diferentes nichos de cana-de-açúcar estimada com base na sequência do 16S rRNA. A árvore foi obtida utilizando o método estatístico *Neighbor-Joining* (NJ) e o modelo Kimura 2-parâmetros como indicado pela função de teste de modelo do programa MEGA 7.0. Valores de Bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 réplicas. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. Legenda ao lado da identificação dos isolados: 1-Usina Coruripe; 2-Usina Triunfo; 3-Usina Santo Antônio; A-Isolado do apoplasto; B-Isolado da broca gigante; C-Isolado da região central dos entrenós e R-Isolado de raízes de cana-de-açúcar. *Escherichia/Shigella flexneri* foi usado como grupo externo. 44
- Figura 21. Relações filogenéticas de bactérias isoladas do trato digestivo da broca gigante estimada com base na sequência do 16S rRNA. A árvore foi obtida utilizando o método estatístico *Neighbor-Joining* (NJ) e o modelo Kimura 2-parâmetros como indicado pela função de teste de modelo do programa MEGA 7.0. Valores de Bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 réplicas. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. *Escherichia coli* foi usado como grupo externo. 51
- Figura 22. Gel de agarose 1% mostrando o produto de amplificação de PCR (700pb) obtidos com os iniciadores específicos para o gene *cry2* de *Bacillus thuringiensis*. 53
- Figura 23. Eletroforese em gel de agarose (1,5%), mostrando o produto de amplificação por PCR de 246pb com os iniciadores específicos para o regulador transcricional XRE. As setas indicam as estirpes com resultado positivo. 54
- Figura 24. Árvore filogenética utilizando o método *Neighbor-Joining* estimado a partir de 440 posições de nucleotídeos do gene *glp*. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura 3-parâmetros como indicado pela função de teste de modelo do programa MEGA 7.0. Valores de Bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 réplicas. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. Sequências de espécies do gênero *Bacillus* depositadas no banco de dados NCBI foram utilizadas para agrupar os isolados bacterianos no dendrograma. 56
- Figura 25. Árvore filogenética construída utilizando o método *Neighbor-Joining* estimado a partir de 463 posições de nucleotídeos do gene *gmk*. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura 3-parâmetros como indicado pela função de teste de modelo do programa MEGA 7.0. Valores de Bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 réplicas. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. Sequências de espécies do gênero *Bacillus* depositadas no banco de dados NCBI foram utilizadas para agrupar os isolados bacterianos no dendrograma. 57
- Figura 26. Árvore filogenética utilizando o método *Neighbor-Joining* estimado a partir de 498 posições de nucleotídeos do gene *pta*. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura 3-parâmetros como indicado pela função de teste de modelo do programa MEGA 7.0. Valores de Bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 réplicas. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. Sequências de espécies do gênero *Bacillus* depositadas no banco de dados NCBI foram utilizadas para agrupar os isolados bacterianos no dendrograma. 58
- Figura 27. Árvore filogenética utilizando o método *Neighbor-Joining* estimado a partir de 453 posições de nucleotídeos do gene *tpi*. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura 3-parâmetros como indicado pela função de teste de modelo do programa MEGA 7.0. Valores de Bootstrap são mostrados quando as relações

representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 réplicas. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. Sequências de espécies do gênero *Bacillus* depositadas no banco de dados NCBI foram utilizadas para agrupar os isolados bacterianos no dendrograma. 59

Figura 28. Árvore filogenética utilizando o método *Neighbor-Joining* estimado a partir de 480 posições de nucleotídeos do gene *pycA*. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura 3-parâmetros como indicado pela função de teste de modelo do programa MEGA 7.0. Valores de Bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 réplicas. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. Sequências de espécies do gênero *Bacillus* depositadas no banco de dados NCBI foram utilizadas para agrupar os isolados bacterianos no dendrograma. 60

Figura 29. Árvore filogenética utilizando o método *Neighbor-Joining* estimado a partir de 541 posições de nucleotídeos do gene *ilvD*. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura 3-parâmetros como indicado pela função de teste de modelo do programa MEGA 7.0. Valores de Bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 réplicas. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. Sequências de espécies do gênero *Bacillus* depositadas no banco de dados NCBI foram utilizadas para agrupar os isolados bacterianos no dendrograma. 61

Figura 30. Árvore filogenética utilizando o método *Neighbor-Joining* estimado a partir das sequências concatenadas de quatro genes conservados (*glp*, *gmk*, *pta* e *tpi*). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura 3-parâmetros como indicado pela função de teste de modelo do programa MEGA 7.0. Valores de Bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 réplicas. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. Sequências de espécies do gênero *Bacillus* depositadas no banco de dados NCBI foram utilizadas para agrupar os isolados bacterianos no dendrograma. 62

Figura 31. Esporos e cristais produzidos por isolados bacterianos 24, 48 e 72 horas após o crescimento em meio HCT. FORCN005 (*B. thuringiensis*), FORCN048 (*B. cereus*), FORCN104 (*B. wiedmannii*), HD1 e S76 (estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*). 63

Figura 32. Géis de poliacrilamida a 10% para visualização de proteínas produzidas por isolados bacterianos do gênero *Bacillus*. A) Perfil de proteína dos isolados *Bacillus thuringiensis* estirpe S76, *Bacillus thuringiensis* estirpe HD-1; FORCN066; FORCN014; FORCN010; FORCN008 e FORCN005. B) Perfil de proteína dos isolados FORCN093; FORCN138; FORCN071; FORCN049; FORCN069; FORCN012; FORCN067; FORCN011 e FORCN090. C) Perfil de proteína dos isolados FORCN089; FORCN007; FORCN134; FORCN135; FORCN087; FORCN041; FORCN068; FORCN096 e FORCN091. D) Perfil de proteína dos isolados FORCN139; FORCN076; FORCN048; FORCN070; FORCN092; FORCN103; FORCN131; FORCN075 e FORCN047. E) Perfil de proteína dos isolados FORCN040 e FORCN104. 64

Figura 33. Taxa de mortalidade das lagartas de *Telchin licus licus* no bioensaio 1. Avaliação realizada após 15 dias do início do bioensaio com dieta artificial contendo 100µL de suspensão bacteriana esporulada. Bioensaio realizado em julho de 2018. 65

Figura 34. Taxa de mortalidade das lagartas de *Telchin licus licus* no bioensaio 2. Avaliação realizada após 15 dias do início do bioensaio com dieta artificial contendo 100µL de suspensão bacteriana esporulada. Bioensaio realizado em setembro de 2018. 65

Figura 35. Taxa de mortalidade das lagartas de *Telchin licus licus* no bioensaio 3. Avaliação realizada após 15 dias do início do bioensaio com dieta artificial contendo 100µL de suspensão bacteriana esporulada. Bioensaio realizado outubro de 2018. 66

- Figura 36. Presença de nematoide no interior de lagartas da broca gigante. 66
- Figura 37. Taxa de mortalidade das lagartas de *Telchin licus licus* no bioensaio 4. Avaliação realizada após 15 dias do início do bioensaio com toletes de cana-de-açúcar inoculados com toxinas de *Bacillus* na concentração de 1000ng/cm². Bioensaio realizado em outubro de 2019. 67
- Figura 38. Taxa de mortalidade das lagartas de *Telchin licus licus* no bioensaio 5. Avaliação realizada após 15 dias do início do bioensaio com dieta líquida (4μL de toxina) adicionada diretamente no aparato bucal das lagartas na concentração de 2000ng/cm². Bioensaio realizado em dezembro de 2019. 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localização de usinas de cana-de-açúcar de três municípios do Estado de Alagoas utilizadas para a coleta de material vegetal e número de entrenós das variedades de cana cultivadas.	21
Tabela 2. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes <i>cry1</i> , <i>cry2</i> e <i>cry9</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	26
Tabela 3. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes <i>housekeeping</i> .	27
Tabela 4. Descrição dos cinco bioensaios <i>in vitro</i> contra a broca gigante da cana-de-açúcar e seus respectivos tratamentos.	32
Tabela 5. Efeito do segundo processo de pasteurização no número de isolados e porcentagem de bactérias que apresentaram coloração de Gram positiva.	34
Tabela 6. Análise filogenética com base nas sequências 16S rRNA das estirpes bacterianas endofíticas isoladas de diferentes nichos de plantas de cana-de-açúcar e do trato digestivo da broca gigante coletadas em áreas produtoras de cana-de-açúcar do estado de Alagoas (Continua).	40
Tabela 7. Análise filogenética com base nas sequências 16S rRNA de estirpes bacterianas isoladas do trato digestivo da broca gigante coletadas em áreas produtoras de cana-de-açúcar do estado de Alagoas.	49
Tabela 8. Características dos isolados bacterianos pertencentes ao grupo de <i>Bacillus cereus</i> .	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1	A cultura da cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	2
2.2	A broca gigante da cana de-açúcar (<i>Telchin licus licus</i>)	2
2.2.1	Medidas de controle de <i>Telchin licus licus</i>	5
2.3	O gênero <i>Bacillus</i> - ocorrência, espécies e uso na agricultura	6
2.4	<i>Bacillus thuringiensis</i>	7
2.4.1	Histórico de <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
2.4.2	Ciclo de vida de <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
2.4.3	Características e Ecologia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
2.4.4	Tipos de toxinas produzidas por <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
2.4.4.1	δ -endotoxinas	11
2.4.5	Modo de ação das toxinas Cry	13
2.4.6	Uso de <i>Bacillus thuringiensis</i> como agente de controle biológico	15
2.5	Uso de bactérias endofíticas para promoção de crescimento e controle de pragas e doenças	16
3	JUSTIFICATIVA	18
4	HIPÓTESE	20
5	OBJETIVOS	20
5.1	Objetivo Geral	20
5.2	Objetivos Específicos	20
6	MATERIAL E MÉTODOS	21
6.1	Coleta de material em usinas no estado de Alagoas	21
6.2	Obtenção das amostras para isolamento de bactérias endofíticas da cana-de-açúcar	22
6.2.1	Bactérias do líquido do apoplasto de plantas de cana-de-açúcar	22
6.2.2	Bactérias da região central dos entrenós de cana-de-açúcar	22
6.2.3	Bactérias das raízes de cana-de-açúcar	22
6.3	Obtenção de amostras para isolamento de bactérias presentes no trato digestivo das lagartas	23
6.4	Processo de pasteurização e isolamento das bactérias formadoras de endósporos	23
6.5	Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos através da coloração de Gram	24
6.6	Extração de DNA	24
6.7	Análise da diversidade bacteriana dos isolados de <i>Bacillus</i> originários de tecidos da cana-de-açúcar e do trato digestivo da broca gigante	24
6.8	Amplificação e sequenciamento da região 16S rRNA	25

6.9	Caracterização genotípica	26
6.9.1	Amplificação dos genes <i>cry1</i> , <i>cry2</i> e <i>cry9</i>	26
6.9.2	Amplificação do biomarcador XRE	26
6.9.3	Amplificação dos genes <i>housekeeping gmk</i> , <i>glp</i> , <i>pycA</i> , <i>pta</i> , <i>ilvD</i> e <i>tpi</i>	27
6.10	Indução de esporulação e produção de cristais proteicos	28
6.11	Obtenção de proteína de <i>Bacillus thuringiensis</i> (esporos/cristais)	28
6.12	Avaliação da capacidade entomopatogênica de <i>Bacillus</i> contra a broca gigante (<i>Telchin licus licus</i>) - bioensaios <i>in vitro</i>	29
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
7.1	Isolamento de bactérias do gênero <i>Bacillus</i> do apoplasto, da região central dos entrenós, das raízes e do trato digestivo de <i>Telchin licus licus</i>	33
7.2	Isolados bacterianos crescidos após o segundo processo de pasteurização e caracterização fenotípica	34
7.3	Diversidade bacteriana dos isolados de cana-de-açúcar e da broca gigante	35
7.4	Caracterização taxonômica dos isolados bacterianos	39
7.5	Caracterização genotípica	53
7.5.1	Amplificação de genes <i>cry</i>	53
7.5.2	Amplificação pela técnica de PCR do biomarcador XRE	54
7.5.3	Amplificação de genes conservados “ <i>housekeeping</i> ” no genoma das estirpes	56
7.6	Indução de esporulação e produção de cristais proteicos	63
7.7	Obtenção de proteínas produzidas por <i>B. thuringiensis</i>	64
7.8	Bioensaios <i>in vitro</i> para avaliação da capacidade entomopatogêncica de estirpes de <i>Bacillus</i> contra lagartas da broca gigante	65
8	CONCLUSÕES	70
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
10	APOIO FINANCEIRO	71
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
12	ANEXOS	86
	Anexo A – Solução salina (BALDANI, 1980)	86
	Anexo B – Preparo de Meio HCT para esporulação de <i>Bacillus thuringiensis</i> (MUÑOZ-GARAY et al., 2009)	87
	Anexo C – Dieta artificial para criação de <i>D. saccharalis</i> (PARRA & MISHFELDT, 1992)	88

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma planta originária de regiões temperadas quentes e tropicais do sul da Ásia (QUECINE et al., 2014). O Brasil é um dos grandes produtores de cana-de-açúcar do mundo e a região Centro-Sul é a que mais contribui com os índices de produção (CONAB, 2019). A cultura canavieira gera um elevado fluxo de caixa no Brasil, sendo de grande importância para a economia do país (NOVA CANA, 2019).

Mesmo apresentando elevados índices de produção, a cultura canavieira sofre muitas perdas, ocasionadas em sua maioria por fatores abióticos e fatores fitossanitários. Dentre este último, estão os ataques de pragas à cultura. Os insetos *Telchin licus licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae), *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae) e *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) são exemplos de pragas que podem levar a muitas perdas de produção nas usinas produtoras de cana-de-açúcar (GARCIA, 2013).

A praga *T. l. licus*, conhecida popularmente como broca gigante, tem maior ocorrência na região Nordeste, podendo acarretar perdas de 20 a 60% da produção (ROSSETTO & SANTIAGO, 2013). Esta praga já foi relatada em regiões produtoras de importância agrícola, como no estado de São Paulo, Sul de Minas Gerais, Paraná e Mato Grosso do Sul (CANA ONLINE, 2015) aumentando assim o interesse em desenvolver tecnologias para o controle deste inseto.

O ataque do inseto à cultura da cana-de-açúcar ocorre durante o estágio de desenvolvimento larval. Ao se alimentar da planta, o inseto abre galerias nos colmos deixando-os ocos e após as lagartas consumirem toda a reserva deste colmo, elas migram para o colmo ao lado, abrindo novas galerias. Além de afetar a produtividade, o ataque das lagartas da broca gigante inibe o desenvolvimento das plantas, já que pode ocasionar o secamento dos ponteiros.

Ainda não existem métodos viáveis para controle da broca gigante, sendo necessário estudar novas tecnologias para evitar as perdas de produção ocasionadas por essa praga. Uma das alternativas de controle a ser estudada é o uso de microrganismos endofíticos com atividade entomopatogênica.

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Berliner, 1915) é o microrganismo utilizado com maior sucesso no controle de insetos, podendo ser uma alternativa para o controle desta praga. A eficiência da bactéria *Bt* no controle de insetos se deve à característica da mesma em produzir esporos, o que garante sua sobrevivência sob condições adversas (BOBROWSKI et al., 2003). Além disso, durante a esporulação a bactéria produz toxinas conhecidas por possuírem ação bioinseticida, como as delta-endotoxinas (proteínas Cry e Cyt). Além destas toxinas, pode ocorrer a síntese de toxinas inseticidas vegetativas (proteínas Vip, do inglês *vegetative insecticidal protein*) durante a fase de desenvolvimento vegetativo da bactéria (PINTO et al., 2010).

As toxinas produzidas pela bactéria *Bt* são altamente específicas aos organismos alvo, sendo detectadas por receptores presentes no sistema digestivo de algumas ordens de insetos (BRAVO et al., 2011). Isso torna o uso deste microrganismo no controle de pragas um método bastante seguro, pois não acarretará desequilíbrios ambientais e riscos para a saúde humana e animal (FIUZA, 2010).

Mediante ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo isolar bactérias endofíticas do gênero *Bacillus*, incluindo a espécie *Bt*, provenientes de diferentes tecidos de cana-de-açúcar e do trato digestivo de lagartas da broca gigante e realizar a caracterização taxonômica dos isolados bacterianos. Além disso, foram realizados bioensaios na busca de isolados de *Bacillus* com potencial para o controle da broca gigante de cana-de-açúcar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)

A cana-de-açúcar é uma planta originária de regiões temperadas quentes e tropicais do sul da Ásia (QUECINE et al., 2014). A muda de cana-de-açúcar foi trazida para o Brasil em 1532 nas capitânicas hereditárias, tendo o início do cultivo em Pernambuco e Bahia (SCHULTZ et al., 2015). Com o estabelecimento do programa Proálcool no ano de 1975 a produção de cana-de-açúcar teve um aumento significativo. Após este período, o incentivo na exportação de açúcar e o lançamento de veículos flex fizeram com que a produção tivesse um aumento acelerado (NOVA CANA, 2008). A cana-de-açúcar é considerada uma das principais culturas da economia brasileira, movimentando US\$ 4,94 bilhões com a exportação de açúcar e US\$ 943,86 milhões com a exportação de etanol (NOVA CANA, 2019). O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com produção estimada em 642,7 milhões de toneladas em 8,4 milhões de hectares para a safra 2019/20, com acréscimo de 3,6% em relação à safra anterior (CONAB, 2019). A cultura está distribuída em quase todo País e o estado de São Paulo é responsável por grande parte da produção nacional de cana-de-açúcar, contribuindo com cerca de 53% da produção nacional enquanto os outros 35% são produzidos principalmente em Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Paraná (CONAB, 2019). Além da produção de açúcar e etanol, o Brasil tem conquistado o mercado externo através da utilização de biocombustível (etanol) como alternativa energética (CONAB, 2019). Apesar do grande avanço da cultura, ainda existem muitas perdas de produção que geralmente estão associadas a fatores ambientais e problemas fitossanitários. Dentre os fatores entomológicos, podemos citar como exemplo, o ataque da broca da cana (*D. saccharalis*), que pode levar a prejuízos de 0,42% na produção de açúcar, 0,25% na produção de etanol e 1,14% na produção de cana (GARCIA, 2013). Outra praga de grande importância é a broca gigante (*T. l. licus*), que pode ocasionar prejuízos de 20 a 60% de produção (ROSSETTO & SANTIAGO, 2013). A ocorrência do bicudo da cana (*S. levis*) nas áreas produtoras pode levar a prejuízos de 20 a 30 toneladas por hectare quando 50 a 60% dos perfilhos são atacados (GARCIA, 2013). Diante deste cenário, estudos utilizando tecnologias que promovam a redução e/ou inibição do ataque de pragas nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar se fazem necessários, possibilitando assim aumento na produção da cultura e redução do uso de agentes químicos.

2.2 A broca gigante da cana de-açúcar (*Telchin licus licus*)

O inseto *T. l. licus* (Drury, 1773), conhecido popularmente como broca gigante da cana-de-açúcar pertence à Ordem Lepidoptera e família Castniidae (MORAES & DUARTE, 2009). Este inseto tem como hospedeiro gramíneas, orquídeas e plantas ornamentais e está distribuído em países como Colômbia, Equador, Peru, Venezuela, Trindade, Costa Rica, Panamá, Guiana e Suriname. A introdução deste inseto no Brasil ocorreu através de mudas de plantas ornamentais trazidas de outros países (De ALMEIDA & ARRIGONI, 2009).

Esse inseto é uma praga de importância econômica na cultura da cana-de-açúcar e pode ocasionar inúmeras perdas nas áreas produtoras. O ataque da broca gigante à cultura ocorre durante a fase de desenvolvimento larval, porque é nesta fase que o inseto abre galerias nos colmos das plantas ao se alimentar. Os colmos atacados ficam ocos, o que os tornam inviáveis para a produção (Figura 1 e 2).



Foto: Francine Yuriko Otsuka Rocha, 2016.

Figura 1. Colmo de cana-de-açúcar oco devido ao ataque da broca gigante (*Telchin licus licus*). Alagoas, junho de 2016.



Foto: Francine Yuriko Otsuka Rocha, 2016.

Figura 2. Broca gigante (*Telchin licus licus*) na forma larval atacando colmo de cana-de-açúcar. Alagoas, junho de 2016.

Quando a broca consome toda a reserva do colmo ela migra para o colmo ao lado, abrindo novas galerias. Além de afetar a produtividade, o ataque das lagartas da broca gigante inibe o desenvolvimento das plantas e provoca inúmeros prejuízos devido a falhas na brotação (Figura 3) e secamento dos ponteiros (coração morto) na fase de brotação de soqueiras (Figura 4), devido ao ataque dos rebentos pelas lagartas. Em áreas com altas taxas de infestação desta praga é necessário realizar a reforma do canavial (CONDE & BENEDINI, 2008).

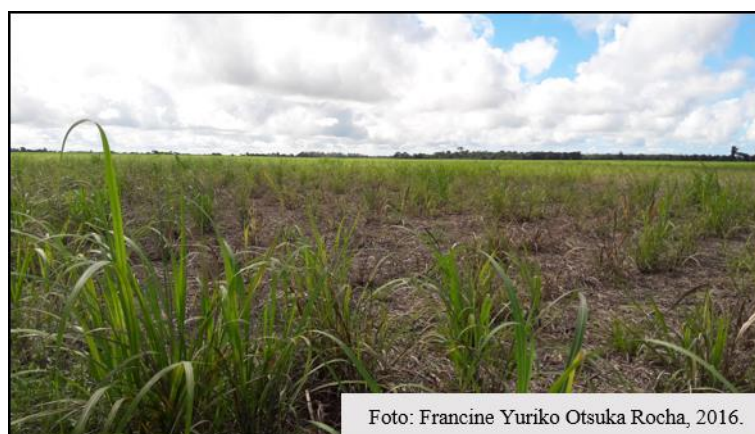


Foto: Francine Yuriko Otsuka Rocha, 2016.

Figura 3. Área atacada pela broca gigante (*Telchin licus licus*), com falhas de brotação. Alagoas, junho de 2016.



Figura 4. Sintoma de coração morto (secamento dos ponteiros) destacados com setas. Alagoas, junho de 2016.

Um dos fatores que mais favorecem o aumento populacional e o ataque da broca gigante em áreas de cultivo de cana-de-açúcar é o clima e os índices de precipitação (CONDE & BENEDINI, 2008). A região Nordeste do Brasil é a que apresenta maior incidência da broca gigante, por possuir condições de temperatura, luminosidade e umidade do solo (garantida através de práticas de irrigação durante o plantio de verão) favorável ao desenvolvimento do inseto (CRAVEIRO, 2009). O ataque de 1% dos colmos de cana pode levar não somente a perdas gerais de produção, mas também podem afetar os parâmetros qualitativos, ocasionando redução de 0,22% nos teores de açúcar, redução de 0,12% de pureza do caldo, 0,18% de redução para produção de etanol, aumento de 0,21% de fibras e aumento de açúcares redutores em 0,76% (VIVEIROS, 1989). Na safra de 2007/2008, o ataque desta praga levou a perdas de R\$ 34,5 milhões (CANUTO et al., 2011).

Devido a ocorrência da broca gigante em plantações de diversos estados produtores, existe um grande interesse em encontrar tecnologias eficientes para o controle desta praga. Segundo notícias da Cana Online (2015), a broca gigante tem se alastrado pelas regiões produtoras do Centro-Sul do País, sendo encontradas nos canaviais do estado de São Paulo, do Sul de Minas Gerais, do Paraná e do Mato Grosso do Sul, o que gera grande preocupação, já que a região Centro-Sul possui grande representatividade na produção de cana-de-açúcar. A primeira constatação da broca gigante no Estado de São Paulo foi em 2007, na região produtora de Limeira (De ALMEIDA; DIAS FILHO & ARRIGONI, 2015).

Uma das grandes preocupações em relação ao manejo da broca gigante é que o inseto possui um ciclo de vida bastante longo. Em condições naturais, o ciclo biológico completo da broca gigante é de aproximadamente 177 dias, divididos entre as fases de ovo, larva, pupa e a fase adulta (MENDONÇA, 1982) (Figura 5).

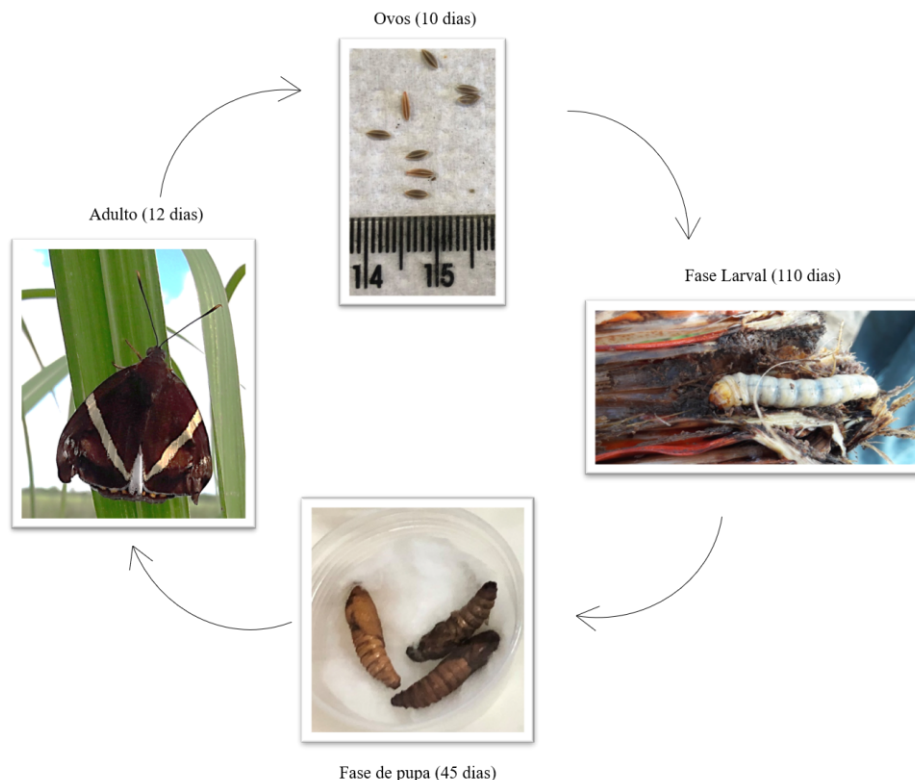


Figura 5. Ciclo biológico completo da broca gigante (*Telchin licus licus*). Fotos: Francine Yuriko Otsuka Rocha, 2016.

As lagartas recém-eclodidas penetram no solo e alimentam-se da planta a partir da base em direção ao ápice, deixando os colmos ocos devido a formação de galerias em seu interior (NEGRISOLI JÚNIOR et al., 2015). Durante a fase de desenvolvimento larval, a lagarta pode passar por cinco instares e após essa fase de desenvolvimento, a lagarta se transforma em pupa no interior de um casulo construído com as fibras da planta. A fase de pupa dura em média 45 dias e somente após esse período é que os adultos emergem e copulam para dar início a um novo ciclo de desenvolvimento (MENDONÇA et al., 1982).

2.2.1 Medidas de controle de *Telchin licus licus*

De forma a reduzir as perdas ocasionadas pela broca gigante, alguns métodos de controle são adotados para manejo desta praga, como por exemplo o controle mecânico, químico, uso de variedades com colmo mais rígido etc. Dentre os métodos de controle já conhecidos, o controle mecânico, o qual consiste na catação manual de lagartas e pupas na ocasião da colheita da cana e uso de rede entomológica para captura de adultos (NEGRISOLI JÚNIOR et al., 2015) é o único método eficiente, mas os custos são muito elevados (CONDE & BENEDINI, 2008), já que é preciso ter um grande número de pessoas para realizar a catação de lagartas. Além disso, o método pode provocar danos físicos nas plantas e prejudicar o desenvolvimento da cultura.

Existe no mercado um inseticida químico registrado para controle da broca gigante, o Altacor® (DuPont do Brasil S.A.), que apresenta em sua composição o ingrediente ativo

Clorantraniliprole (Rynaxypyr®) (AGROFIT, 2020). O uso de somente um produto químico pode acarretar o surgimento de populações resistentes ao ingrediente ativo, o que torna o uso desta tecnologia ineficiente em longo prazo. Além disso, foi relatado que o uso do produto químico por algumas unidades produtoras de cana no Nordeste brasileiro não tem apresentado resultados satisfatórios para o controle da broca gigante (NEGRISOLI JÚNIOR et al., 2015). Segundo Conde e Benedini (2008), a larva da broca gigante possui a capacidade de fechar o orifício ocado logo após o corte da planta, não entrando em contato com o inseticida aplicado, o qual apresenta modo de ação por contato ou ingestão. Essa característica da larva torna o uso de inseticidas de contato uma tecnologia ineficiente. Além disso, como o período de desenvolvimento larval é longo, são necessárias várias aplicações do produto, o que faz desta uma tecnologia economicamente inviável. Estudos visando controle com inseticidas sistêmicos devem ser realizados para o controle mais eficiente desta praga.

Em trabalho desenvolvido por Canuto et al. (2011), oito variedades de cana-de-açúcar sob cultivo orgânico foram testadas e as mais resistentes ao ataque da broca foram as variedades que possuem maior teor de lignina no colmo. O uso de variedades de cana-de-açúcar com maior teor de lignina no colmo pode ser uma alternativa para o controle desta praga. No entanto, mais estudos devem ser realizados visando viabilizar o uso dessa tecnologia.

O controle biológico tem se mostrado bastante eficiente para diversas pragas de importância econômica, como por exemplo o uso do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no controle da broca gigante (FIGUEIRÊDO et al., 2002).

Estudos utilizando microrganismos entomopatogênicos, como a bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), devem ser considerados. O uso de formulações à base de *Bt* proporciona baixo risco de desenvolvimento de resistência nos insetos, além de serem biodegradáveis (SANAHUJA et al., 2011). Por esses motivos, é considerado um ótimo candidato para uso no controle biológico, para a produção de formulações comerciais e uso na engenharia genética de plantas.

Em decorrência da dificuldade em controlar a broca gigante, estudos visando o desenvolvimento de novas tecnologias para o controle deste inseto-praga se fazem necessários. As novas tecnologias devem se tornar aliadas das tecnologias já existentes, obtendo-se assim maior eficiência de controle. É importante salientar que, além dos métodos de controle, devem ser adotadas medidas legislativas rigorosas, evitando a disseminação da praga para regiões onde ainda não foram relatadas. Sendo assim, a inspeção fitossanitária, tratamentos químicos e térmico são aliados para evitar prejuízos (MENDONÇA et al., 1996).

2.3 O gênero *Bacillus* - ocorrência, espécies e uso na agricultura

O gênero *Bacillus* pertence à Classe Firmibacteria, Filo Firmicutes, Ordem Eubacteriales, Família Bacillaceae e é composto por bactérias aeróbicas ou facultativamente anaeróbicas, que possuem células em forma de bastonetes individuais ou em cadeias (COSTA et al., 2010). Essas bactérias são consideradas onipresentes já que podem ser encontradas habitando diversos tipos de substratos, como rios, lagos, mares, solo e plantas (TEJERA-HERNÁNDEZ et al., 2011).

Bactérias desse gênero são conhecidas por promover crescimento de plantas devido a capacidade de fixar nitrogênio, solubilizar minerais e produzir hormônios (TEJERA-HERNÁNDEZ et al., 2011). Em ensaios realizados em laboratório, as espécies de rizobactérias *B. pumilus* e *B. sphaericus* demonstraram resposta positiva para solubilização de fosfato e capacidade de produção de sideróforos (COY, HELD & KLOPPER, 2019).

Além da capacidade de promoção de crescimento vegetal, algumas espécies do gênero *Bacillus* possuem capacidade antagônica contra fitopatógenos. Espécies de *B. thuringiensis* e *B. weihenstephanensis*, isoladas de solo e associada às raízes de tomateiro, possuem habilidade de inibir o crescimento do fungo *Verticillium* (HOLLENSTEINER et al., 2017). Em trabalho desenvolvido por ROCHA et al. (2017), foi verificado que estirpes das espécies *B. cereus*, *B. toyonensis* e *B. megaterium*, além de apresentarem atividade proteolítica e celulolítica também são promissoras no controle das raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. A espécie *B. velezensis* RC218 foi capaz de reduzir a incidência de *Fusarium graminearum* em trigo em condições de campo (PALAZZINI et al., 2018). Outro exemplo utilizando espécies de *Bacillus* no controle de fitopatógenos é o trabalho de Nikolić et al. (2019), em que demonstraram que a estirpe SS-12.6 de *B. amyloliquefaciens* suprimiu a severidade da doença causada por *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* em beterraba.

A podridão de cachos causada por *Botrytis cinera*, principal doença em videira, foi controlada pela estirpe S38 de *B. ginsengihumi*, com redução de severidade da doença entre 35 a 60% quando comparada com o controle não tratado com a bactéria (CALVO-GARRIDO et al., 2019).

As espécies *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus pumilus*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. oryzae* estirpe YC7007 e *B. velezensis* estirpe YC7010 têm sido utilizadas com sucesso no controle biológico de doenças (HOSSAIN & CHUNG, 2019). Essas bactérias colonizam tecidos internos de plantas (HOSSAIN & CHUNG, 2019; MAGNANI et al., 2010; VELÁZQUEZ et al., 2008; WANG et al., 2020) e promovem a indução de resistência induzida contra patógenos (HOSSAIN & CHUNG, 2019).

Outras espécies do gênero *Bacillus*, como *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. alvei*, *B. popilliae*, *Bacillus lentimorbus* e *B. sphaericus* são conhecidas por produzirem esporos e toxinas, algumas delas eficientes no controle de dípteros (*B. sphaericus*) e controle de *Eutheola humilis* (Coleoptera: Scarabaeidae), *Stenocrates* spp. (Scarabaeidae: Dynastinae) e *Migdolus morretesi* (Coleoptera, Anoplodermidae) (*Bacillus popilliae* e *Bacillus lentimorbus*) (COSTA et al., 2010).

A espécie *B. thuringiensis*, além de ser conhecida por apresentar atividade tóxica contra insetos de diversas ordens, é conhecida pela produção de quitinases, enzima que é capaz de aumentar a atividade das toxinas Cry (MARTÍNEZ-ZAVALA et al., 2020).

Perante o exposto, podemos observar que o gênero *Bacillus* possui grande destaque dado as diversas características que as espécies possuem. No entanto, a bactéria *B. thuringiensis* é a espécie de maior destaque do gênero para uso no controle biológico, já que produz toxinas com elevada especificidade contra os organismos alvo (BRAVO et al., 2011), o que a torna mais segura para uso em áreas de cultivo.

2.4 *Bacillus thuringiensis*

2.4.1 Histórico de *Bacillus thuringiensis*

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) vem sendo utilizada por muitos anos de forma satisfatória no controle de pragas. Este microrganismo foi descoberto pela primeira vez no ano de 1902 pelo pesquisador Ishiwata no Japão, por causar a morte de *Bombix mori* (bicho-da-seda) (Lepidoptera: Bombycidae). O pesquisador descreveu este microrganismo como sendo uma bactéria esporulante (POLANCZYK & ALVES, 2003). Mais tarde, em 1911, o pesquisador Berliner reisolou a bactéria a partir de larvas mortas da traça da farinha (*Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) ou *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), na cidade de Thuringe na Alemanha. Foi neste período que a bactéria foi nomeada de *B. thuringiensis*, fazendo referência ao nome da região em que as lagartas da traça foram

encontradas. Berliner constatou a existência de cristais produzidos pela bactéria, porém a atividade tóxica desses cristais ainda não havia sido descoberta (FIÚZA et al., 2010).

Durante a década de 20 e 40 foram realizados ensaios utilizando *Bt* para controle de *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) e outros insetos da Ordem Lepidoptera (FIÚZA et al., 2010). No ano de 1938 foi produzida na França uma formulação a base de *Bt* (Sporeíne), mas somente nos anos 50 que foi despertado o interesse em estudar e descobrir a bioquímica, estrutura e modo de ação dos cristais produzidos pela bactéria (WEISER, 1986). Durante os anos 50 que sugeriram que a patogenicidade deste microrganismo estaria associada a cristais formados durante a esporulação (LEUCONA, 1996). Na década de 60, foi isolada uma estirpe de *Bt* subsp. *kurstaki* (DULMAGE, 1970) que apresentou toxicidade de 2 a 200 vezes superior às estirpes normalmente utilizadas nos produtos comerciais. Somente a partir da década de 70 que foi descoberto que estirpes de *Bt* seriam eficazes no controle de diferentes Ordens de insetos como Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera (WEISER, 1986; EDWARDS et al., 1992), nematóides, protozoários e ácaros (EDWARDS et al., 1992). No ano de 1977 foi descoberta a toxicidade de uma estirpe de *Bt* subsp. *israelensis* a larvas de mosquitos e borrachudos, insetos da Ordem Diptera (KIM, 1993).

Cabe ressaltar também a descoberta da estirpe S76 de *Bt* subespécie *kurstaki* pelo grupo de pesquisa do laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia. O grupo selecionou e caracterizou a estirpe em relação ao potencial de controle contra o lepidóptero *Diatraea saccharalis* (broca da cana), sendo constatado que a estirpe apresentou toxicidade dez vezes maior a esta praga do que a estirpe comercial HD-1, que é utilizada como padrão para controle de lepidópteros (GITAHY, 2000; GITAHY et al., 2007). Ao longo dos anos, diversos estudos foram realizados, confirmando a atividade tóxica de estirpes de *Bt* contra as ordens Lepidoptera (MUSHTAQ et al., 2017; ZORZETTI et al., 2017), Diptera (DOSS et al., 2002), Coleoptera (MUSHTAQ et al., 2017), Hemiptera (FERNANDEZ-LUNA et al., 2019) e Hymenoptera (GÖKTÜRK & TOZLU, 2019). Pragas de importância econômica como *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae), vetores de doenças como *Culex* (Diptera: Culicidae), *Aedes* (Diptera: Culicidae) e *Anopheles* (Diptera: Culicidae) e nematóides foram controlados utilizando a bactéria *Bt* (FEITELSON et al., 1992; LERECLUS et al., 1993; ARANDA et al., 1996; SCHNEPF et al., 1998; MONNERAT & BRAVO, 2000; POLANCZYK & ALVES, 2003; MONNERAT & PRAÇA, 2006; GITAHY et al., 2007; de CASTRO et al., 2017; ZHOU et al., 2017).

Além dessas descobertas, o interesse em utilizar o *Bt* como agente de biocontrole aumentou devido as informações acerca dos danos que os inseticidas sintéticos podem gerar e ao aparecimento de populações de insetos resistentes, em decorrência do uso indiscriminado desses produtos (MONNERAT & BRAVO, 2000). Além dessas desvantagens em utilizar um produto químico, o custo para elaboração de um inseticida sintético é consideravelmente maior em comparação ao produto à base de microrganismos. Outra vantagem dos bioinseticidas em relação aos químicos é que os produtos à base de *Bt* são específicos, ou seja, não apresentam toxicidade a outros organismos que não sejam os organismos alvo (SANAHUJA et al., 2011), não causam danos aos seres humanos, animais vertebrados e plantas e são totalmente biodegradáveis (PARDO-LOPEZ, SOBERON & BRAVO, 2013; BRAVO et al., 2013; KOCH et al., 2015). Os bioinseticidas representam cerca de 7% dos inseticidas comercializados no mundo, e os produtos à base da bactéria *Bt* representam cerca de 70% deste mercado (BRAVO et al., 2011). De acordo com informações disponibilizadas no site do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2019), no ano de 2018 o mercado brasileiro de biodefensivos movimentou recursos ao redor de R\$ 528 milhões, o que torna o Brasil, o quarto maior produtor de biodefensivos, atrás dos Estados Unidos (37%), Espanha (14%) e Itália (10%). Em levantamento realizado pela empresa de

consultoria Dunham Trimmer, a estimativa de faturamento mundial gerada através da comercialização de produtos biológicos é de US\$ 5 bilhões (MAPA, 2019).

2.4.2 Ciclo de vida de *Bacillus thuringiensis*

O ciclo de vida da bactéria *Bt* é dividido em duas fases, a fase de crescimento vegetativo, onde a bactéria se multiplica através da fissão binária e a fase estacionária, em que a bactéria se diferencia em esporo, como ilustrado na figura 6.

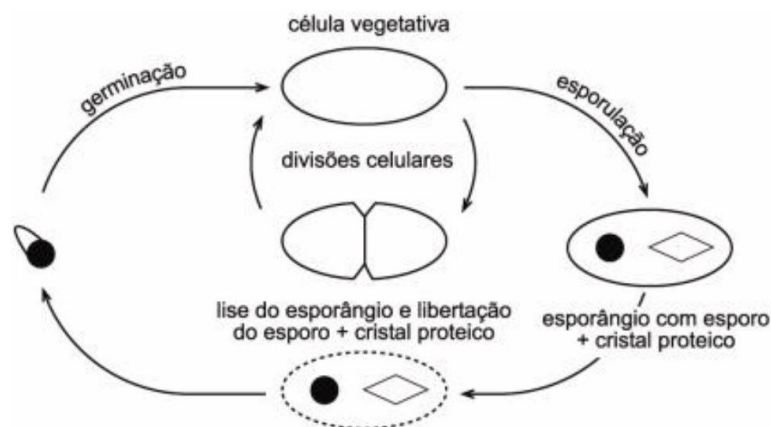


Figura 6. Ciclo de vida da bactéria *Bacillus thuringiensis* (BIOSANI, sem data).

As células de *Bt* crescem exponencialmente durante a primeira fase de seu desenvolvimento (fase vegetativa), enquanto existe elevada disponibilidade de nutrientes no meio. A partir do momento que a disponibilidade de nutrientes do meio reduz, a bactéria passa para a fase estacionária do seu ciclo de vida. Isso ocorre devido a mecanismos genéticos que a bactéria possui, como uma forma de adaptação. Quando o ambiente retoma a uma condição favorável ao crescimento da bactéria, os esporos germinam e iniciam o crescimento vegetativo (FIÚZA et al., 2010). É durante a fase estacionária que ocorre a expressão dos genes *cry* e com isso a produção de inclusões cristalinas proteicas que são liberadas no meio após a esporulação (LERECLUS et al., 2000; FIÚZA et al., 2010). A atividade entomopatogênica da bactéria se deve a presença destas inclusões cristalinas proteicas compostas pelas δ -endotoxinas (PRAÇA et al., 2007). Alguns genes *cry* podem ser expressos independentes da esporulação da bactéria, como por exemplo, o gene *cry3A*. Este gene também é expresso durante a fase vegetativa da célula bacteriana, mas durante a fase estacionária a expressão ocorre de forma mais intensa (De-SOUZA et al., 1993; PÉREZ, 2004).

2.4.3 Características e Ecologia de *Bacillus thuringiensis*

Este microrganismo pertence à Classe Firmibacteria, Filo Firmicutes, Ordem Eubacteriales, Família Bacillaceae, Gênero *Bacillus*, espécie *thuringiensis* e são divididas em nível de subespécies (WHITELEY & SCHNEPF, 1986). Faz parte do grupo de bactérias Gram-positivas, aeróbia ou anaeróbia facultativa, em forma de bastonete móvel, formadora de esporos e que produz inclusões cristalinas proteicas, denominadas δ -endotoxinas (AZIZOGLU, 2017). O agrupamento das estirpes de *Bt* pode ser feito através de sorotipos ou subespécies, levando em consideração as propriedades bioquímicas e imunogênicas, através da obtenção de anticorpos (reação de aglutinação de antígenos flagelares das células vegetativas) (DE BARJAC & FRACHON, 1990). Através da utilização de antígenos

flagelares foi possível dividir a espécie de *Bt* em 82 subespécies. O método possui limitação para a espécie *B. cereus*, já que a espécie não produz inclusões paraesporais e pode ter problemas com linhagens autoaglutinantes de *Bt* (LECADET et al., 1999). As espécies *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. anthracis* são muito próximas filogeneticamente, apresentando sequência de DNA muito semelhante (HELGASON et al., 2000; GUINEBRETIERE et al., 2008; KOLSTØ et al., 2009). Desta forma, a diferenciação entre estas espécies é feita através da observação da produção de inclusões cristalinas proteicas pelas estirpes de *Bt* durante a fase estacionária da bactéria (LUTHY & WOLFERSBERGER, 2000; FIÚZA et al., 2010).

O *Bt* é conhecido mundialmente por apresentar atividade bioinseticida contra insetos de diversas ordens devido à produção de proteínas Cry e Cyt (δ -endotoxinas) durante a fase de esporulação (SCHNEPF et al., 1998, AZIZOGLU, 2017). Esse microrganismo pode permanecer em latência como endósporos sob condições adversas e por este motivo ficar viável nas áreas de cultivo por um longo período (BOBROWSKI et al., 2003). Essa característica, aliada ao fato de que as toxinas produzidas pela bactéria serem altamente específicas para um número limitado de insetos (BRAVO et al., 2011), torna esse microrganismo um ótimo candidato a produção de formulações comerciais e uso na engenharia genética de plantas, já que não colocam em risco a vida de humanos e outros organismos.

O crescimento desta bactéria pode ser influenciado por diversos fatores como a temperatura, que deve variar na faixa entre 20 e 42°C para o crescimento vegetativo. No entanto, para que seja obtida boa produção de endotoxinas são necessárias temperaturas variando entre 28 e 32°C. O pH do meio também tem influência no crescimento vegetativo, sendo que o ótimo crescimento se dá quando o pH é 7,0. Quando se deseja obter um ótimo crescimento vegetativo, esporulação e formação de cristais pela bactéria no meio de cultura, o mesmo deve apresentar em sua composição glicose, cálcio, zinco, cobre, ferro, amônia, magnésio (nutriente fundamental para que ocorra esporulação) e manganês (necessário para a produção de cristais) (LEUCONA, 1996).

O microrganismo *Bt* já foi encontrado colonizando diferentes nichos como o solo, água, superfície de plantas, filoplano, rizosfera e também no interior de tecidos vegetais, como por exemplo, colonizando endofiticamente plantas de bananeira, tomateiro, algodão, repolho e cana-de-açúcar (MONNERAT et al., 2009; FRANCIS et al., 2010; RAYMOND et al., 2010; ARGÔLO-FILHO & LOGUERCIO, 2014; CASTILLO et al., 2013; SOUZA et al., 2013; ROCHA et al., 2017; MELO et al., 2010).

2.4.4 Tipos de toxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis*

A bactéria *Bt* produz diferentes tipos de toxinas, que podem ser letais a algumas ordens de insetos. As toxinas mais estudadas são as proteínas Cry (δ -endotoxinas) por possuírem ação bioinseticida. Além das δ -endotoxinas Cry, este microrganismo também produz as δ -endotoxinas Cyt, as proteínas Vip, β -exotoxinas, exoenzimas e outros fatores de virulência, como as α -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (HÖFTE & WHITELEY, 1989; HANSEN & SALAMITOU, 2000; De MAAGD et al., 2001). Proteínas Parasporinas também são produzidas e estas exibem atividade citotóxica específica contra células humanas tumorais (OHBA et al., 2009, OKUMURA et al., 2010).

2.4.4.1 δ -endotoxinas

As toxinas Cry e Cyt são endotoxinas pertencentes à classe de toxinas formadoras de poros (PFT – *pore-forming toxins*), produzidas durante a fase de esporulação da bactéria e liberadas no meio após a lise celular (MONNERAT & BRAVO, 2000). As proteínas Cry são codificadas por genes *cry* que estão geralmente localizados em megaplasmídeos (GITAHY et al., 2007; PALMA et al., 2014). Essas toxinas são solúveis em água e podem sofrer alterações conformacionais para se inserir ou translocar em todas as membranas celulares de seu hospedeiro (BRAVO et al., 2007). Segundo Parker e Feil (2005), existem dois tipos de toxinas formadoras de poros (PFTs), as toxinas α -hélice (grupo 1), as quais formam poros trans-membranares nas regiões α -hélice e as toxinas barril- β (grupo 2), que se inserem na membrana e formam um barril- β composto de grampos de folhas- β . O grupo 1 (α -PFT) inclui as colicinas, a exotoxina A, a toxina da difteria e as toxinas de três domínios (3D-Cry). Já o grupo 2 (β -PFT) inclui toxinas como a aerolisina, a α -hemolisina, as toxinas dependentes de colesterol e as toxinas Cyt (PARKER & FEIL, 2005).

As bactérias produtoras de toxinas formadoras de poros (PFTs) secretam essas toxinas que irão interagir com receptores específicos localizados na superfície da célula do hospedeiro (PARKER & FEIL, 2005).

As proteínas Cry compõem o maior grupo de proteínas inseticidas produzidas, sendo consideradas como os principais constituintes dos cristais que caracterizam a bactéria. A maioria das estirpes de *Bt* pode sintetizar mais de um tipo de cristal e estes podem ser formados por diferentes proteínas Cry, como é o caso da *Bt* subsp. *israelensis*, a qual produz cinco toxinas. A massa molecular dessas toxinas pode variar entre 14 e 142 kDa (CRICKMORE et al., 2018).

O cristal proteico pode apresentar conformação bipiramidal, cubóide, rombóide, ovóide, esférico, retangular ou não apresentar forma definida (Figura 7) dependendo do sorotipo, das condições do meio (LEUCONA, 1996) e da composição da pró-toxina (HABIB & ANDRADE, 1998).

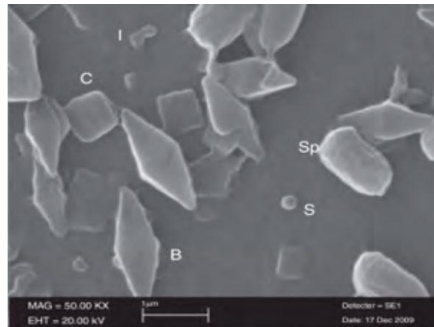


Figura 7. Morfologia das inclusões parasporais da estirpe SY49-1 de *B. thuringiensis*. B) Bipiramidal, C) Cubóide, I) Esférica de forma irregular, S) Esférica e Sp) Esporo (AZIZOGLU et al., 2016).

A formação de cristais diminui a susceptibilidade das toxinas à degradação pela ação das proteases do inseto hospedeiro (SCHNEPF et al., 1998). Estas toxinas se acumulam no compartimento da célula-mãe e são liberadas juntamente com o esporo após a lise celular (MONNERAT & BRAVO, 2000). As proteínas Cry atuam especificamente no intestino médio dos insetos suscetíveis, sendo consideradas mais potentes do que inseticidas piretróides e organofosforados (FEITELSON 1992).

A classificação das proteínas Cry baseia-se na similaridade das sequências de aminoácidos (FIÚZA et al., 2010), existindo mais de 798 diferentes genes *cry* descritos.

Atualmente as proteínas estão agrupadas em 75 classes (Cry1 a Cry75) (CRICKMORE et al., 2018).

Os grupos de genes *cry* mais estudados são o *cry1*, *cry2*, e *cry9*, os quais já foram descritos com amplo espectro inseticida a insetos da Ordem Lepidoptera (FIÚZA et al., 2010). Os genes *cry1* são os mais frequentes na natureza e os cristais produzidos apresentam conformação bipiramidal (HÖFTE & WHITELEY, 1989; THAMMASITTIRONG & TIPVADEE, 2008). As classes de genes apresentam ação específica contra algumas ordens de insetos, como os genes *cry1*, que codificam proteínas tóxicas contra insetos da ordem Lepidoptera, os genes *cry2* que codificam proteínas tóxicas contra insetos da ordem Lepidoptera e Diptera, o gene *cry3* com ação contra coleópteros e *cry4* com ação tóxica contra dípteros.

A quantidade de proteína produzida por uma célula de *Bt* não está diretamente relacionada com o número de cópias de genes *cry*, pois a capacidade de produção de proteína pela célula, mesmo com apenas uma cópia de um determinado gene *cry*, pode ser elevada. Isso ocorre porque a síntese proteica atinge um limite máximo, com certo número de cópias de genes *cry* na célula e acima deste não há acréscimo na produção de toxinas (AGAISSE & LERECLUS, 1994; FIÚZA et al., 2010).

O efeito das proteínas Cry podem ser alterados de acordo com a ação de fatores externos como a radiação solar, temperatura e pH (NISHITSUTSUJI-UWO et al., 1977).

Algumas estirpes de *Bt* também podem sintetizar proteínas denominadas Cyt, que possuem atividade citolítica *in vitro* e especificidade *in vivo* aos insetos da ordem Diptera (HÖFTE & WHITELEY, 1989; De MAAGD et al., 2003). De acordo com esses autores fazem parte desse grupo as proteínas Cyt1Ca e Cyt2Aa e seu modo de ação também pode estar relacionado a um sinergismo com outras toxinas produzidas pelos isolados bacterianos. As proteínas Cyt compõem uma inclusão paraesporal de *Bt* com atividade hemolítica. Atualmente sabe-se da existência de 40 proteínas Cyt (CRICKMORE et al., 2018). As proteínas Cyt são divididas em três classes: Cyt1, Cyt2 e Cyt3. As classes Cyt1 e Cyt2 apresentam atividade contra insetos da ordem Diptera (PRAÇA et al., 2004) e Cyt2 apresenta ação tóxica contra coleópteros (CRICKMORE et al., 2018). Um estudo recente demonstrou que a especificidade de uma toxina Cyt (específica contra dípteros) pode ser alterada ao realizar mutações pontuais na toxina, introduzindo a alça 3 da proteína Cry1Ab (específica contra lepidópteros) na proteína Cyt1Aa. Os insetos lepidópteros *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) e *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) apresentaram taxa de mortalidade satisfatória em bioensaios com a toxina Cyt mutada (TORRES-QUINTERO et al., 2018). O sinergismo de toxinas pode ser uma alternativa contra populações de insetos resistentes.

2.4.5 Modo de ação das toxinas Cry

O modo de ação das toxinas 3D-Cry é muito semelhante e isso se deve ao fato de apresentarem estrutura tridimensional similares (BRAVO et al., 2013). Existem duas hipóteses propostas para explicar o modo de ação das toxinas de *Bt*. A primeira hipótese está relacionada com a formação de poros na membrana do epitélio intestinal dos insetos e a segunda hipótese está relacionada a transdução de sinal (BRAVO & SOBERÓN, 2008). A figura 8 ilustra as duas hipóteses propostas sobre o modo de ação das toxinas Cry após a ingestão dos cristais pelos insetos suscetíveis.

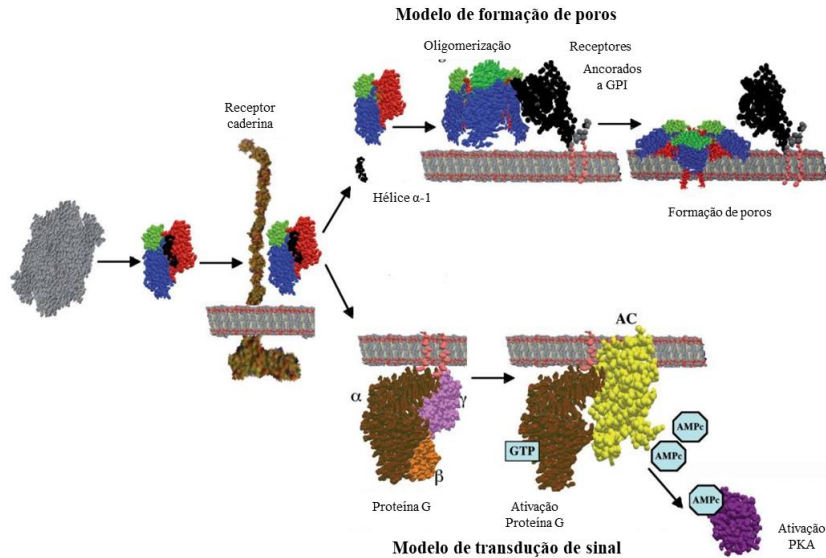


Figura 8. Modo de ação das proteínas 3D-Cry (adaptada de SOBERÓN, GILL & BRAVO, 2009).

De acordo com a primeira hipótese, para que ocorra a formação de poros, o inseto suscetível deve ingerir os cristais produzidos pela bactéria e quando chegam no intestino médio dos insetos são solubilizados devido ao pH elevado (em torno de 9,5 no caso de lepidópteros e dípteros e ácido no caso de coleópteros). A solubilização dos cristais liberam as protoxinas (proteínas Cry) (BRAVO et al., 2013) e estas por sua vez são clivadas pelas proteases intestinais (principalmente pelas tripsinas) dando origem a uma toxina ativa resistente a ação de proteases (60 - 70 kDa), sendo essa a parte que apresenta toxicidade sobre os insetos suscetíveis (MONNERAT & BRAVO, 2000; BRAVO et al., 2005). A figura 9 mostra o local que as proteases clivam as protoxinas.

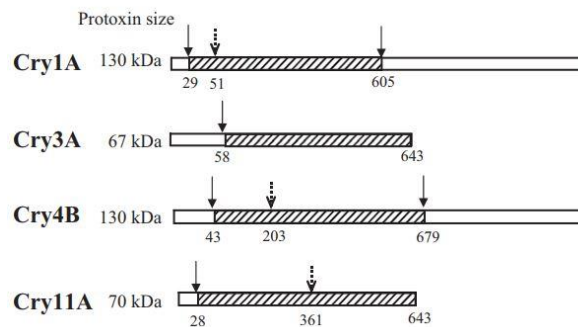


Figura 9. Tamanho das protoxinas Cry e local de clivagem pelas proteases. As listradas representam a toxina ativa. Setas sólidas representam sítios de clivagem N- e C-terminal e as pontilhadas representam local de clivagem intramolecular (BRAVO et al., 2007).

A toxina ativada pelas proteases intestinais do inseto se ligará a um receptor específico do tipo caderina localizado nas microvilosidades intestinais (BRAVO & SOBERÓN, 2008). A proteína do tipo caderina (CADR) é um receptor primário e as proteínas ancoradas a glicosilfosfatidil-inositol (GPI) (aminopeptidase-N - APN e fosfatase alcalina - ALP) e um glicoconjugado de 270 kDa são os receptores proteicos secundários que se ligam as proteínas Cry (GÓMEZ et al., 2007; BRAVO et al., 2007). Além dessas moléculas proteicas, os glicolípídeos também podem ser receptores de proteínas Cry em alguns insetos (GÓMEZ et al., 2007). A interação da toxina ao receptor é mediada pelos domínios II e III da toxina e essa ligação irá determinar a especificidade da toxina (MONNERAT & BRAVO, 2000).

Após ligação da toxina ao receptor caderina, ocorre a formação de oligômeros que se ligam às proteínas ancoradas a glicosilfosfatidil-inositol (GPI) (aminopeptidase-N – APN e fosfatase alcalina - ALP) que estão localizadas em plataformas de lipídeos. A presença desta toxina em plataformas de lipídeos induz a inserção da toxina na membrana e leva a formação de poros. Os oligômeros aumentam a afinidade de ligação aos receptores secundários ALP e APN (SCHNEPF et al., 1998; de MAAGD et al., 2003; BRAVO et al., 2004).

Bravo et al. (2011) descreveram o modo de ação da protoxina Cry1Ab contra lagartas de *Manduca sexta* e verificaram que a toxina se liga ao receptor caderina, facilitando a remoção proteolítica da α -hélice 1 e induzindo a oligomerização da toxina. Os oligômeros formados (pré-poros) da toxina Cry1Ab se ligam aos receptores ALP e APN, desta vez com maior afinidade de ligação, facilitando a inserção dos oligômeros à membrana e a formação de poros com 1 a 2 nm de diâmetro. (KNOWLES & ELLAR, 1987; GAHAN et al., 2010).

A inserção das toxinas Cry na membrana do intestino dos insetos suscetíveis pode ocorrer de duas formas, de acordo com modelos propostos por Knowles (1994). No primeiro modelo, chamado abre cartas, as α -hélices 5 e 6 se inserem na membrana devido a uma mudança conformacional das hélices e dos domínios restantes. Já no segundo modelo, chamado modelo guarda-chuva, a região a4-a5 se insere na membrana do intestino com um grampo helicoidal e as outras hélices se arranjam sobre a superfície da bicamada lipídica. Esse arranjo expõe a região hidrofóbica da toxina em direção à membrana, fazendo com que a molécula fique com conformação semelhante à de um guarda-chuva. Após a formação dos poros na membrana do epitélio do intestino dos insetos suscetíveis, ocorre morte celular devido a inativação do sistema que mantém o gradiente de pH e por citólise osmótica, ou seja, ocorre um desequilíbrio entre os meios intracelular e extracelular (CHARLES & de BARJAC, 1983; KNOWLES & ELLAR, 1987). O desequilíbrio osmótico ocorre porque as toxinas Cry aumentam a permeabilidade das membranas a cátions, ânions, água e outras moléculas maiores, que levará a destruição das células do intestino (HARVEY, 1992; WOLFERSBERG, 1992). A destruição do epitélio intestinal permite que os esporos da bactéria *Bt* entre em contato com a hemolinfa e se multipliquem (DU & NICKERSON, 1996). O desequilíbrio osmótico, a destruição celular e a presença de esporos na hemolinfa do inseto têm como consequência a lise celular, que levará o inseto a morte por inanição e septicemia (DAI & GILL, 1993; MONNERAT & BRAVO, 2000).

Os dois modos de ação propostos ocorrem de forma semelhante até a etapa da ligação da toxina ao receptor caderina. No entanto, de acordo com a segunda hipótese (transdução de sinal), após a ligação da toxina monomérica ao receptor caderina ocorre a ativação da proteína de ligação a nucleotídeos de guanina (proteína G), que por sua vez ativa a via de sinalização dependente de magnésio (adenilato ciclase/proteína quinase A), provocando a morte celular (ZHANG et al., 2006; BRAVO & SOBERÓN, 2008). Segundo Zhang et al. (2006), a ligação da protoxina ao receptor caderina desencadeia um caminho de transdução de sinal e isso já é suficiente para desencadear a morte celular, sem haver a necessidade de formar oligômeros e poros na membrana.

Os principais sintomas observados nas larvas de insetos suscetíveis as toxinas de *Bt* são perda de apetite e abandono do alimento, paralisia do intestino, vômito, diarreia e paralisia total seguida de morte (ARONSON et al., 1986). As larvas perdem a agilidade quando infectadas pela bactéria e após a morte, apresentam coloração escura (HABIB & ANDRADE, 1998).

2.4.6 Uso de *Bacillus thuringiensis* como agente de controle biológico

Diversos trabalhos já mostraram o potencial da bactéria *Bt* no controle de insetos de importância econômica (SCHNEPF et al., 1998; IBARGUTXI et al., 2006; RICIETO et al., 2013; PALMA et al., 2014; BEL et al.; ZORZETTI et al., 2017). Em um estudo desenvolvido por Quecine et al. (2014), foi relatado a capacidade da bactéria *Pantoea agglomerans* (estirpe 33.1 modificada geneticamente para expressar o gene *cryIAc7* de *Bt*) em controlar *D. saccharalis* em ensaio *in vitro* e *in vivo*. Gitahy et al. (2007) também observaram que a bactéria *Bt* subsp. *kurstaki* estirpe S76 proporcionou mortalidade de 100% das lagartas de *D. saccharalis* em até 72 horas e através da técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase) foram detectados os genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cry2Aa1* e *cry2Ab2* no genoma da estirpe. Essas classes de genes confirmam a atividade bioinseticida das proteínas pertencentes as classes Cry1 e Cry2 contra insetos da ordem Lepidoptera.

Além dos trabalhos que utilizam proteínas Cry para controle de pragas, diversos estudos mostraram o potencial de outras proteínas produzidas pela bactéria, como por exemplo as proteínas Vip (proteínas inseticidas vegetativas, produzidas durante a fase vegetativa da bactéria) (PINTO et al., 2010). Essas proteínas possuem quatro classes: Vip1, Vip2, Vip3 e Vip4 (CRICKMORE, 2018) e em geral possuem potencial entomopatogênico contra insetos da ordem Lepidoptera (PINTO et al., 2010). Outra classe de proteínas sintetizadas por *Bt* é a de proteínas Cyt, que são divididas em três subclasses (Cyt1, Cyt2 e Cyt3) (CRICKMORE, 2018), as quais apresentam atividade citolítica e possuem ação específica contra dípteros (PINTO et al., 2010).

O ponto importante da síntese de diferentes proteínas tóxicas contra insetos é que o mecanismo de ação dessas proteínas pode apresentar relação sinérgica quando usadas em conjunto (PINTO et al., 2010; TORRES-QUINTERO et al., 2018). Desta forma, seria possível controlar insetos de maneira mais eficiente, principalmente populações de insetos resistentes. O trabalho desenvolvido por Ricietto et al. (2016) mostra esse efeito sinérgico de toxinas Vip e Cry usadas no controle de *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). Os autores estudaram a susceptibilidade do lepidóptero contra algumas toxinas produzidas por *Bt* e os produtos comerciais a base do microrganismo DiPel DF® e XenTari GD® (ambos da Kenogard S.A.) e chegaram à conclusão de que as proteínas mais eficientes no controle foram às proteínas Vip3Aa e Cry1Aa, apresentando valores de CL₅₀ de 1,8 e 7,5 ng/cm², respectivamente. Entre os produtos comerciais, o DiPel DF® apresentou menor CL₅₀ em relação ao XenTari GD®, de 13ng de DiPel DF®/cm² contra 33ng de XenTari GD®/cm². Os autores também avaliaram o sinérgismo entre as toxinas Vip3Aa e Cry1Aa ou Cry1Ca, relatando que a interação Vip3Aa + Cry1Aa apresentou moderado antagonismo e a interação Vip3Aa + Cry1Ca apresentou alto efeito antagônico.

Como mencionado anteriormente, a primeira formulação a base de *Bt* foi desenvolvida utilizando a estirpe isolada por Berliner em 1938 (BRAVO et al., 2013). Atualmente existem no mercado nacional 24 produtos registrados contendo esta bactéria como ingrediente ativo (AGROFIT, 2020). Essas formulações estão listadas para controle de pragas de importância econômica em diferentes culturas, como por exemplo, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae.), *Helicoverpa armígera* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Mocis latipes*

(Lepidoptera: Noctuidae), podendo ser encontradas em formulações em suspensão concentrada, pó molhável, granulado e concentrado emulsionável (AGROFIT, 2020).

Apesar dos grandes prejuízos que a broca gigante ocasiona nas áreas produtoras de cana-de-açúcar, formulações à base de *Bt* para controle desta praga ainda não foram desenvolvidas. No entanto, sabe-se que algumas toxinas produzidas por *Bt* se mostraram eficientes no controle da broca gigante. Em trabalho desenvolvido por Craveiro et al. (2010), foi verificado que quatro mutações no gene *cryIIa12synth* promoveram o aumento da atividade entomotóxica da proteína em pelo menos duas vezes contra lagartas neonatas da broca gigante, quando comparado com a dieta artificial sem a toxina. Os autores construíram uma biblioteca do gene *cryIIa* truncado e quatro variantes de toxinas CryIIa foram escolhidos para testes de toxicidade. O gene *cryIIa12synth*, não tóxico, e os quatro mutantes tóxicos foram testados quanto à toxicidade contra este inseto. Os bioensaios revelaram que os quatro mutantes apresentaram atividade entomotóxica contra a broca gigante, sendo encontrados oito sítios de substituição única nos mutantes ativos contra a praga (CRAVEIRO et al., 2010). Outros genes pertencentes a classe *cryI* e *cry2*, como *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc* e *cry2Aa* tiveram as proteínas Cry expressas em estirpes recombinantes de *Bt* e transformadas com o vetor pHT315 (ARANTES & LERECLUS, 1991). Essas toxinas foram testadas em bioensaios com lagartas neonatas da broca gigante, indicando a concentração letal (CL₅₀ - concentração em que ocorrem 50% de mortalidade dos insetos) para as toxinas. Foi determinada CL₅₀ de 297,3 ng/mL para a toxina CryIAa, de 238,0 ng/mL para a toxina CryIAb, de 139,3 ng/mL para a toxina CryIAc e de 1.353,3 ng/mL para a toxina Cry2Aa, mostrando assim que as toxinas pertencentes à classe *cryI* são mais promissoras no controle da broca gigante da cana-de-açúcar (FONSECA, 2013).

Diante dos resultados promissores obtidos até o momento para controle da broca gigante, existe um grande interesse em estudar a capacidade entomopatogênica de estirpes de *Bt* contra a broca gigante, a fim de encontrar uma estirpe promissora para desenvolvimento de formulações e uso nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar.

2.5 Uso de bactérias endofíticas para promoção de crescimento e controle de pragas e doenças

Apesar do grande sucesso do uso da bactéria *Bt* como agente de controle biológico, existem algumas desvantagens no uso de formulações, como por exemplo, apresentar eficiência somente nos órgãos da planta em que o inseto está localizado, apresentar melhor efetividade quando as lagartas a serem controladas são jovens, por ser inativado através da incidência de raios ultravioleta, calor extremo e mudanças de pH, por ser suscetível a proteases presentes em exsudados foliares e ser facilmente removido das folhas por ventos e chuvas, fazendo com que seja necessário a reaplicação do produto (SANAHUJA et al., 2011).

Diante dessas considerações, uma alternativa a ser considerada é o uso de microrganismos endofíticos, os quais colonizam os tecidos internos de plantas hospedeiras em alguma fase do seu ciclo de vida, sem causar danos à planta (AZEVEDO et al., 2000). Como os microrganismos endofíticos ficam protegidos no interior das plantas, eles não são afetados por condições ambientais externas, como temperatura, salinidade, radiação ultravioleta, potencial osmótico, pH e seca (SUMAN, YADAV & VERMA, 2016), o que os tornam potenciais agentes de controle biológico (LODEWYCKX et al., 2002).

Os microrganismos endofíticos podem produzir diversos compostos como auxina, solubilização de micronutrientes essenciais para planta, produção de sideróforos entre outras características que auxiliam no desenvolvimento da planta. Em trabalho desenvolvido por Karthik et al. (2017), bactérias endofíticas, isoladas de cultivares de bananeira, foram capazes de promover crescimento em tomateiro devido a capacidade de produção de auxina e

sideróforo.

Estes microrganismos também são conhecidos por apresentarem atividade antagônica (DOLEY & JHA, 2016; LANNA-FILHO et al., 2017; SHAHZAD et al., 2017), podendo inibir crescimento de fungos em taxas consideráveis devido a produção de compostos orgânicos voláteis pela bactéria endofítica (GAO et al., 2017). Rocha et al. (2017) também estudaram a capacidade de bactérias do gênero *Bacillus* em inibir o crescimento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e os autores verificaram que uma estirpe de *B. cereus* foi capaz de controlar 100% do dano causado pela raça 1 do fungo quando inoculadas em plantas em substrato contaminado com o fungo, *B. megaterium* foi capaz de controlar 100% do dano causado pela raça 2 e *B. toyonensis* controlou 100% do dano causado pela raça 2 e 3 do fungo. Em experimento *in vitro*, os autores verificaram que o efeito antagônico das bactérias estudadas contra as raças do fungo pode estar relacionado com a atividade proteolítica e celulolítica que estas possuem. Assim sendo, podemos dizer que as bactérias endofíticas são importantíssimas já que não só controlam doenças como também promove crescimento das plantas, o que pode contribuir positivamente na produtividade (SINGH et al., 2017).

Outra contribuição importante sobre as bactérias endofíticas é que possuem potencial promissor como agentes entomopatogênicos, sendo indicadas para controle biológico de pragas de importância econômica e como inoculantes para plantas (BENSIDHOUM et al., 2016; SCHELLENBERGER et al., 2016). Alguns trabalhos, foco deste projeto de tese, foram realizados para avaliar o potencial entomopatogênico de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*. Como exemplo podemos citar o trabalho desenvolvido por Melatti et al. (2010) que demonstraram a toxicidade de cinco estirpes de *Bt* (S29, S40, S616, S1168 e S1576) contra *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae), causando altas taxas de mortalidade. As estirpes S29 e S1168 apresentaram melhores resultados, causando taxas de mortalidade de 76 e 73%, respectivamente. Monnerat et al. (2003) também verificaram que lagartas de *S. frugiperda* morreram cinco dias após o início do ensaio quando alimentadas de folhas de algodão inoculadas com *Bt*. Os autores verificaram a presença da bactéria no macerado das lagartas após isolamento e constataram que a estirpe isolada continha proteína e os genes *cryI*, comprovando que o controle das lagartas se deu pela ingestão da bactéria. Em outro estudo realizado por Monnerat et al. (2009) foi demonstrada a capacidade da estirpe HD-1 de *Bt* em colonizar plantas de algodão e couve e, além disso, causar toxicidade contra as pragas *S. frugiperda* (algodão) e *Plutella xylostela* (couve) quando alimentadas com folhas tratadas com a bactéria, mostrando o potencial que a bactéria endofítica *Bt* apresenta no controle de pragas. O trabalho desenvolvido por Monnerat et al. (2009) abriu um leque para estudos de novas estratégias de uso de *Bt*, pois ficou comprovado que algumas estirpes são capazes de colonizar endofiticamente plantas de interesse agrícola e translocar no interior da planta. Acredita-se que o comportamento endofítico faz desse microrganismo um agente de controle promissor, pois dessa maneira podem permanecer nas áreas de cultivo por mais tempo, potencializando o controle das pragas e com isso o desenvolvimento da planta.

3 JUSTIFICATIVA

A cultura da cana-de-açúcar possui grande importância no cenário econômico do país. No entanto, a produção desta cultura é afetada pelo ataque de diversas pragas, como por exemplo a broca gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus licus*, Drury) que pode gerar prejuízos quantitativos além de afetar na qualidade da cana colhida.

As tecnologias conhecidas atualmente para o controle da broca gigante têm se mostrado ineficientes. Sob esta ótica, a necessidade em encontrar alternativas de controle para a broca gigante, foi despertado o interesse em utilizar bactérias endofíticas como agente de controle biológico.

O grupo de pesquisa do laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia, local aonde os experimentos deste trabalho foram realizados, possui o histórico de uso de endofíticos para promoção de crescimento de plantas e controle de fungo fitopatogênico. Alguns microrganismos utilizados nos projetos de pesquisa já desenvolvidos foram provenientes do líquido do apoplasto de cana-de-açúcar, o qual possui um ambiente que favorece o desenvolvimento de microrganismos. Em um trabalho anterior, desenvolvido por Melo et al. (2010), foram encontradas espécies de *Bacillus* além de um isolado de *Bacillus thuringiensis* colonizando o interior dos colmos de cana-de-açúcar.

A bactéria *B. thuringiensis* é conhecida por possuir grande potencial de uso no controle de pragas de importância econômica. Essa aptidão se deve às suas características de esporulação e produção de toxinas específicas para algumas ordens de insetos. Diante das características promissoras deste microrganismo, este trabalho investigou a presença de *B. thuringiensis* endofíticos no líquido do apoplasto, na região central dos entrenós e nas raízes de cana-de-açúcar. Sabe-se que a bactéria *B. thuringiensis* pode translocar no interior de plantas (MONNERAT et al., 2009) e, como a lagarta da broca gigante pode se alimentar das raízes após o corte da cana (NEGRISOLI JÚNIOR et al., 2015) a investigação da microbiota presente no interior das raízes também possui sua importância.

Uma das grandes dificuldades existentes após o isolamento de *B. thuringiensis* é a sua correta identificação. Neste trabalho, foram empregadas metodologias para identificar esses isolados como a amplificação da região do 16S rRNA, que é uma metodologia utilizada de forma rotineira para estudos filogenéticos, pois permite identificar microrganismos através da determinação de similaridade entre sequências de vários microrganismos (TINDALL et al., 2010). No entanto, o fato dos genes que codificam regiões conservadas do RNA ribossomal sofrerem variações lentamente ao longo da evolução é um fator limitante para discriminar de forma adequada algumas espécies bacterianas, visto que funções essenciais do RNA ribossomal apresentam pouca variação entre as espécies (MADIGAN et al., 2016), como o caso de *B. thuringiensis* e *B. cereus*, as quais são muito similares.

Diante desse entrave, outros métodos foram utilizados para discriminar os isolados bacterianos e classificá-los em nível de espécie. Uma das formas utilizadas para diferenciar as duas espécies foi o uso de um microscópio ótico com contraste de fase para avaliar a presença de cristais proteicos produzidos por *B. thuringiensis*, já que as bactérias da espécie *B. cereus* não são capazes de produzir os cristais proteicos (DA SILVA, DIAS & MONNERAT et al., 2002). A amplificação do regulador transcricional XRE, que é capaz de controlar a produção da maioria dos cristais proteicos produzidos por *B. thuringiensis* (WEI et al., 2019) também auxiliou na identificação dos isolados obtidos.

De modo a caracterizar as bactérias isoladas, foi realizada a amplificação de genes *cry* por meio de PCR e a visualização de proteínas produzidas pelos isolados bacterianos em gel de poliacrilamida.

Espera-se que o presente trabalho contribua para o esclarecimento de assuntos referentes a identificação de *B. thuringiensis* e ao uso de endofíticos no controle biológico de pragas além de gerar interesses para futuras investigações científicas.

4 HIPÓTESE

Estirpes endofíticas do gênero *Bacillus*, principalmente *B. thuringiensis*, possuem potencial entomotóxico contra a broca gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus licus*).

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Isolar, caracterizar e selecionar bactérias formadoras de endósporos contra a broca gigante da cana-de-açúcar.

5.2 Objetivos Específicos

- Isolar bactérias formadoras de endósporos presentes no líquido do apoplasto, da região central dos entrenós e de raízes de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no estado de Alagoas, e do trato digestivo da broca gigante presentes em áreas infestadas;
- Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente os isolados bacterianos através da produção de esporos, coloração de Gram, BOX-PCR, amplificação de genes conservados (*housekeeping*) e amplificação do regulador transcricional XRE;
- Caracterizar taxonomicamente os isolados através da amplificação e sequenciamento da região 16S RNAr;
- Identificar os genes *cry1*, *cry2* e *cry9* nas estirpes caracterizadas taxonomicamente como *Bacillus thuringiensis* através da técnica de PCR;
- Selecionar estirpes com potencial entomopatogênico para o controle da broca gigante em bioensaios realizados *in vitro*.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Coleta de material em usinas no estado de Alagoas

O material utilizado para isolamento de bactérias endofíticas foi coletado em junho de 2016 e foi proveniente de três usinas (material vegetal jovem e sadio – plantio de inverno) e duas usinas (lagartas da broca gigante) produtoras de cana-de-açúcar nos municípios Coruripe, Boca da Mata e São Luís do Quitunde no Estado de Alagoas (Tabela 1). Foram coletados 15 colmos sadios de cana-de-açúcar por usina, sendo cinco colmos provenientes de uma subárea da usina.

Tabela 1. Localização de usinas de cana-de-açúcar de três municípios do Estado de Alagoas utilizadas para a coleta de material vegetal e número de entrenós das variedades de cana cultivadas.

Usina	Localização	Variedade	Subamostra	Nº de entrenós
Coruripe (Município Coruripe)	Subárea 1 Lat: -10.040216 Long: -36.264507	RB92 579 (5 colmos)	1	6
			2	6
			3	6
	Subárea 2 Lat: -10.035354 Long: -36.263864	RB92 579 (5 colmos)	1	6
			2	6
			3	6
	Subárea 3 Lat: -10.100223 Long: - 36.274595	RB92 579 (5 colmos)	1	6
			2	6
			3	6
Triunfo (Município Boca da Mata)	Subárea 1 Lat: -9.672355 Long: -36.097644	RB86 7515 (5 colmos)	1	6
			2	6
			3	6
	Subárea 2 Lat: -9.664695 Long: -36.098515	RB86 7515 (5 colmos)	1	6
			2	6
			3	6
	Subárea 3 Lat: -9.66439 Long: -36.100461	RB86 7515 (5 colmos)	1	6
			2	6
			3	6
Santo Antônio (Município São Luís do Quitunde)	Subárea 1 Lat: -9.211982 Long: -35.584677	Pé de Ferro (5 colmos)	1	6
			2	6
			3	6
	Subárea 2 Lat: - 9.208459 Long: -35.584392	RB95 1541 (5 colmos)	1	6
			2	6
			3	6
	Subárea 3 Lat: -9.201977 Long: -35.571106	RB92 579 (5 colmos)	1	6
			2	6
			3	6

Para isolamento de bactérias endofíticas do líquido do apoplasto foram utilizados seis entrenós de cada subárea da usina. E, após a extração desse líquido, os mesmos entrenós tiveram a parte externa removida para maceração e isolamento de bactérias endofíticas da região central dos entrenós.

As raízes de cana-de-açúcar utilizadas para isolamento de bactérias endofíticas foram coletadas nas três usinas de cana-de-açúcar e isoladas após a desinfestação superficial destas.

As lagartas da broca gigante (*Telchin licus licus*) foram coletadas nas usinas Triunfo (VAT 90 212) e Santo Antônio (RB 92 579). Para isolamento de bactérias foi realizada a remoção do trato digestivo dessas lagartas. Os tratos digestivos das lagartas provenientes da usina Triunfo foram divididos em quatro subamostras (sendo dez tratos digestivos por subamostra) totalizando 40 lagartas e, uma amostra de dez lagartas coletadas na usina Santo Antônio. Não foi possível realizar a coleta de lagartas na Usina Coruripe, visto que a equipe de coleta de pragas da empresa não pode auxiliar no dia da coleta do material vegetal.

6.2 Obtenção das amostras para isolamento de bactérias endofíticas da cana-de-açúcar

6.2.1 Bactérias do líquido do apoplasto de plantas de cana-de-açúcar

O líquido do apoplasto de cana-de-açúcar foi coletado para isolamento bacteriano seguindo protocolo de Dong et al. (1994). Os colmos coletados foram lavados com detergente neutro e água corrente. Em seguida foram secos com papel toalha e descascados. Os entrenós foram cortados em pedaços de aproximadamente quatro centímetros e esterilizados superficialmente através da flambagem com etanol. Após a esterilização superficial, os entrenós foram colocados em tubos Falcon contendo um tubo de 0,5µL em seu interior, a fim de evitar o contato do líquido extraído com o entrenó. Os tubos foram centrifugados a 3000g durante 20 minutos a uma temperatura de 20°C, mantendo assim as propriedades do líquido e evitando a extração do líquido do simplasto. Todo o líquido extraído foi removido do tubo com auxílio de uma pipeta e pasteurizado, conforme descrito no item 6.4.

6.2.2 Bactérias da região central dos entrenós de cana-de-açúcar

Os materiais utilizados para isolamento de bactérias da região central foram os mesmos entrenós usados para extração do líquido do apoplasto. Após a extração do líquido do apoplasto, toda a parte externa dos entrenós foi cortada com uma faca. A região central foi macerada com 40mL de solução salina (ANEXO A) (BALDANI, 1980) e auxílio de um mixer (marca IKA®, Modelo: A11 BS1). O material macerado passou por um processo de pasteurização.

6.2.3 Bactérias das raízes de cana-de-açúcar

As raízes de cana-de-açúcar foram inicialmente lavadas em água corrente e o excesso de água foi removido com papel toalha. Em seguida, foi realizada a desinfestação superficial das raízes seguindo protocolo de Döbereiner et al. (1995). O processo consistiu na imersão das raízes em solução de cloramina-T a 1% ($C_7H_7ClNNaO_2S_3H_2O$) por um período de 30 minutos. As raízes foram retiradas da solução de cloramina-T e colocadas em frascos contendo água destilada por 1/3 do tempo da exposição a cloramina-T, sendo esta etapa realizada duas vezes. Em seguida, foram transferidas para frasco contendo solução tampão fosfato 0,05M (pH 7,0) e lavadas em água destilada estéril. Todos os procedimentos de desinfestação foram realizados em capela para evitar possíveis contaminações e a última água

utilizada para lavagem foi plaqueada em meio de cultivo para verificar se a esterilização foi satisfatória. Após a desinfestação, as raízes foram maceradas com mixer (marca IKA®, Modelo: A11 BS1) utilizando 40mL de solução salina (ANEXO A) (BALDANI, 1980) e em seguida pasteurizado, conforme descrito no item 6.4.

6.3 Obtenção de amostras para isolamento de bactérias presentes no trato digestivo das lagartas

As lagartas da broca gigante de cana-de-açúcar foram mortas, colocando-as por aproximadamente cinco minutos em frasco fechado contendo algodão embebido com clorofórmio. Após esse processo, as lagartas foram desinfestadas superficialmente através da imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% durante um minuto e em seguida lavadas três vezes com água destilada estéril para remoção do excesso de hipoclorito (MILANO, 2012). Para a remoção do trato digestivo, a cabeça e o último urômero da larva foram removidos com bisturi e o trato digestivo foi retirado com auxílio de uma pinça, puxando o mesmo para o exterior da larva (Figura 10). O trato digestivo foi macerado com solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%) utilizando bastão de vidro e pasteurizado, conforme descrito no item 6.4.



Figura 10. Trato digestivo da broca gigante (*Telchin licus licus*).

6.4 Processo de pasteurização e isolamento das bactérias formadoras de endósporos

Com o objetivo de reduzir a carga microbiana das amostras e isolar bactérias formadoras de endósporos, alíquotas de 1mL do líquido do apoplasto, do macerado da região central dos entrenós, das raízes e do trato digestivo passaram por um processo de pasteurização seguindo protocolo da World Health Organization (1999). As alíquotas foram colocadas em microtubos eppendorf de 1,5 mL e submetidos à temperatura de 80°C durante 12 minutos seguido de incubação no gelo por cinco minutos.

As amostras pasteurizadas foram diluídas (10^0 , 10^{-1} e 10^{-2}) e 100 μ L de cada diluição foram semeados em placas de Petri (90x15mm) contendo meio BHI sólido com pH 7,0 (Brain Heart Infusion da marca Becton, Dickinson and Company®, USA). Em seguida, as placas foram incubadas a 30°C por 16 horas. Ao final deste período, as bactérias com características morfológicas semelhantes a bactérias do gênero *Bacillus* foram repicadas para tubos contendo meio BHI sólido, pH 7,0 (Brain Heart Infusion da marca Becton, Dickinson and Company®, USA) e armazenados com óleo mineral para posterior caracterização.

De modo a garantir a sobrevivência somente dos microrganismos de interesse desse trabalho, o processo de pasteurização foi realizado duas vezes. No entanto, na segunda etapa de pasteurização, as bactérias isoladas na primeira etapa foram crescidas em meio BHI líquido

pH 7,0 (Brain Heart Infusion da marca Becton, Dickinson and Company®, USA) e a cultura bacteriana foi pasteurizada e plaqueada em BHI sólido pH 7,0.

6.5 Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos através da coloração de Gram

O teste de coloração de Gram foi realizado para confirmar a característica de Gram-positiva dos isolados obtidos. Os isolados bacterianos foram crescidos em placas de Petri contendo meio BHI sólido, pH7,0 (Brain Heart Infusion da marca Becton, Dickinson and Company®, USA) e as placas incubadas a temperatura de 30°C por 16 horas. Para seguir as etapas de coloração de Gram foi feito um esfregaço com a bactéria crescida e duas gotas de água na lâmina de vidro. O esfregaço foi misturado com alça de platina a fim de deixá-lo homogêneo. Antes de iniciar as etapas de coloração, foi preciso esperar a água evaporar da lâmina de vidro e, em seguida, fixar o esfregaço sobre a lâmina, passando-a três vezes sobre a chama do Bico de Bunsen. Um mL das soluções de Gram foi colocado sobre o esfregaço, nessa ordem: 1º - Solução corante de cristal violeta por 1 minuto; 2º - Solução de lugol por 1 minuto; 3º - Solução de etanol/acetona (o esfregaço foi coberto com a solução e este lavado com água destilada), e 4º - Solução corante de safranina por 30 segundos. Entre a aplicação de cada solução de coloração, a lâmina foi lavada com água destilada. Após a última lavagem, o esfregaço foi seco cuidadosamente com auxílio de papel toalha e as bactérias coradas foram observadas em microscópio óptico com objetiva de imersão em aumento de 100X (GRAM, 1884).

6.6 Extração de DNA

A extração de DNA dos isolados bacterianos foi realizada utilizando o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corporation, an affiliate of Promega Biotecnologia do Brasil, Ltda.) para extração de DNA cromossomal. O DNA extraído foi quantificado através de fluorometria utilizando o kit Qubit™ dsDNA BR Assay (Q32853 - Thermo Fisher Scientific) e utilizado nas reações de amplificação através de PCR (Reações em Cadeia da Polimerase).

6.7 Análise da diversidade bacteriana dos isolados de *Bacillus* originários de tecidos da cana-de-açúcar e do trato digestivo da broca gigante

A diversidade bacteriana dos isolados provenientes dos tecidos de cana-de-açúcar e do trato digestivo foi analisada pela técnica de BOX-PCR (*fingerprinting* ou impressão digital do genoma) por meio do iniciador A1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') (VERSALOVIC et al., 1994) para amplificação das regiões repetitivas do genoma. A técnica consistiu em amplificar o DNA utilizando o iniciador complementar, conservado e com sequência repetitiva, presente em múltiplas cópias do genoma da maioria das bactérias (LUPSKI & WEINSTOCK, 1992). Essa técnica de amplificação de DNA permite uma análise simples, rápida e reprodutível (LUPSKI & WEINSTOCK, 1992; REYES-RAMIREZ & IBARRA, 2005).

O iniciador A1R possui temperatura de anelamento de 50°C e as condições utilizadas para amplificação do DNA dos isolados bacterianos foram: 10ng.µL⁻¹ de DNA, 1mM do iniciador, 2X tampão, 3mM MgCl₂, 0,3mM de dNTP e 5U de *GoTaq*® DNA polymerase (Promega), para volume final de 25µL. A incubação no termociclador (SureCycler 8800, G8800A, Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, USA) ocorreu com as seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação da fita dupla de DNA de 95°C por dez minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 50°C por um minuto e

polimerização a 65°C por oito minutos. Ao final dos 40 ciclos, a amplificação foi submetida a uma temperatura de extensão final a 65°C por 16 minutos. O DNA amplificado dos isolados bacterianos foi avaliado em gel de agarose a 2%, aplicando 10µL da amostra amplificada. O gel foi migrado com corrente de 70Volts e duração de 5 horas. Para visualização dos fragmentos de DNA amplificados, o gel foi corado com brometo de etídio e fotografado no fotodocumentador (L-PIX, Loccus). As bandas de DNA amplificadas foram identificadas utilizando o *software* BioNumerics (BioNumerics, Applied Maths NV.) e o dendrograma gerado utilizando análise UPGMA com coeficiente Jaccard (BioNumerics, Applied Maths NV.). A tolerância adotada para calcular o coeficiente de similaridade das bandas foi de 3% e 1% de otimização, pois foram os parâmetros que possibilitaram um melhor agrupamento dos isolados. Os modelos de árvores foram gerados com base no modelo indicado pelo programa MEGA v.7.0 (KUMAR et al., 2016).

6.8 Amplificação e sequenciamento da região 16S rRNA

A região que codifica o gene 16S RNAr dos isolados bacterianos Gram-positivos foi amplificada por meio de Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os iniciadores 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') (FURUSHITA et al., 2003) e Amp2 (5'-AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA-3') (WANG et al., 1996). Os reagentes foram ajustados para concentrações de 50ng de DNA cromossomal, 1X tampão, 2,0mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 1U *GoTaq*[®] DNA polymerase (Promega) e 0,2pMol de cada primer em um volume final de reação de 50 µL. Essas reações foram incubadas no termociclador (SureCycler 8800, G8800A, Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, USA) e as condições de amplificação foram temperatura inicial de desnaturação da fita dupla de DNA de 94°C por três minutos, seguido de 29 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 65°C por um minuto e polimerização a 72°C por cinco minutos. Ao final dos 29 ciclos, a amplificação foi submetida a temperatura de extensão final de 72°C por cinco minutos. O fragmento amplificado foi avaliado em gel de agarose com concentração de 0,7% (corrente de 100Volts). Para visualização do DNA amplificado, o gel foi corado com brometo de etídio e fotografado no fotodocumentador (L-PIX, Loccus). O produto de PCR foi sequenciado no sequenciador automático 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystem[®]) do Laboratório de Genômica da Embrapa Agrobiologia. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o *software* BioEdit e então estas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados (Genbank database - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando o programa BLAST-N (ALTSCHUL et al., 1997). As sequências foram analisadas filogeneticamente e em seguida uma árvore filogenética foi construída com o programa MEGA versão 7.0 (KUMAR et al., 2016), utilizando método estatístico *Neighbor-Joining* (NJ) e Bootstrap de 1000 réplicas, levando em consideração as diferenças e homologias entre sequências para conhecer a história evolutiva dos microrganismos.

6.9 Caracterização genotípica

6.9.1 Amplificação dos genes *cry1*, *cry2* e *cry9*

A presença de genes *cry* no genoma dos isolados foi avaliada através da amplificação por meio de PCR, utilizando a concentração de DNA de 20ng, 100pmol de cada iniciador, 1U de *GoTaq*® DNA polymerase, 250µM de dNTP, 1X tampão e 2mM de MgCl₂ para um volume final de reação de 20µL. Os iniciadores escolhidos para amplificação dos genes *cry* estão descritos na tabela 2, sendo esses específicos para as classes dos genes *cry1*, *cry2* e *cry9*, pois são os genes conhecidos por apresentarem atividade entomopatogênica contra insetos da ordem Lepidoptera.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes *cry1*, *cry2* e *cry9* de *Bacillus thuringiensis*.

Iniciadores	Sequência	Gene	Pares de bases	Temperatura de Anelamento (°C)
gral-cry1 F ¹	5'-CTGGATTTACAGGTGGGGATAT-3'	<i>cry1</i>	558	52
gral-cry1 R ¹	5'-TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT-3'			
cry2 F ²	5'-GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG-3'	<i>cry2</i>	700	55
cry2 R ²	5'-CGGATAAAATAATCTGGGAAATAG-3'			
spe-cry9B F ¹	5'-TCATTGGTATAAGAGTTGGTGATAGAC-3'	<i>cry9</i>	402	51
spe-cry9B R ¹	5'-CCGCTTCAATAACATCTTTT-3'			

¹BRAVO et al., 1998; ²BEN-DOV et al., 1997.

As condições de amplificação foram temperatura inicial de desnaturação da fita dupla de DNA de 95°C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, temperaturas de anelamento descritas na tabela 3 por um minuto e polimerização a 72°C por um minuto. Ao final dos 35 ciclos, a amplificação foi submetida a temperatura de extensão final de 72°C por cinco minutos. Ao término da reação, 10µL das amostras amplificadas foram analisadas em gel de agarose 1% utilizando uma corrente de 100Volts. O gel foi corado com brometo de etídio e fotografado no fotodocumentador (L-PIX, Loccus).

6.9.2 Amplificação do biomarcador XRE

Recentemente o regulador transcricional XRE foi testado para diferenciar *B. thuringiensis* de outras espécies do grupo de *B. cereus* (WEI et al., 2019). Os autores obtiveram sucesso na identificação das espécies de *Bt*, com precisão de 97,5%. Diante disso, procedeu-se à amplificação dos isolados bacterianos do grupo de *B. cereus* (separados de acordo com a árvore filogenética) utilizando os iniciadores desenhados por WEI et al. (2019): XRE F (5'-AAGATATTGCAAGCGGTAAGAT-3') e XRE R (5'-GTTTTGTTTCAGCATTCCAGTAA-3'). O tamanho esperado do fragmento amplificado é de 246 pb. As condições da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do biomarcador foi a concentração de DNA de 50ng, 10pmol de cada iniciador, 1U de *GoTaq*® DNA polymerase, 250µM de dNTP, 1X tampão e 2mM de MgCl₂ para um volume final de reação de 20µL. As condições de amplificação foram temperatura inicial de desnaturação da fita dupla de DNA de 95°C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 47°C por 30 segundos e polimerização a 72°C por 30 segundos. Ao final dos 35 ciclos, a amplificação foi submetida a temperatura de extensão final de 72°C por cinco minutos. O fragmento amplificado foi migrado em gel de agarose 1,5% utilizando uma corrente de 100Volts. Para visualização do fragmento de DNA amplificado, o gel de agarose foi corado com brometo de etídio e fotografado no fotodocumentador (L-PIX, Loccus).

6.9.3 Amplificação dos genes *housekeeping* *gmk*, *glp*, *pycA*, *pta*, *ilvD* e *tpi*

Para uma separação mais refinada das espécies *B. thuringiensis* das demais espécies do grupo de *B. cereus* foram utilizados marcadores moleculares. Os genes *housekeeping* selecionados estão publicados no banco de dados PubMLST bcereus (<https://pubmlst.org/bcereus/info/primers.shtml>).

As sequências dos pares de iniciadores utilizados, assim como tamanho de fragmento esperado e temperatura de anelamento estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes *housekeeping*.

Iniciador	Sequência	Gene	Pares de bases	Temperatura de Anelamento (°C)
gmk-F	5'-ATTTAAGTGAGGAAGGGTAGG-3'	<i>gmk</i> (guanilato quinase, putativa)	600	56
gmk-R	5'-GCAATGTTACCAACCACAA-3'			
glpF-F	5'-GCGTTTGTGCTGGTGTAAGT-3'	<i>glp</i> (proteína facilitadora da captação de glicérol)	549	59
glpF-R	5'-CTGCAATCGGAAGGAAGAAG-3'			
pycA-F	5'-GCGTTAGGTGGAAACGAAAG-3'	<i>pycA</i> (piruvato carboxilase)	550	57
pycA-R	5'-CGCGTCCAAGTTTATGGAAT-3'			
pta-F	5'-GCAGAGCGTTTAGCAAAAAGAA-3'	<i>pta</i> (fosfato acetiltransferase)	576	56
pta-R	5'-TGCAATGCGAGTTGCTTCTA-3'			
ilvD-F	5'-CGGGGCAAACATTAAGAGAA-3'	<i>ilvD</i> (dihidroxi-ácido desidratase)	556	58
ilvD-R	5'-GGTTCTGGTCGTTTCCATTC-3'			
tpi-F	5'-GCCCAGTAGCACTTAGCGAC-3'	<i>tpi</i> (triose-fosfato isomerase)	558	58
tpi-R	5'-CCGAAACCGTCAAGAATGAT-3'			

A condição da PCR foi igual para todos os genes, sendo utilizado uma concentração de DNA de 20ng, 10pmol de cada iniciador, 1U de *GoTaq*® DNA polymerase, 400µM de dNTP, 1X tampão e 2mM de MgCl₂ para um volume final de reação de 25µL. As condições de amplificação foram temperatura inicial de desnaturação da fita dupla de DNA de 95°C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento descritas na tabela 3 por 30 segundos e polimerização a 72°C por um minuto. Ao final dos 35 ciclos, a amplificação foi submetida a temperatura de extensão final de 72°C por 10 minutos. O fragmento amplificado foi visualizado em gel de agarose 1,5% utilizando uma corrente de 100Volts. O gel foi corado com brometo de etídio e fotografado no fotodocumentador (L-PIX, Locus). O produto de PCR foi sequenciado no sequenciador automático 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystem®) do Laboratório de Genômica da Embrapa Agrobiologia. As sequências foram alinhadas e as árvores filogenéticas construídas no programa MEGA v.7.0 (KUMAR et al., 2016) utilizando o método estatístico *Neighbor-Joining* (NJ) e as distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura 3-parâmetros. Sequências de espécies do gênero *Bacillus* depositadas no banco de dados NCBI foram utilizadas para agrupar os isolados bacterianos no dendrograma.

6.10 Indução de esporulação e produção de cristais proteicos

Como o estudo filogenético, com base na similaridade de sequências 16S rRNA, não é suficiente para discernir as espécies *B. thuringiensis* de *B. cereus*, uma alternativa para diferenciação destas espécies é a observação da produção de cristais proteicos por *B. thuringiensis*, já que *B. cereus* não produz tais cristais (LUTHY & WOLFERSBERGER, 2000; DA SILVA, DIAS & MONNERAT, 2002; FIÚZA et al., 2010). Para isso, os isolados bacterianos de cana-de-açúcar foram crescidos em 10 mL de meio HCT (ANEXO B) líquido em erlenmeyer com capacidade de 125 mL para induzir a esporulação (MUÑOZ-GARAY et al., 2009). A temperatura de incubação foi de 28°C, com rotação de 200rpm durante 24, 48 e 72 horas. Os esporos e cristais foram observados em microscópio óptico com contraste de fase e aumento de 100X.

6.11 Obtenção de proteína de *Bacillus thuringiensis* (esporos/cristais)

Isolados bacterianos agrupados no grupo de bactérias de *B. cereus* de acordo com análise filogenética foram ativados em placas de Petri contendo meio LB (Luria Bertani - K25-610084 - KASVI) e incubados por 12 horas a 30°C. Após esse período os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio HCT (ANEXO B) sólido, ajustado para pH 7,25 com KOH e mantidos durante três dias a 30°C para esporulação (MUÑOZ-GARAY et al., 2009). Uma pequena quantidade de material biológico foi visualizada em microscópio de contraste de fase (40X Ph3 e 100X oil) para verificar o desenvolvimento da cepa e a presença de cristais proteicos. Os esporos e cristais foram obtidos utilizando método descrito por Thomas e Ellar (1983) com modificações, o qual consiste em raspar os esporos e cristais das placas de Petri com auxílio de uma espátula. Esses esporos e cristais (obtidos a partir de 5 placas) foram ressuspensos em 30 mL água destilada pH 4,0 e centrifugados por 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C. Em seguida, os esporos e cristais foram lavados três vezes com 30 mL de 300 mM NaCl, 10 mM EDTA e três lavagens com 30 mL de água destilada contendo 1 mM de PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil - inibidor de serina protease utilizado para que a proteína não seja degradada) (P7626 da marca Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA). A cada etapa de lavagem as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C. Ao final do processo, os esporos e cristais foram ressuspensos em 5mL de água destilada com PMSF 1mM e armazenados a 4°C para posterior uso. As amostras foram quantificadas utilizando reativo de Bradford (Bio-Rad) e a concentração determinada com base na equação gerada com a curva padrão de albumina de soro bovino (BSA). Cerca de 5µg de proteínas totais foram aplicadas e observadas em SDS-Page 10%. O marcador de proteína utilizado foi o *Bench Mark Protein Ladder* e a corrida foi realizada com voltagem de 110 por duas horas. O gel de poliacrilamida 10% foi corado utilizando corante *Comasie Blue R* (*Comasie Blue R* + etanol + ácido acético) por uma hora e descorado com solução de etanol + ácido acético. As proteínas obtidas foram utilizadas em bioensaios contra lagartas da broca gigante utilizando o método de contaminação da superfície da dieta com suspensões de proteína em diferentes concentrações e a mortalidade foi monitorada ao longo de 15 dias (PORTUGAL et al., 2017).

6.12 Avaliação da capacidade entomopatogênica de *Bacillus* contra a broca gigante (*Telchin licus licus*) - bioensaios *in vitro*

Devido à grande dificuldade em criar a broca gigante em insetários, as lagartas utilizadas nos bioensaios foram coletadas em áreas produtoras de cana-de-açúcar da usina Triunfo, localizada no município de Boca da Mata em Alagoas. Para garantir tratamentos mais homogêneos os insetos passaram por um processo de separação por tamanho. Desta maneira, os tratamentos continham o mesmo número de lagartas grandes com tamanho acima de cinco centímetros (Figura 11), médias com tamanho entre quatro a cinco centímetros (Figura 12) e pequenas com até quatro centímetros de comprimento (Figura 13).



Figura 11. Lagarta de *Telchin licus licus* grande (tamanho acima de cinco centímetros).



Figura 12. Lagarta de *Telchin licus licus* média (tamanho entre quatro e cinco centímetros).



Figura 13. Lagarta de *Telchin licus licus* pequena (tamanho até quatro centímetros).

A administração das toxinas de *Bacillus* para as lagartas se deu de três maneiras: alimentação com dieta artificial (três bioensaios), alimentação com toletes de cana-de-açúcar estéreis (um bioensaio) e alimentação forçada com dieta líquida (um bioensaio). A dieta artificial utilizada foi a desenvolvida para a criação de *D. saccharalis* (ANEXO C) (PARRA

& MISHFELDT, 1992), já que até o momento não existe uma dieta específica para a broca gigante.

Com auxílio de um pincel, 100 μ L da suspensão de esporos/cristais, obtidos como descrito no item 6.11, foram espalhados sobre a dieta. Após secagem da suspensão de esporos foi adicionada uma lagarta em cada tubo contendo a dieta (Figura 14), formando assim uma repetição.

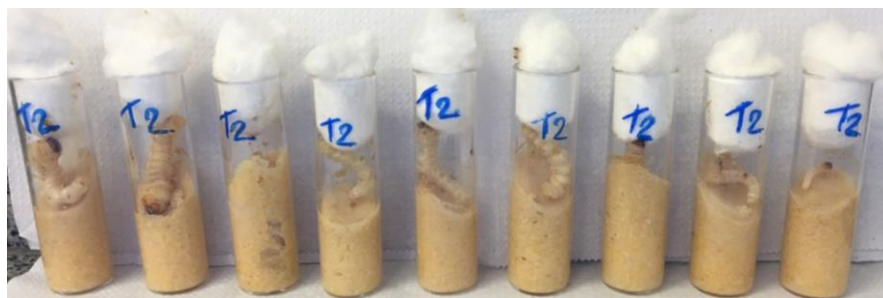


Figura 14. Tubos de vidro utilizados no bioensaio contendo dieta inoculada com suspensão de esporos e cristais seguidos da introdução da lagarta da broca gigante.

No bioensaio em que a fonte de alimento das lagartas foi o colmo da cana-de-açúcar variedade RB 867515, foram inoculados 50 μ L de proteína (esporos e cristais), obtidos conforme descrito no item 6.12, em cada tolete e a concentração de 1000ng foi testada. Cada tubo continha dois toletes de quatro centímetros e uma lagarta foi inserida por tubo, formando uma repetição (Figura 15).

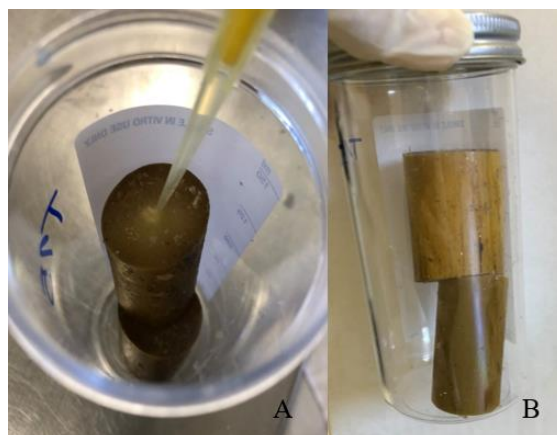


Figura 15. Toletes de cana-de-açúcar usados nos bioensaios contra *Telchin licus licus*. A) Inoculação da toxina de *Bacillus* nos toletes de cana-de-açúcar variedade RB 867515 e B) Toletes inoculados com a toxina acondicionados em tubos com capacidade de 150mL.

Um último bioensaio consistiu em colocar 4 μ L de toxina a uma concentração de 2000ng diretamente no aparato bucal das lagartas com auxílio de uma ponteira (Figura 16).



Figura 16. Administração forçada de dieta líquida com a toxina produzida por isolados de *Bacillus* em lagartas da broca gigante.

Após administração da suspensão de esporos/cristais ou toxinas, as lagartas foram mantidas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\% \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro (FONSECA, 2013).

Os insetos ficaram expostos a fonte inicial de alimentação ao longo de 15 dias, ou seja, não houve mudança de dieta e reinoculação da suspensão de esporos/cristais ou toxinas ao longo dos dias. Cada repetição foi composta por uma lagarta da broca gigante e taxa de mortalidade foi avaliada após 15 dias. A porcentagem de controle foi calculada utilizando a fórmula de Abbott (1925).

Foram realizados um total de cinco bioensaios com diferentes tratamentos que estão listados na tabela 4.

Tabela 4. Descrição dos cinco bioensaios *in vitro* contra a broca gigante da cana-de-açúcar e seus respectivos tratamentos.

Tratamentos	Bioensaios				
	1 ^a Julho/2018	2 ^a Setembro/2018	3 ^a Outubro/2018	4 ^b Outubro/2019	5 ^c Dezembro/2019
Dieta artificial + meio HCT ¹	X	X	X		
Água destilada + PMSF 1mM ²				X	X
FORCN005	X	X			
FORCN007	X	X		X	
FORCN008				X	
FORCN010	X	X			
FORCN012	X	X		X	
FORCN014	X	X	X	X	X
FORCN049	X	X			
FORCN066	X	X	X	X	X
FORCN067				X	
FORCN068	X	X			
FORCN071		X			
FORCN076				X	
FORCN104		X			
FORCN131		X			
FORCN134		X			
FORCN135				X	
<i>Bt</i> S76	X	X	X	X	X
<i>Bt</i> HD-1	X	X	X	X	X
Mistura com todos os isolados	X	X			
Número de tratamentos	12	16	5	11	5
Número de repetições ³	9	8	10	13	10
Concentração da toxina	*	*	*	1000ng	2000ng

¹Composição do meio HCT no ANEXO B (MUÑOZ-GARAY et al., 2009).

²PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil) (P7626 da marca Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA).

³Número de repetições é igual ao número de lagartas, ou seja, uma lagarta corresponde a uma repetição.

^aBioensaios utilizando dieta artificial como fonte de alimento.

^bBioensaio utilizando toletes de cana-de-açúcar variedade RB 867515 autoclavados como fonte de alimento.

^cBioensaio utilizando dieta líquida como fonte de alimento.

*Foi administrada 100µL da suspensão de esporos/cristais sobre a dieta artificial.

Dieta artificial + meio HCT foi utilizada como controle negativo nos bioensaios 1, 2 e 3.

Tolete de cana (RB867515) inoculado com água destilada + PMSF 1mM foi utilizado como controle negativo no bioensaio 4.

Água destilada + PMSF 1mM utilizada como controle negativo no bioensaios 5.

Como controles positivos foram utilizadas as estirpes S76 e HD-1 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Isolamento de bactérias do gênero *Bacillus* do apoplasto, da região central dos entrenós, das raízes e do trato digestivo de *Telchin licus licus*

Após o isolamento e o primeiro processo de pasteurização, verificou-se que, de um total de 796 isolados obtidos, 45,4% das eram provenientes da região central dos entrenós de cana-de-açúcar (361 isolados), 27,6% do líquido do apoplasto (220 isolados), 19,8% provenientes das raízes (158 isolados) e 7,2% foram isolados do trato digestivo da broca gigante (57 isolados).

Mesmo após a realização do processo de pasteurização, muitas bactérias apresentaram características de bactérias Gram-negativas (coloração avermelhada). Além disso, algumas bactérias isoladas não apresentavam as características morfológicas de *Bacillus* tais como colônias brancas, grandes, com bordas irregulares, opacas e aveludadas (LOGAN & VOS, 2011). Desta forma, acredita-se que a primeira etapa de pasteurização pode não ter sido suficiente para eliminar as bactérias Gram negativas, pois restos de tecidos da planta e do trato digestivo da broca podem ter garantido a sobrevivência desses microrganismos.

O plaqueamento das suspensões dos tecidos de cana-de-açúcar, após o primeiro processo de pasteurização, mostrou o crescimento de uma grande diversidade de bactérias (Figura 17A, 17B e 17C). Já os isolados provenientes do trato digestivo da broca gigante não apresentaram diversidade morfológica das colônias (Figura 17D).

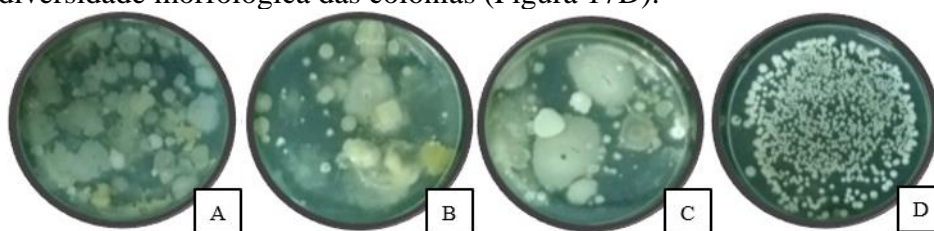


Figura 17. Visão geral da diversidade de colônias em meio BHI usado para o isolamento de bactérias presentes na região central dos entrenós (A), no líquido do apoplasto (B), nas raízes de cana-de-açúcar (C) e no trato digestivo da broca gigante (D).

A baixa diversidade morfológica das colônias das bactérias do trato digestivo pode ser resultado do menor número de isolados obtidos (57 isolados) em comparação com o número de isolados obtidos a partir dos tecidos de cana-de-açúcar.

7.2 Isolados bacterianos crescidos após o segundo processo de pasteurização e caracterização fenotípica

Após o segundo processo de pasteurização, realizado com os 796 isolados bacterianos, 425 isolados cresceram nas placas contendo o meio BHI sólido pH 7,0 (Brain Heart Infusion da marca Becton, Dickinson and Company®, USA), sendo que 41,2% eram provenientes da região central dos entrenós, 25,4% do líquido do apoplasto, 22,1% das raízes e 11,3% do trato digestivo da broca gigante (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito do segundo processo de pasteurização no número de isolados e porcentagem de bactérias que apresentaram coloração de Gram positiva.

Nicho	1ª Past. ¹	2ª Past. ²	Gram Positivas ³	% Bactérias Gram positivas ⁴
Apoplasto	220	108	46	28,5
Região central dos entrenós	361	175	46	28,5
Raiz	158	94	50	31,0
Tubo digestivo	57	48	19	12,0
TOTAL	796	425	161	-

¹Número de bactérias obtidas após o primeiro processo de pasteurização.

²Número de isolados bacterianos que cresceram após a segunda pasteurização (A segunda pasteurização foi realizada com os 796 isolados obtidos na primeira pasteurização).

³Número de bactérias Gram-positivas após a segunda pasteurização.

⁴Porcentagem em relação a segunda pasteurização.

Os microrganismos endofíticos se beneficiam do ambiente rico e favorável no interior das plantas, se multiplicam e auxiliam no desenvolvimento da planta hospedeira, já que produzem compostos como auxina, solubilizam micronutrientes essenciais para planta além de produzirem sideróforos (KARTHIK et al., 2017). Deste modo, a quantidade de nutrientes disponíveis nos tecidos internos de cana-de-açúcar pode ter favorecido o estabelecimento de microrganismos, refletindo no número de isolados obtidos desses nichos.

Estudos de caracterização de espécies que colonizam tecidos de plantas mostram como a comunidade bacteriana desses nichos é complexa, sendo formada por uma grande diversidade de microrganismos, como mostrou o trabalho desenvolvido por Velázquez et al. (2008). Os autores isolaram bactérias de onze gêneros (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Comamonas*, *Xanthomonas*, *Acinetobacter* e *Pantoea*) do apoplasto e colmos de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Cuba. Já Wang et al. (2020) isolaram onze espécies endofíticas de *Bacillus* de raízes de cana-de-açúcar, como *B. luciferensis*, *B. aryabhatai*, *B. altitudinis*, *B. tequilensis*, *B. megaterium*, *B. acidiceler*, *B. pacificus*, *B. solisilvae*, *B. velezensis*, *B. tropicus* e *B. australimaris*.

Diferentemente dos tecidos de plantas de cana-de-açúcar, os quais proporcionam condições favoráveis ao desenvolvimento e estabelecimento de microrganismos (KARTHIK et al., 2017), o trato digestivo da broca gigante possui pH alcalino (em torno de 9,5), o que pode dificultar o estabelecimento e sobrevivência de microrganismos (BRAVO et al., 2013). Esse fato poderia explicar a obtenção de menor número de colônias crescidas no isolamento de bactérias desse nicho.

O processo de coloração de Gram aplicado mostrou que dos 425 isolados, crescidos após a segunda pasteurização, 161 apresentaram coloração azulada, característica de bactérias Gram positivas (Tabela 5). Mesmo após submeter as bactérias duas vezes ao processo de pasteurização, muitas apresentaram células com coloração avermelhada (Gram negativas). O teste de coloração de Gram pode apresentar variações na coloração dependendo do tempo de vida da cultura bacteriana (CLAUS, 1992) e as bactérias podem ser chamadas de Gram variáveis. Keita et al. (2013) e Rocha et al. (2017) também observaram esta variação na coloração para espécies de *Bacillus*.

7.3 Diversidade bacteriana dos isolados de cana-de-açúcar e da broca gigante

A análise dos resultados obtidos pela técnica de BOX-PCR mostrou perfis de bandas bastante diversificados entre os isolados bacterianos. Alguns exemplos dos perfis de bandas obtidos após a amplificação das regiões BOX são apresentados na figura 18.

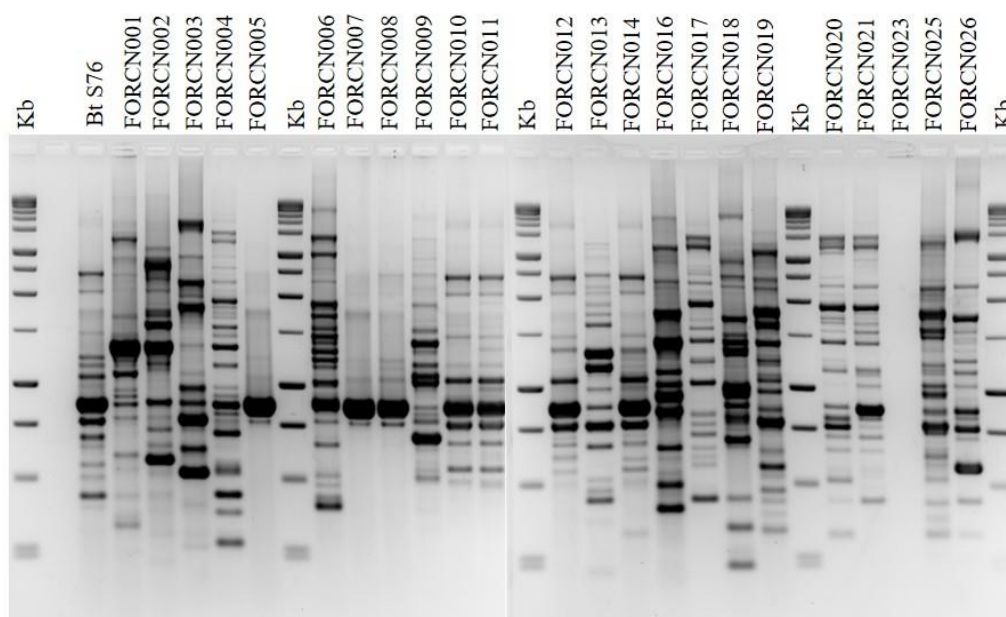


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose a 2,0% mostrando os perfis de bandas dos isolados bacterianos de diferentes nichos de plantas de cana-de-açúcar e do trato digestivo da broca gigante. Perfis gerados após a amplificação por PCR das regiões BOX utilizando o iniciador A1R. Perfis de bandas de *Bt S76* (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* estirpe S76), FORCN001 (*B. licheniformis*), FORCN002 (*B. licheniformis*), FORCN003 (*B. megaterium*), FORCN004 (*B. aerius*), FORCN005 (*B. thuringiensis*), FORCN006 (*B. subtilis*), FORCN007 (*B. wiedmannii*), FORCN008 (*B. proteolyticus*), FORCN009 (*B. subterraneus*), FORCN010 (*B. cereus*), FORCN011 (*B. cereus*), FORCN012 (*B. cereus*), FORCN013 (*B. australimaris*), FORCN014 (*B. cereus*), FORCN016 (*Paenibacillus vulneris*), FORCN017 (*B. aerius*), FORCN018 (*B. aerius*), FORCN019 (*B. megaterium*), FORCN020 (*B. aerius*), FORCN021 (*B. aerius*), FORCN023 (*B. aerius*), FORCN025 (*B. megaterium*) e FORCN026 (*B. safensis*).

Os perfis de BOX-PCR de 156 isolados foram analisados e o dendrograma gerado indica que existe elevada variabilidade entre os isolados bacterianos (Figura 19). Os isolados FORCN023, FORCN084, FORCN097, FORCN155 e FORCN161 não amplificaram e por isso não entraram na análise.

As espécies bacterianas apresentaram 127 padrões distintos de bandas. O resultado mostra a grande diversidade de bactérias presentes nos diferentes nichos de plantas de cana-de-açúcar e no trato digestivo da broca gigante. Os padrões de bandas detectados variaram de

1 a 28 em número e de 100 a 5000 pb em tamanho. Ao comparar o perfil de bandas dos isolados bacterianos caracterizados taxonomicamente como pertencente ao grupo de *B. cereus*, foi verificado que grande parte desses isolados apresentou baixo número de bandas polimórficas e ficaram agrupados no mesmo clado ou em grupos próximos no dendrograma (Figura 19). O baixo número de bandas polimórficas sugere que esta pode ser uma característica do genoma dos isolados bacterianos do grupo de *B. cereus* obtidos neste trabalho.

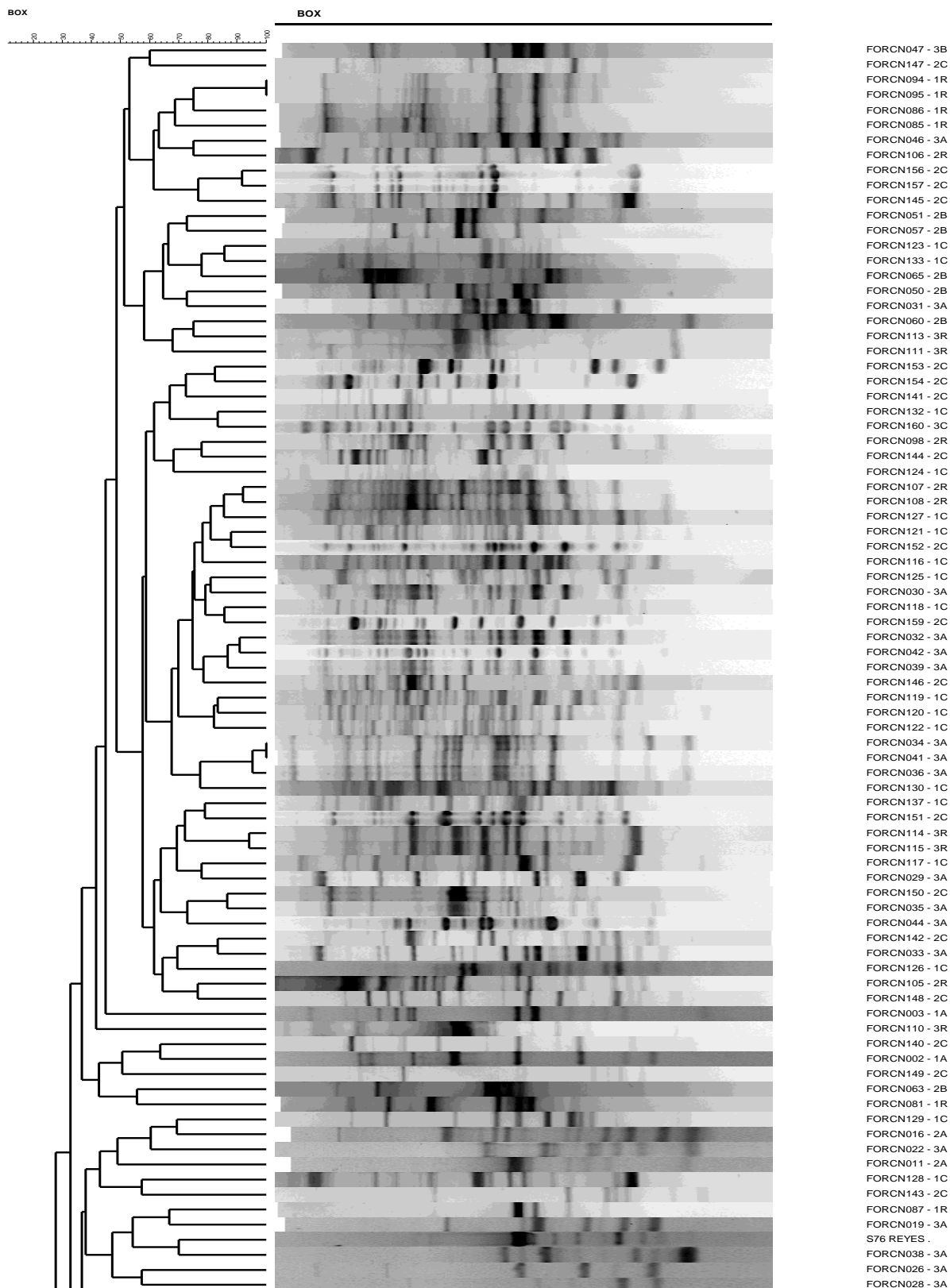


Figura 19. Dendrograma de similaridade UPGMA de padrões BOX-PCR de 159 isolados bacterianos de plantas de cana-de-açúcar e do trato digestivo da broca gigante (Continua).

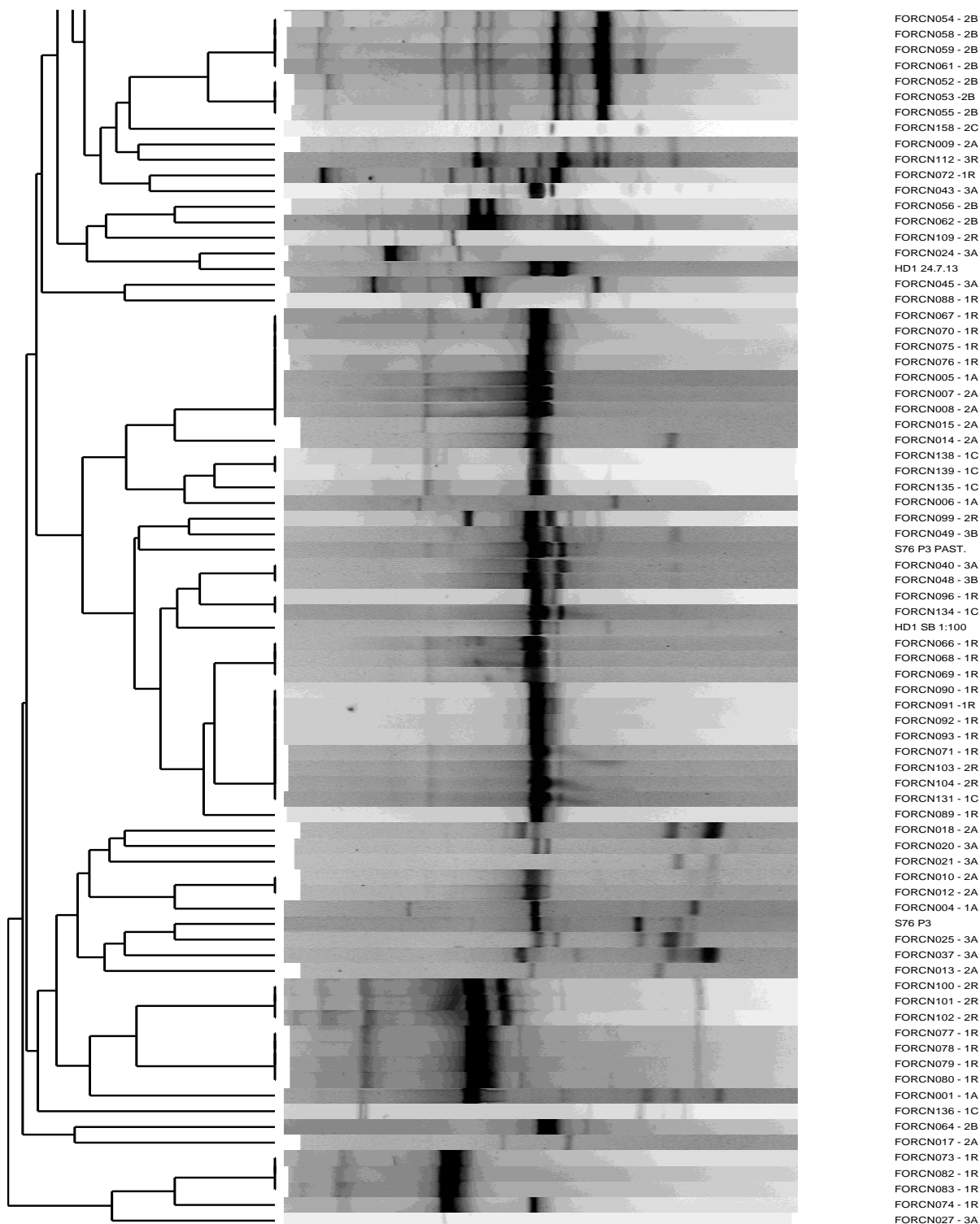


Figura 19. Continuação.

Não existem trabalhos na literatura com informações a respeito do baixo número de bandas como uma característica das bactérias pertencentes ao grupo *B. cereus*. No entanto, em trabalho desenvolvido por Cherif et al. (2007), a análise dos perfis de bandas gerados mostrou que algumas estirpes apresentaram poucas bandas amplificadas, como por exemplo a estirpe HD-1 de *B. thuringiensis*. Neste trabalho a estirpe HD-1 também apresentou baixo número de bandas, podendo ser esta uma característica da estirpe bacteriana.

A maioria dos isolados bacterianos, independente do nicho que foi isolado, não apresentou correspondência de bandas com os outros isolados analisados, sendo separados dos demais isolados no dendrograma. A análise de BOX-PCR mostrou que os diferentes nichos de cana-de-açúcar e o trato digestivo da broca gigante são diversos já que os isolados apresentaram diferentes perfis de bandas, o que pode indicar que são de outras espécies e/ou subespécies.

A técnica de amplificação de regiões repetitivas do genoma é muito utilizada para conhecer a relação entre as espécies estudadas e para discerni-las em sorotipos de diferentes microrganismos. Cherif et al. (2007) conseguiram separar *B. thuringiensis* de *B. cereus*, provenientes do departamento de Agricultura dos Estados Unidos, através de ERIC e BOX-PCR, mostrando que as bactérias da espécie *B. thuringiensis* fazem parte de um grupo diferente do grupo de *B. cereus*.

Em trabalho desenvolvido por Reyes-Ramirez e Ibarra (2005), foi possível distinguir sorotipos de *B. thuringiensis*, utilizando um par de iniciadores desenhados para serem complementares as regiões palindrômicas extragênicas repetitivas do genoma dos isolados analisados. A análise realizada pelos autores detectou 47 bandas polimórficas, possibilitando a identificação dos isolados.

Como a técnica de BOX-PCR pode induzir a classificação errônea dos isolados bacterianos, esta é uma análise que não deve ser utilizada isoladamente para distinguir espécies, principalmente as que são muito próximas filogeneticamente e podem gerar perfis semelhantes. Neste trabalho, as espécies pertencentes ao grupo de *B. cereus* continuaram sendo agrupadas muito próximas no dendrograma a partir de sequências BOX.

7.4 Caracterização taxonômica dos isolados bacterianos

Com base na similaridade observada entre as sequências das bactérias em estudo e as presentes no banco de dados, 157 isolados bacterianos foram filogeneticamente agrupados em 23 espécies no gênero *Bacillus* (138 isolados) (Tabela 6), sendo eles *B. amyloliquefaciens*, *B. australimaris*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. drentensis*, *B. flexus*, *B. kochii*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. nealsonii*, *B. oleronius*, *B. safensis*, *B. subterraneus*, *B. proteolyticus*, *B. subtilis*, *B. tequilensis*, *B. thuringiensis*, *B. velezensis*, *B. wiedmannii*, *B. aerius*, *B. tropicus*, *B. pacificus* e *B. methylotrophicus*. Além da similaridade observada para sequências do gênero *Bacillus*, alguns isolados foram filogeneticamente agrupados como pertencentes a outros gêneros/espécies Gram Positivos: *Lysinibacillus fusiformis* (1 isolado), *L. macroides* (4 isolados) e *L. cresolivorans* (1 isolado); *Paenibacillus barcinonensis* (1 isolado), *P. alvei* (1 isolado), *P. illinoisensis* (6 isolados) e *P. vulneris* (1 isolado); *Brevibacillus invocatus* (1 isolado); *Fictibacillus barbaricus* (1 isolado) e *Terribacillus saccharophilus* (2 isolados).

Tabela 6. Análise filogenética com base nas sequências 16S rRNA das estirpes bacterianas endofíticas isoladas de diferentes nichos de plantas de cana-de-açúcar e do trato digestivo da broca gigante coletadas em áreas produtoras de cana-de-açúcar do estado de Alagoas (Continua).

Isolado	BLAST-N (NCBI)				
	Código	Usina	Identidade (%)	Similaridade com banco de dados	Número de acesso
FORCN001	CA 01	Coruripe	99	<i>Bacillus licheniformis</i>	NR_118996.1
FORCN002	CA 02	Coruripe	99	<i>Bacillus licheniformis</i>	NR_118996.1
FORCN003	CA 05	Coruripe	99	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_112636.1
FORCN004	CA 07	Coruripe	99	<i>Bacillus aerius</i>	NR_118439.1
FORCN005	CA 08	Coruripe	99	<i>Bacillus thuringiensis</i>	NR_114581.1
FORCN006	CA 27	Coruripe	99	<i>Bacillus subtilis</i>	NR_113265.1
FORCN007	CA 35	Triunfo	99	<i>Bacillus wiedmannii</i>	NR_152692.1
FORCN008	CA 38	Triunfo	99	<i>Bacillus proteolyticus</i>	NR_157735.1
FORCN009	CA 42	Triunfo	99	<i>Bacillus subterraneus</i>	NR_104749.1
FORCN010	CA 44	Triunfo	99	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1
FORCN011	CA 48	Triunfo	99	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1
FORCN012	CA 49	Triunfo	99	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1
FORCN013	CA 50	Triunfo	99	<i>Bacillus australimaris</i>	NR_148787.1
FORCN014	CA 54	Triunfo	100	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1
FORCN015	CA 64	Triunfo	99	<i>Terribacillus saccharophilus</i>	NR_041356.1
FORCN016	CA 65	Triunfo	98	<i>Paenibacillus vulneris</i>	NR_117618.1
FORCN017	CA 68	Triunfo	99	<i>Bacillus aerius</i>	NR_118439.1
FORCN018	CA 70	Triunfo	99	<i>Bacillus aerius</i>	NR_118439.1
FORCN019	CA 73	Santo Antônio	99	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_117473.1
FORCN020	CA 74	Santo Antônio	99	<i>Bacillus aerius</i>	NR_118439.1
FORCN021	CA 75	Santo Antônio	99	<i>Bacillus aerius</i>	NR_118439.1
FORCN022	CA 77	Santo Antônio	99	<i>Brevibacillus invocatus</i>	NR_041836.1
FORCN023	CA 78	Santo Antônio	99	<i>Bacillus aerius</i>	NR_118439.1
FORCN024	CA 81	Santo Antônio	99	<i>Bacillus aerius</i>	NR_118439.1
FORCN025	CA 83	Santo Antônio	99	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_117473.1
FORCN026	CA 84	Santo Antônio	99	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945.1
FORCN027	CA 85	Santo Antônio	99	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945.1
FORCN028	CA 92	Santo Antônio	99	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_117473.1
FORCN029	CA 96	Santo Antônio	99	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945.1
FORCN030	CA 97	Santo Antônio	99	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_112636.1
FORCN031	CA 101	Santo Antônio	99	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945.1
FORCN032	CA 105	Santo Antônio	99	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	NR_113828.1
FORCN033	CA 108	Santo Antônio	99	<i>Bacillus licheniformis</i>	NR_118996.1
FORCN034	CA 109	Santo Antônio	99	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	NR_113828.1
FORCN035	CA 110	Santo Antônio	99	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_112636.1
FORCN036	CA 113	Santo Antônio	99	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_117473.1
FORCN037	CA 114	Santo Antônio	99	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	NR_113828.1
FORCN038	CA 117	Santo Antônio	99	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	NR_113828.1
FORCN039	CA 120	Santo Antônio	99	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	NR_113828.1
FORCN040	CA 132	Santo Antônio	99	<i>Bacillus tropicus</i>	NR_157736.1
FORCN041	CA 140	Santo Antônio	99	<i>Bacillus wiedmannii</i>	NR_152692.1
FORCN042	CA 153	Santo Antônio	99	<i>Terribacillus saccharophilus</i>	NR_041356.1
FORCN043	CA 159	Santo Antônio	99	<i>Bacillus drentensis</i>	NR_114085.1
FORCN044	CA 191	Santo Antônio	99	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_117473.1
FORCN045	CA 193	Santo Antônio	99	<i>Bacillus licheniformis</i>	NR_118996.1
FORCN046	CA 219	Santo Antônio	99	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945.1
FORCN047	CB 01	Santo Antônio	100	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1
FORCN048	CB 05	Santo Antônio	100	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1
FORCN049	CB 08	Santo Antônio	100	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1
FORCN050	CB 09	Triunfo	99	<i>Bacillus australimaris</i>	NR_148787.1
FORCN051	CB 12	Triunfo	99	<i>Bacillus australimaris</i>	NR_148787.1
FORCN052	CB 15	Triunfo	99	<i>Bacillus safensis</i>	NR_041794.1

Tabela 6. Continuação.

FORCN053	CB 16	Triunfo	99	<i>Bacillus safensis</i>	NR_041794.1
FORCN054	CB 17	Triunfo	99	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945.1
FORCN055	CB 18	Triunfo	100	<i>Bacillus safensis</i>	NR_041794.1
FORCN056	CB 19	Triunfo	99	<i>Bacillus australimaris</i>	NR_148787.1
FORCN057	CB 20	Triunfo	99	<i>Bacillus australimaris</i>	NR_148787.1
FORCN058	CB 24	Triunfo	99	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945.1
FORCN059	CB 32	Triunfo	99	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945.1
FORCN060	CB 35	Triunfo	99	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	NR_113828.1
FORCN061	CB 36	Triunfo	99	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945.1
FORCN062	CB 45	Triunfo	99	<i>Bacillus australimaris</i>	NR_148787.1
FORCN063	CB 51	Triunfo	99	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	NR_042272.1
FORCN064	CB 52	Triunfo	99	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945.1
FORCN065	CB 56	Triunfo	99	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945.1
FORCN066	CR 01	Coruripe	99	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1
FORCN067	CR 02	Coruripe	100	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1
FORCN068	CR 07	Coruripe	99	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1
FORCN069	CR 08	Coruripe	99	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1
FORCN070	CR 12	Coruripe	99	<i>Bacillus pacificus</i>	NR_157733.1
FORCN071	CR 21	Coruripe	99	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1
FORCN072	CR 22	Coruripe	99	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945.1
FORCN073	CR 24	Coruripe	100	<i>Bacillus tequilensis</i>	NR_104919.1
FORCN074	CR 25	Coruripe	99	<i>Bacillus subtilis</i>	NR_112629.1
FORCN075	CR 26	Coruripe	99	<i>Bacillus pacificus</i>	NR_157733.1
FORCN076	CR 27	Coruripe	99	<i>Bacillus pacificus</i>	NR_157733.1
FORCN077	CR 28	Coruripe	99	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NR_117946.1
FORCN078	CR 29	Coruripe	99	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NR_117946.1
FORCN079	CR 30	Coruripe	99	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NR_117946.1
FORCN080	CR 31	Coruripe	99	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NR_117946.1
FORCN081	CR 32	Coruripe	99	<i>Bacillus subtilis</i>	NR_113265.1
FORCN082	CR 33	Coruripe	99	<i>Bacillus tequilensis</i>	NR_104919.1
FORCN083	CR 34	Coruripe	99	<i>Bacillus tequilensis</i>	NR_104919.1
FORCN084*	CR35	Coruripe	-	-	-
FORCN085	CR 38	Coruripe	99	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_117473.1
FORCN086	CR 43	Coruripe	99	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_117473.1
FORCN087	CR 45	Coruripe	99	<i>Bacillus pacificus</i>	NR_157733.1
FORCN088	CR 46	Coruripe	99	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NR_041455.1
FORCN089	CR 49	Coruripe	99	<i>Bacillus pacificus</i>	NR_157733.1
FORCN090	CR 50	Coruripe	99	<i>Bacillus pacificus</i>	NR_157733.1
FORCN091	CR 51	Coruripe	99	<i>Bacillus pacificus</i>	NR_157733.1
FORCN092	CR 52	Coruripe	99	<i>Bacillus pacificus</i>	NR_157733.1
FORCN093	CR 53	Coruripe	98	<i>Bacillus pacificus</i>	NR_157733.1
FORCN094	CR 54	Coruripe	99	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_117473.1
FORCN095	CR 55	Coruripe	99	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_117473.1
FORCN096	CR 59	Coruripe	99	<i>Bacillus pacificus</i>	NR_157733.1
FORCN097*	CR68	Triunfo	-	-	-
FORCN098	CR 69	Triunfo	99	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_117473.1
FORCN099	CR 70	Triunfo	98	<i>Paenibacillus alvei</i>	NR_113577.1
FORCN100	CR 76	Triunfo	99	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NR_117946.1
FORCN101	CR 77	Triunfo	99	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NR_041455.1
FORCN102	CR 79	Triunfo	99	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NR_117946.1
FORCN103	CR 80	Triunfo	99	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1
FORCN104	CR 81	Triunfo	99	<i>Bacillus wiedmannii</i>	NR_152692.1
FORCN105	CR 82	Triunfo	99	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	NR_112569.1
FORCN106	CR 91	Triunfo	99	<i>Bacillus subterraneus</i>	NR_104749.1
FORCN107	CR 95	Triunfo	99	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_112636.1
FORCN108	CR 98	Triunfo	99	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_117473.1
FORCN109	CR 107	Triunfo	99	<i>Bacillus subterraneus</i>	NR_104749.1
FORCN110	CR 126	Santo Antônio	99	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NR_041455.1

Tabela 6. Continuação.

FORCN111	CR 129	Santo Antônio	99	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NR_041455.1
FORCN112	CR 132	Santo Antônio	99	<i>Fictibacillus barbaricus</i>	NR_028967.1
FORCN113	CR 136	Santo Antônio	99	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NR_041455.1
FORCN114	CR 157	Santo Antônio	100	<i>Bacillus flexus</i>	NR_113800.1
FORCN115	CR 158	Santo Antônio	99	<i>Bacillus flexus</i>	NR_113800.1
FORCN116	CC 01	Coruripe	99	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	NR_116240.1
FORCN117	CC 03	Coruripe	99	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	NR_116240.1
FORCN118	CC 06	Coruripe	99	<i>Bacillus oleronius</i>	NR_043325.1
FORCN119	CC 07	Coruripe	100	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_112636.1
FORCN120	CC 10	Coruripe	99	<i>Bacillus oleronius</i>	NR_043325.1
FORCN121	CC 17	Coruripe	99	<i>Bacillus oleronius</i>	NR_043325.1
FORCN122	CC 19	Coruripe	99	<i>Bacillus oleronius</i>	NR_043325.1
FORCN123	CC 24	Coruripe	99	<i>Bacillus circulans</i>	NR_112632.1
FORCN124	CC 28	Coruripe	99	<i>Bacillus velezensis</i>	NR_075005.2
FORCN125	CC 35	Coruripe	99	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945.1
FORCN126	CC 36	Coruripe	99	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945.1
FORCN127	CC 64	Coruripe	99	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_116873.1
FORCN128	CC 67	Coruripe	94	<i>Lysinibacillus cresolivorans</i>	NR_145635.1
FORCN129	CC 96	Coruripe	99	<i>Bacillus oleronius</i>	NR_043325.1
FORCN130	CC 100	Coruripe	99	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_112636.1
FORCN131	CC 108	Coruripe	100	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1
FORCN132	CC 110	Coruripe	99	<i>Bacillus oleronius</i>	NR_043325.1
FORCN133	CC 127	Coruripe	99	<i>Bacillus circulans</i>	NR_112632.1
FORCN134	CC 141	Coruripe	99	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1
FORCN135	CC 144	Coruripe	99	<i>Bacillus tropicus</i>	NR_157736.1
FORCN136	CC 146	Coruripe	99	<i>Bacillus oleronius</i>	NR_043325.1
FORCN137	CC 150	Coruripe	99	<i>Bacillus oleronius</i>	NR_043325.1
FORCN138	CC 153	Coruripe	99	<i>Bacillus tropicus</i>	NR_157736.1
FORCN139	CC 157	Coruripe	99	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1
FORCN140	CC 173	Triunfo	98	<i>Bacillus circulans</i>	NR_112632.1
FORCN141	CC 179	Triunfo	100	<i>Bacillus circulans</i>	NR_112632.1
FORCN142	CC 180	Triunfo	99	<i>Bacillus circulans</i>	NR_112632.1
FORCN143	CC 189	Triunfo	99	<i>Bacillus circulans</i>	NR_112632.1
FORCN144	CC 192	Triunfo	98	<i>Bacillus circulans</i>	NR_112632.1
FORCN145	CC 193	Triunfo	99	<i>Lysinibacillus macroides</i>	NR_114920.1
FORCN146	CC 201	Triunfo	99	<i>Bacillus circulans</i>	NR_112632.1
FORCN147	CC 202	Triunfo	99	<i>Bacillus nealsonii</i>	NR_044546.1
FORCN148	CC 208	Triunfo	99	<i>Bacillus oleronius</i>	NR_043325.1
FORCN149	CC 210	Triunfo	99	<i>Bacillus oleronius</i>	NR_043325.1
FORCN150	CC 212	Triunfo	99	<i>Bacillus licheniformis</i>	NR_118996.1
FORCN151	CC 214	Triunfo	99	<i>Bacillus kochii</i>	NR_117050.1
FORCN152	CC 215	Triunfo	99	<i>Lysinibacillus macroides</i>	NR_114920.1
FORCN153	CC 220	Triunfo	99	<i>Bacillus oleronius</i>	NR_043325.1
FORCN154	CC 222	Triunfo	99	<i>Bacillus oleronius</i>	NR_043325.1
FORCN155*	CC224	Triunfo	-	-	-
FORCN156	CC 233	Triunfo	99	<i>Lysinibacillus macroides</i>	NR_114920.1
FORCN157	CC 238	Triunfo	99	<i>Lysinibacillus macroides</i>	NR_114920.1
FORCN158	CC 243	Triunfo	99	<i>Bacillus oleronius</i>	NR_043325.1
FORCN159	CC 250	Triunfo	99	<i>Bacillus oleronius</i>	NR_043325.1
FORCN160	CC 337	Santo Antônio	99	<i>Bacillus velezensis</i>	NR_075005.2
FORCN161*	CC355	Santo Antônio	-	-	-

CA - isolado do líquido do apoplasto de cana-de-açúcar; CB - isolado do trato digestivo de lagartas da broca gigante; CR - isolados de raízes de cana-de-açúcar; CC - isolados da região central dos entrenós do colmo de cana-de-açúcar.

*Isolados não sequenciados, pois não amplificaram.

As espécies mais representativas foram filogeneticamente identificadas como pertencentes a espécie *B. megaterium*, representado por 11,5% de um total de 157 isolados, seguido de *B. safensis* representado por 10,8%, *B. cereus* representado por 10%, *B. oleronius* representado por 8,9%, *B. amyloliquefaciens* representado por 7% e *B. pacificus* representado por 6% dos isolados analisados.

A análise da árvore filogenética mostrou que os isolados bacterianos foram divididos em 18 grupos (Figura 20), sendo o grupo 13 o de maior interesse para este trabalho visto que possui 34 isolados relacionados filogeneticamente com as espécies *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. wiedmanni*, *B. proteolyticus*, *B. tropicus* e *B. pacificus*.

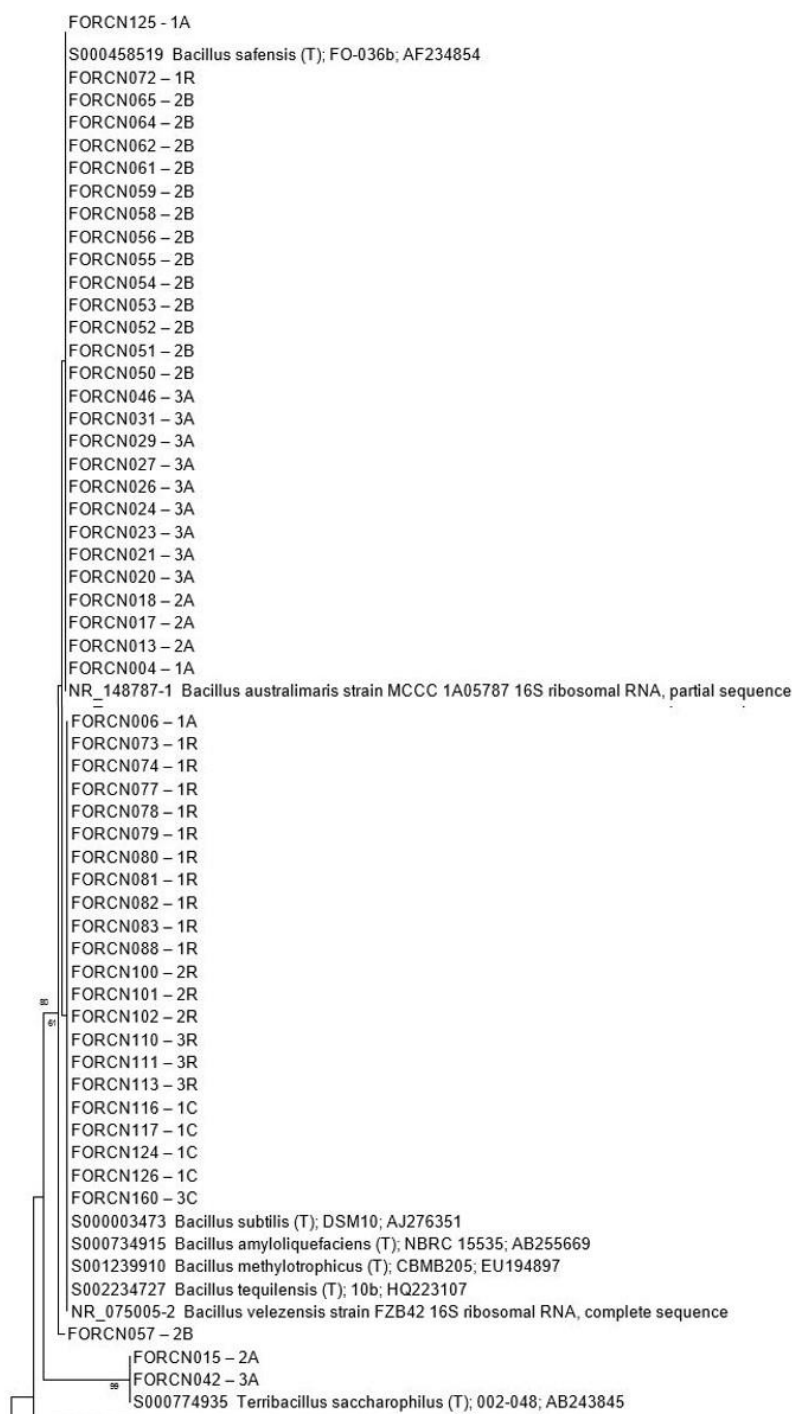


Figura 20. Relações filogenéticas de bactérias isoladas de diferentes nichos de cana-de-açúcar estimada com base na sequência do 16S rRNA. A árvore foi obtida utilizando o método estatístico *Neighbor-Joining* (NJ) e o modelo Kimura 2-parâmetros como indicado pela função de teste de modelo do programa MEGA 7.0. Valores de Bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 réplicas. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. Legenda ao lado da identificação dos isolados: 1-Usina Coruripe; 2-Usina Triunfo; 3-Usina Santo Antônio; A-Isolado do apoplasto; B-Isolado da broca gigante; C-Isolado da região central dos entrenós e R-Isolado de raízes de cana-de-açúcar. *Escherichia/Shigella flexneri* foi usado como grupo externo (Continua).

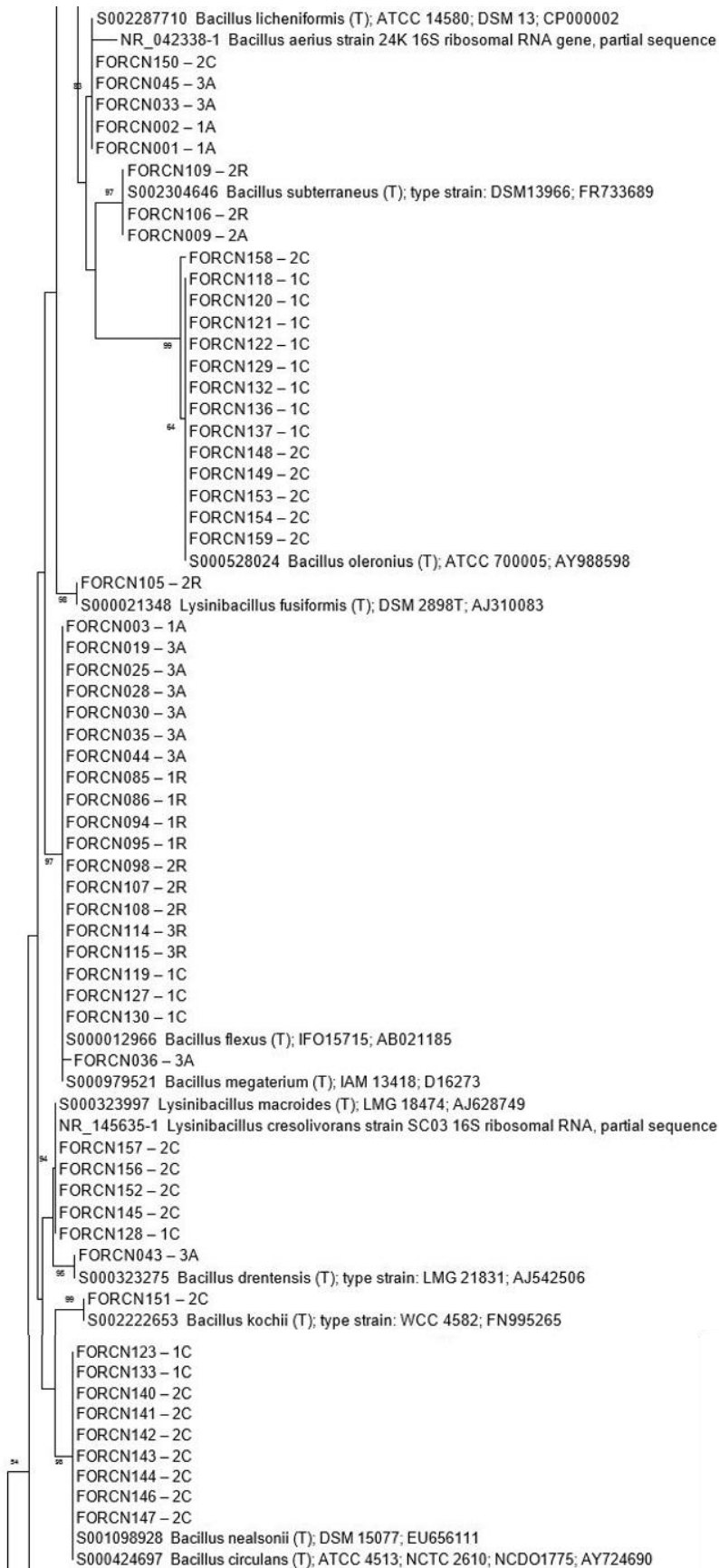


Figura 20. Continuação.

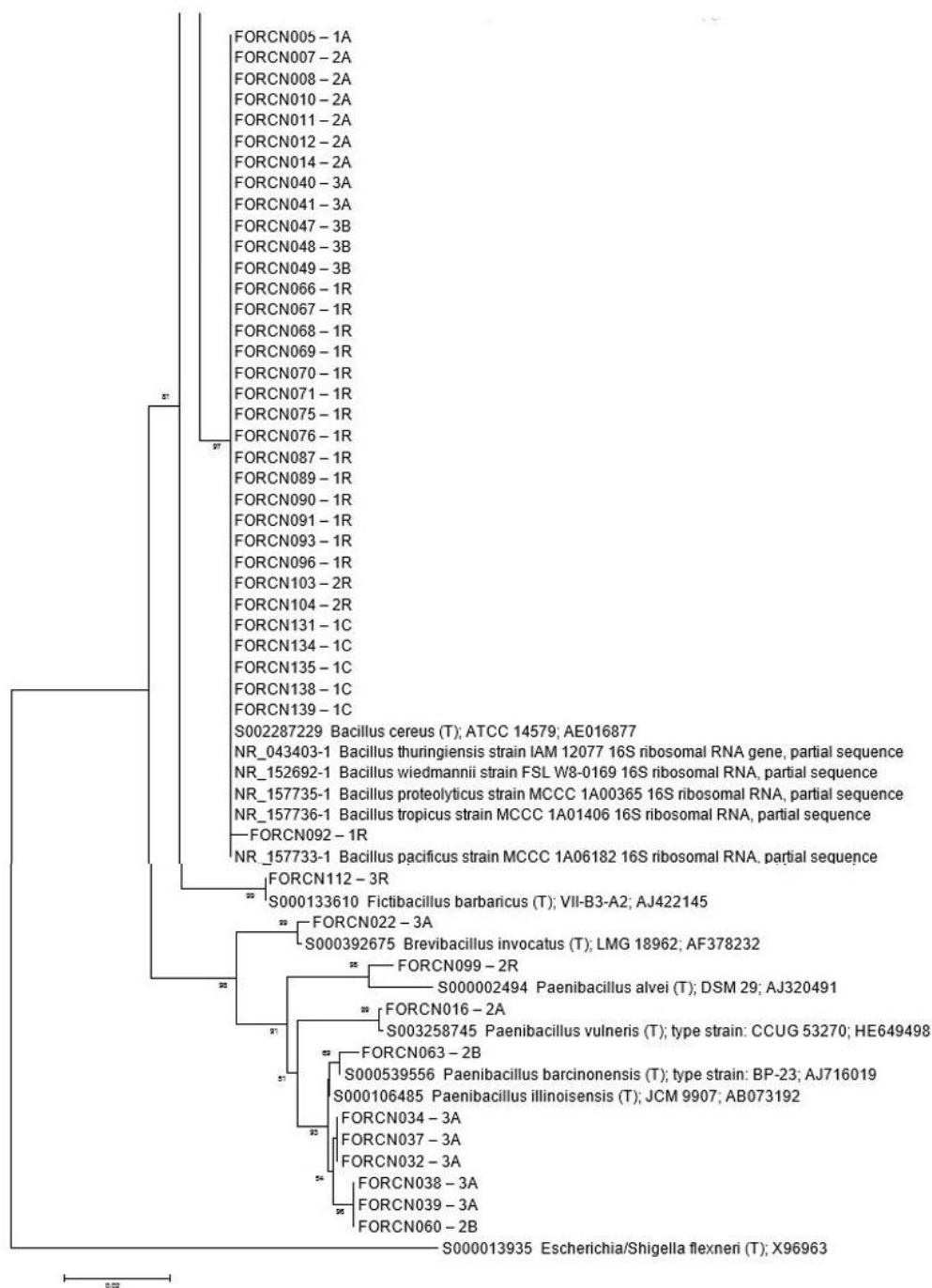


Figura 20. Continuação.

Cerca de 17% dos isolados bacterianos do líquido do apoplasto apresentaram 99% de similaridade com sequências de *B. megaterium*, 31% dos isolados da região central dos entrenós apresentaram 99% de similaridade com sequências de *B. oleronius*, 47% dos isolados obtidos do trato digestivo apresentaram 99% ou 100% de similaridade com sequências de *B. safensis* e 22% dos isolados das raízes apresentaram maior similaridade (99%) com sequências de *B. amyloliquefaciens*.

Através da caracterização filogenética dos isolados bacterianos, foi possível observar que o líquido do apoplasto de plantas de cana-de-açúcar foi o nicho que apresentou maior diversidade em nível de espécie, com 17 espécies filogeneticamente agrupadas no gênero *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* e *Terribacillus* (*B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B.*

aerius, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. wiedmannii*, *B. proteolyticus*, *B. subterraneus*, *B. cereus*, *B. australimaris*, *P. vulneris*, *Brevibacillus invocatus*, *B. safensis*, *P. illinoisensis*, *B. tropicus*, *Terribacillus saccharophilus* e *B. drementensis*).

As raízes e a região central dos entrenós de cana-de-açúcar foram os nichos que apresentaram a segunda maior diversidade de estirpes filogeneticamente relacionadas a 13 espécies. Os isolados das raízes foram pertencentes as espécies *B. cereus*, *B. pacificus*, *B. safensis*, *B. tequilensis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *P. alvei*, *B. wiedmannii*, *L. fusiformis*, *B. subterraneus*, *Fictibacillus barbaricus* e *B. flexus* enquanto que estirpes filogeneticamente relacionadas as espécies *B. methylotrophicus*, *B. oleronius*, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. velezensis*, *B. safensis*, *L. cresolivorans*, *B. cereus*, *B. tropicus*, *L. macroides*, *B. nealsonii*, *B. licheniformis* e *B. kochii* foram isoladas da região central dos entrenós.

Foram encontradas somente cinco espécies bacterianas colonizando o trato digestivo da broca gigante. Esses isolados foram identificados como filogeneticamente relacionados as espécies *B. cereus*, *B. australimaris*, *B. safensis*, *P. illinoisensis* e *P. barcinonensis*. Alguns isolados bacterianos, classificados filogeneticamente como uma mesma espécie, ficaram agrupados separadamente no dendrograma construído a partir das regiões BOX (Figura 19).

A diversidade de bactérias que compõe a microbiota intestinal do inseto hospedeiro pode ser modificada em decorrência do tipo de alimentação do inseto. Diversos estudos foram realizados de forma a caracterizar a microbiota intestinal e mostrar a influência do alimento na diversidade bacteriana. Por exemplo, o trabalho de Broderick et al. (2004) foi uns dos primeiros a descrever e caracterizar a microbiota intestinal do lepidóptero *Lymantria dispar*, mostrando que o tipo de dieta é responsável por modular a comunidade bacteriana em simbiose com os insetos. Através de análise de sequências de 16S rRNA, foi possível detectar uma grande quantidade de Proteobactérias em simbiose com *L. dispar*. Dois gêneros, *Enterococcus* e *Enterobacter* estavam em simbiose com lagartas de *L. dispar* independente do tipo da alimentação disponível (BRODERICK et al., 2004), sugerindo que a microbiota intestinal dos insetos é composta por microrganismos nativos e microrganismos que chegam ao intestino através de sua alimentação. Além disso, a anatomia simples do intestino de lepidópteros e a rápida passagem de alimento ingerido no trato digestivo pode dificultar a associação de bactérias (HAMMER et al., 2017). Outro fator que tem relação com a associação de bactérias e insetos lepidópteros é o fato desses insetos sofrerem metamorfose holometabólica, o que altera todas as estruturas corporais do inseto (HAMMER, MCMILLAN & FIERER 2014).

Além da caracterização taxonômica conjunta de todos os nichos associado a planta, também foi realizada a caracterização das bactérias isoladas do trato digestivo da broca gigante, inclusive das bactérias com características de Gram negativas após a segunda pasteurização. Após a análise, foi observado que todas as bactérias apresentaram similaridade filogenética com bactérias pertencentes as espécies *B. cereus*, *B. australimaris*, *B. safensis*, *B. nealsoni*, *B. aryabhatai*, *B. aerius*, *P. illinoisensis*, *P. barcinonensis*, *P. silvae*, *P. panacisoli*, *L. macroides* e *L. fusiformis* (Tabela 7).

Outros trabalhos foram realizados para aumentar o conhecimento sobre a relação da microbiota intestinal com o inseto hospedeiro, como o trabalho desenvolvido por Orfanó (2012) que isolou bactérias dos filos *Firmicutes* (15%), *Bacteroidetes* (28%) e *Proteobacteria* (57%) do intestino de *Aedes aegypti*. Costa (2016) também caracterizou a comunidade bacteriana presente no trato intestinal de *S. frugiperda* e constatou que os filos predominantes foram *Proteobacteria* (73,3%) e *Firmicutes* (24,2%) e em nível de gênero, os mais abundantes foram *Enterococcus* (23,5%), *Acinetobacter* (20,5%), *Stenotrophomonas* (11,4%) e *Klebsiella* (10,4%), seguido de outros gêneros menos abundantes como *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter* e *Chryseobacterium*. O autor comprovou

que a fonte de dieta também modulou a comunidade bacteriana das fezes de *S. frugiperda*. Assim como esses autores, Orozco-Flores et al. (2017) identificaram os filos *Proteobacteria* (74,4%), *Firmicutes* (9%) e *Actinobacteria* (14%) no intestino do lepidóptero *Plodia interpunctella*, compreendendo as espécies dos gêneros *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Parapusillimonas*, *Achromobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Propionibacterium* e *Corynebacterium*. Como podemos observar, o filo mais abundante na microbiota intestinal desses insetos foi *Proteobacteria*. Outros filos são encontrados em menor proporção.

Tabela 7. Análise filogenética com base nas sequências 16S rRNA de estirpes bacterianas isoladas do trato digestivo da broca gigante coletadas em áreas produtoras de cana-de-açúcar do estado de Alagoas.

Isolado	Código	Usina	BLAST-N (NCBI)		
			Similaridade com banco de dados	Identidade (%)	Número de acesso
FORCN047	CB 01	Usina Santo Antônio	<i>Bacillus cereus</i>	100	NR_074540.1
FORCN048	CB 05	Usina Santo Antônio	<i>Bacillus cereus</i>	100	NR_074540.1
FORCN049	CB 08	Usina Santo Antônio	<i>Bacillus cereus</i>	100	NR_074540.1
FORCN050	CB 09	Usina Triunfo Amostra 1	<i>Bacillus australimaris</i>	99	NR_148787.1
FORCN051	CB 12	Usina Triunfo Amostra 1	<i>Bacillus australimaris</i>	99	NR_148787.1
FORCN052	CB 15	Usina Triunfo Amostra 1	<i>Bacillus safensis</i>	99	NR_041794.1
FORCN053	CB 16	Usina Triunfo Amostra 1	<i>Bacillus safensis</i>	99	NR_041794.1
FORCN054	CB 17	Usina Triunfo Amostra 1	<i>Bacillus safensis</i>	99	NR_113945.1
FORCN055	CB 18	Usina Triunfo Amostra 1	<i>Bacillus safensis</i>	100	NR_041794.1
FORCN056	CB 19	Usina Triunfo Amostra 1	<i>Bacillus australimaris</i>	99	NR_148787.1
FORCN057	CB 20	Usina Triunfo Amostra 1	<i>Bacillus australimaris</i>	99	NR_148787.1
FORCN058	CB 24	Usina Triunfo Amostra 1	<i>Bacillus safensis</i>	99	NR_113945.1
FORCN059	CB 32	Usina Triunfo Amostra 2	<i>Bacillus safensis</i>	99	NR_113945.1
FORCN060	CB 35	Usina Triunfo Amostra 2	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	99	NR_113828.1
FORCN061	CB 36	Usina Triunfo Amostra 2	<i>Bacillus safensis</i>	99	NR_113945.1
FORCN062	CB 45	Usina Triunfo Amostra 3	<i>Bacillus australimaris</i>	99	NR_148787.1
FORCN063	CB 51	Usina Triunfo Amostra 4	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	99	NR_042272.1
FORCN064	CB 52	Usina Triunfo Amostra 4	<i>Bacillus safensis</i>	99	NR_113945.1
FORCN065	CB 56	Usina Triunfo Amostra 4	<i>Bacillus safensis</i>	99	NR_113945.1
FORCN223*	CB02	Usina Santo Antônio	<i>Bacillus safensis</i>	100	NR_113945.1
FORCN224*	CB03	Usina Santo Antônio	<i>Bacillus cereus</i>	100	NR_074540.1
FORCN225*	CB04	Usina Santo Antônio	<i>Paenibacillus silvae</i>	99	NR_156836.1
FORCN226*	CB07	Usina Santo Antônio	<i>Bacillus australimaris</i>	99	NR_148787.1
FORCN227*	CB10	Usina Triunfo Amostra 1	<i>Lysinibacillus macroides</i>	99	NR_114920.1
FORCN228*	CB11	Usina Triunfo Amostra 1	<i>Bacillus australimaris</i>	99	NR_148787.1
FORCN229*	CB13	Usina Triunfo Amostra 1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99	NR_112569.1
FORCN230*	CB14	Usina Triunfo Amostra 1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99	NR_112628.1
FORCN231*	CB22	Usina Triunfo Amostra 2	<i>Bacillus australimaris</i>	99	NR_148787.1
FORCN232*	CB 23	Usina Triunfo Amostra 3	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99	NR_112569.1
FORCN233*	CB25	Usina Triunfo Amostra 4	<i>Bacillus australimaris</i>	99	NR_148787.1
FORCN234*	CB30	Usina Triunfo Amostra 2	<i>Bacillus australimaris</i>	93	NR_148787.1
FORCN235*	CB31	Usina Triunfo Amostra 3	<i>Paenibacillus panacisoli</i>	99	NR_041381.1
FORCN236*	CB33	Usina Triunfo Amostra 4	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	99	NR_042272.1
FORCN237*	CB34	Usina Triunfo Amostra 5	<i>Bacillus nealsoni</i>	99	NR_044546.1
FORCN238*	CB37	Usina Triunfo Amostra 6	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	99	NR_042272.1
FORCN239*	CB39	Usina Triunfo Amostra 3	<i>Bacillus safensis</i>	100	NR_113945.1
FORCN240*	CB40	Usina Triunfo Amostra 4	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99	NR_112569.1
FORCN241*	CB41	Usina Triunfo Amostra 5	<i>Bacillus safensis</i>	100	NR_113945.1
FORCN242*	CB42	Usina Triunfo Amostra 6	<i>Bacillus safensis</i>	99	NR_113945.1
FORCN243*	CB43	Usina Triunfo Amostra 7	<i>Bacillus aryabhatai</i>	99	NR_115953.1
FORCN244*	CB44	Usina Triunfo Amostra 8	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99	NR_112569.1
FORCN245*	CB46	Usina Triunfo Amostra 4	<i>Bacillus australimaris</i>	99	NR_148787.1
FORCN246*	CB47	Usina Triunfo Amostra 5	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99	NR_112569.1
FORCN247*	CB49	Usina Triunfo Amostra 6	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	99	NR_042272.1
FORCN248*	CB50	Usina Triunfo Amostra 7	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	99	NR_042272.1
FORCN249*	CB53	Usina Triunfo Amostra 8	<i>Bacillus safensis</i>	99	NR_113945.1
FORCN250*	CB54	Usina Triunfo Amostra 9	<i>Bacillus aerius</i>	99	NR_118439.1
FORCN251*	CB55	Usina Triunfo Amostra 10	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	99	NR_042272.1

*Bactérias com coloração avermelhada de acordo com teste de Gram.

Todas essas espécies bacterianas são Gram-positivas, confirmando que o teste de coloração de Gram é muito variável, sendo influenciado por fatores externos, como o tempo de vida da cultura bacteriana utilizada no teste (KEITA et al., 2013; ROCHA et al., 2017).

A árvore filogenética com os isolados bacterianos obtidos do trato digestivo da broca gigante foi construída alinhando-se com as sequências de estirpes tipo do banco de dados Genbank (Figura 21). Os isolados bacterianos formaram oito grupos, sendo o grupo 1 formado por bactérias relacionadas filogeneticamente com as espécies *B. safensis* e *B. australimaris*, o grupo 2 relacionado filogeneticamente com a espécie *B. nealsonii*. O grupo 3 relacionado filogeneticamente com a espécie *B. aryabhatai*, o grupo 4 filogeneticamente associado com a espécie *B. cereus*, o grupo 5 relacionados filogeneticamente com as espécies *L. macroides* e *L. fusiformis*. O grupo 6 e 7 estão relacionados filogeneticamente com as espécies *P. panacisoli* e *P. illinoisensis*, respectivamente. E o grupo 8 relacionado filogeneticamente com as espécies *P. silvae* e *P. barcinonensis*.

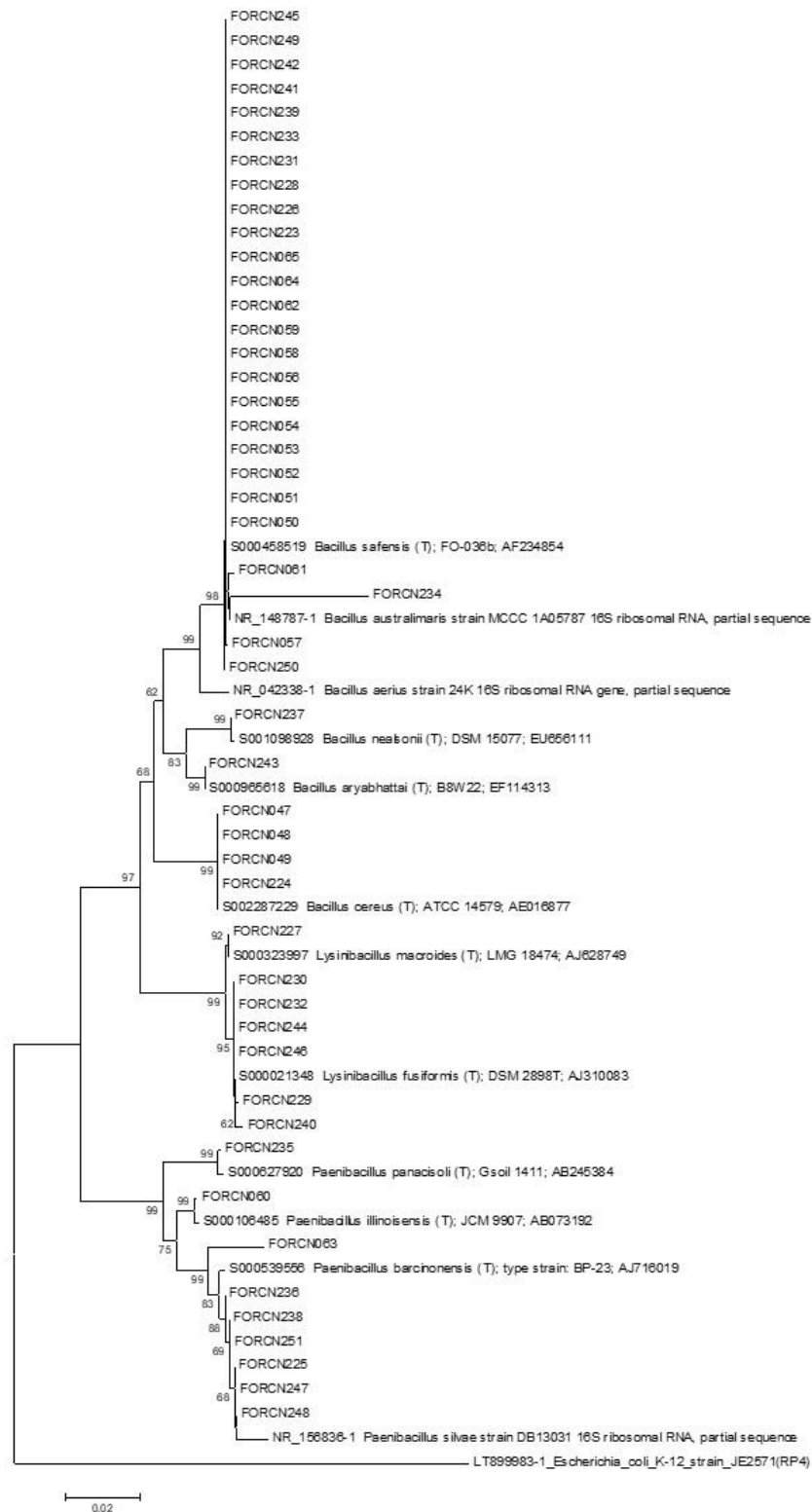


Figura 21. Relações filogenéticas de bactérias isoladas do trato digestivo da broca gigante estimada com base na sequência do 16S rRNA. A árvore foi obtida utilizando o método estatístico *Neighbor-Joining* (NJ) e o modelo Kimura 2-parâmetros como indicado pela função de teste de modelo do programa MEGA 7.0. Valores de Bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 réplicas. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. *Escherichia coli* foi usado como grupo externo.

Pouco se sabe a respeito do papel que estes microrganismos desempenham no interior de insetos, mas são microrganismos que apresentam grande capacidade de sobrevivência a ambientes extremos, já que o pH no intestino dessas lagartas é bastante alcalino (BRAVO et al., 2013).

No entanto, as espécies isoladas do trato digestivo da broca gigante são conhecidas por apresentarem diversas características de importância, como por exemplo, a espécie *B. safensis* conhecida por habitar ambientes extremos, promover crescimento em plantas, produzir enzimas de importância industrial e metabólitos secundários (LATEEF et al., 2015). A espécie *P. illinoisensis* é conhecida por apresentar atividade antifúngica devido a capacidade de degradar celulose (SUBBANNA et al., 2016), além de produzir sideróforos (LIU et al., 2017). Outras características foram observadas para a espécie *P. panacisoli*, que pode aumentar o crescimento de *Lactobacillus* usados na ensilagem de milho devido a produção de xilooligossacarídeos (XU et al., 2018). A espécie *B. australimaris* possui diversas características químicas, como atividade para b-galactosidase, utilização de citrato, gelatinase e fermentação de glicose, manitol, inositol, sacarose e arabinose (LIU et al., 2016). A produção de proteases por um isolado da espécie *B. nealsonii* foi constatada por DAVID et al. (2018) e a espécie *B. cereus* é conhecida por ser agente patogênico humano devido a produção de enterotoxinas (THORSEN et al., 2015).

Um trabalho recente de ESKI et al. (2018) mostrou o isolamento das espécies *B. cereus*, *Lysinibacillus macroides*, *Pseudomonas geniculata*, *Paenibacillus tylopili*, *Staphylococcus succinus*, *Acinetobacter soli*, *Chryseobacterium indologenes*, *B. toyonensis*, *Serratia marcescens*, *Paenibacillus amylolyticus*, *Paenibacillus xylanexedens*, *Enterobacter ludwigii*, *B. thuringiensis* (Se13), *B. thuringiensis* (Se14) e *Lysinibacillus fusiformis* a partir do trato digestivo de larvas de *Spodoptera exigua*, que ocasiona perdas de produção em algodão, trigo, repolho e beterraba (SAEED, SAYYED & AHMAD, 2010). O objetivo principal do trabalho foi isolar bactérias com potencial entomopatogênico para esta praga, e, três isolados promoveram taxa de mortalidade significativa (100% de mortalidade das larvas utilizando a bactéria *B. thuringiensis* Se13, 83,33% utilizando *B. thuringiensis* Se14 e 73,33% de mortalidade utilizando a bactéria *S. marcescens*, sendo esta última patogênica ao homem). Os demais isolados não promoveram taxa de mortalidade significativa das larvas.

A presença de bactérias no interior das lagartas pode se dar devido à ingestão de alimentos os quais seriam os principais habitats dessas bactérias. Bactérias simbióticas encontradas na microbiota intestinal podem ser transmitidas horizontalmente, através da planta hospedeira e verticalmente no estágio de ovo (PANIAGUA-VOIROL et al., 2018).

É sabido que microrganismos simbióticos presentes no intestino de insetos promovem diversos benefícios para o inseto hospedeiro como a melhora na absorção de nutrientes, proteção contra patógenos, proteção contra pesticidas ou metabólitos secundários produzidos pelas plantas (KIKUCHI et al., 2012; ENGEL & MORAN 2013; SALEM et al., 2015; van den BOSCH & WELTE, 2017; XIA et al., 2017). Desta forma, o conhecimento da microbiota intestinal, assim como as funções que esses microrganismos desempenham pode levar a estratégias mais efetivas para controle biológico de insetos-praga, já que a microbiota intestinal influencia a biologia do inseto (PANIAGUA VOIROL et al., 2018).

Diante dos resultados obtidos nesse trabalho, sabemos um pouco mais acerca da microbiota intestinal da broca gigante. Esses resultados abrem portas para entender o papel e as funções que esses microrganismos desempenham em simbiose com esta praga, abrindo caminhos para o desenvolvimento de um método de controle eficiente dessa praga. Além disso, o conhecimento da microbiota intestinal de lagartas da broca gigante pode auxiliar de alguma forma na elaboração de dietas artificiais específicas para este inseto, de modo a utilizar os microrganismos que fazem parte dessa microbiota na composição da dieta e assim, garantir um melhor desenvolvimento desses insetos em laboratório.

7.5 Caracterização genotípica

7.5.1 Amplificação de genes *cry*

A amplificação de genes *cry* utilizando iniciadores específicos só foi confirmada para o gene *cry2* nos isolados FORCN007 (*B. wiedmannii*), FORCN012 (*B. cereus*), FORCN014 (*B. cereus*), FORCN087 (*B. pacificus*), FORCN092 (*B. pacificus*) e FORCN096 (*B. pacificus*) (Figura 22).

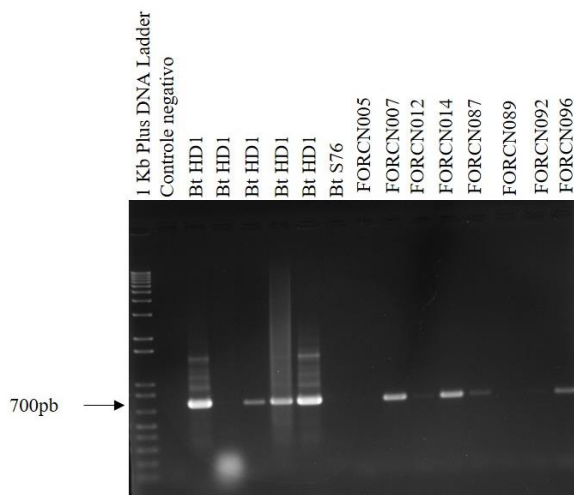


Figura 22. Gel de agarose 1% mostrando o produto de amplificação de PCR (700pb) obtidos com os iniciadores específicos para o gene *cry2* de *Bacillus thuringiensis*.

Não houve produto de amplificação do gene *cry2* por PCR para os demais isolados bacterianos. Um resultado negativo de produtos de amplificação de PCR também foi observado para os genes *cry1* e *cry9* utilizando iniciadores específicos para esses genes. Gitahy et al. (2007) também obtiveram resultados negativos de amplificação para os genes *cry9* nas estirpes S76 e HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. A estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 foi usada como controle positivo nas reações em cadeia da *polymerase*, no entanto foi positiva somente para a amplificação do gene *cry2*.

Em estudo desenvolvido por Wang et al. (2003), o gene *cry* mais abundante em isolados de *B. thuringiensis* de diferentes regiões da China foi o *cry1*, presente em 76,5% das bactérias avaliadas. Gitahy et al. (2007) detectaram os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa1* e *cry2Ab2* na estirpe S76 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e na estirpe HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, a qual é usada comercialmente para controle de lepidópteros. Os autores verificaram que a estirpe S76 proveniente da coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos promoveu 100% de mortalidade das larvas de *Diatraea saccharalis* alimentadas com dieta artificial contendo 500 µg/L do complexo de esporos e cristais produzidos pela estirpe. Já a estirpe comercial HD-1 promoveu 69% de mortalidade.

O uso dos genes *cry* para diferenciação das espécies de *B. thuringiensis* é uma metodologia muito complexa, visto que os plasmídeos, os quais carregam os genes *cry*, podem ser transferidos para as outras espécies por conjugação e mobilização (MAKART et al., 2017) e assim levar a uma caracterização taxonômica incorreta. Além da transferência de plasmídeos entre as espécies, os genes *cry* podem ser perdidos, o que impossibilita distinguir as espécies *B. thuringiensis* de *B. cereus* através desse método (LIU et al., 2015). Devido ao alto grau de similaridade entre essas espécies, a classificação taxonômica não pode ser baseada somente na caracterização fenotípica ou na detecção dos genes *cry* com ação inseticida (BAEK et al., 2019).

7.5.2 Amplificação pela técnica de PCR do biomarcador XRE

O resultado de amplificação por PCR do regulador transcricional XRE revelou que dos 34 isolados bacterianos do grupo filogeneticamente identificado como pertencentes a espécie *B. cereus*, 11 estirpes (FOCRN005, FORCN007, FORCN008, FORCN011, FORCN012, FORCN014, FORCN067, FORCN076, FORCN092, FORCN093 e FORCN135) mostraram resultados positivos, como pode ser observado pelo fragmento de 246pb amplificado com os iniciadores específicos para o marcador XRE exibido na figura 23.

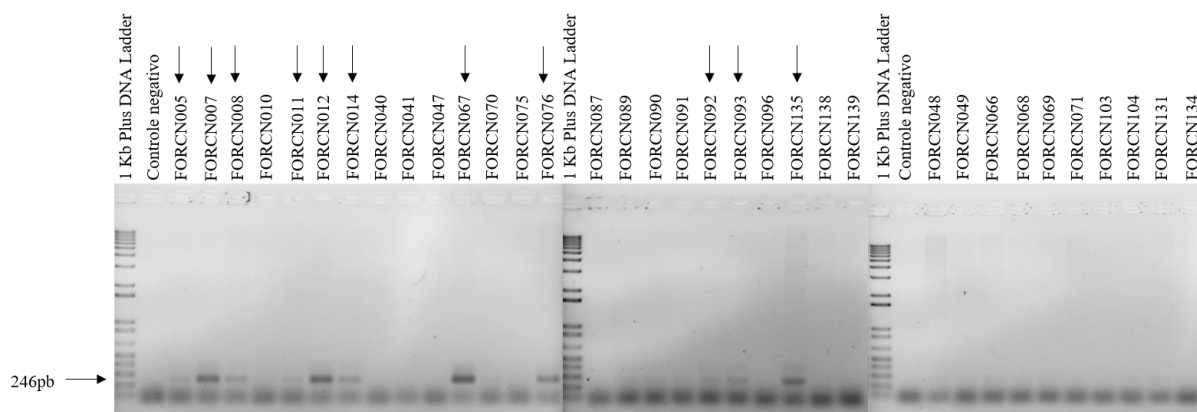


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose (1,5%), mostrando o produto de amplificação por PCR de 246pb com os iniciadores específicos para o regulador transcricional XRE. As setas indicam as estirpes com resultado positivo.

Em um trabalho desenvolvido por Wei et al. (2019), foi possível distinguir as espécies *B. thuringiensis* e *B. cereus* utilizando o regulador transcricional XRE. Os autores conseguiram diferenciar as duas espécies, garantindo 97,5% de acurácia na metodologia utilizada. Comparando essa metodologia com a de caracterização das espécies utilizando o gene *cry2*, verificaram que alguns isolados da espécie *B. cereus* apresentaram o gene *cry2*, mostrando que o método não é suficiente para discernir as espécies. Desta forma, podemos concluir que os isolados FORCN087 e FORCN096, mesmo mostrando resultado positivo para o gene *cry2* (Figura 22), não pertencem a espécie *B. thuringiensis*, já que não possuem o regulador transcricional XRE (Figura 23).

A amplificação do gene *cry* pode ter ocorrido devido a transferência de genes de uma bactéria para outra. A mobilização desses genes não ocorre sozinha (PALMA et al., 2014), mas através de plasmídeos conjugativos, os quais são capazes promover a mobilização para outras bactérias (JENSEN et al., 1996; MAKART et al., 2017). Makart et al. (2017) demonstraram que o plasmídeo conjugativo pX016 de *B. thuringiensis* serovar *israelensis* foi transferido de maneira eficiente para a bactéria *B. cereus*.

Diante desses resultados, os isolados FORCN005, FORCN007, FORCN008, FORCN011, FORCN012, FORCN014, FORCN067, FORCN076, FORCN092, FORCN093 e FORCN135 foram classificados como pertencentes a espécie *B. thuringiensis*.

A caracterização taxonômica baseada na amplificação da região 16S rRNA indicou que somente o isolado FORCN005 foi classificado como pertencente a espécie *B. thuringiensis* (Tabela 6). Portanto, essa metodologia é insuficiente para distinguir as espécies do grupo *B. cereus* e, por conseguinte, o uso do regulador transcricional XRE como marcador biológico é uma técnica complementar para identificação da espécie *B. thuringiensis*.

Baek et al. (2019), realizaram estudos genômicos e filogenômicos comparando em torno de 900 sequências genômicas completas de cepas atribuídas a *B. thuringiensis* e *B. cereus* para compreender a relação entre as duas espécies. Os autores verificaram, através de

estudos filogenéticos, que as anotações taxonômicas publicadas nos bancos de dados estão incorretas, já que a árvore construída a partir de dados taxonômicos mostra que as espécies *B. cereus* e *B. thuringiensis* estão intimamente relacionadas. Na análise filogenômica, os isolados ficaram divididos em três subclados (*B. thuringiensis* genomovar (gv). *thuringiensis*, *B. thuringiensis* gv. *cytolyticus* e *B. cereus*). Os autores também verificaram que o uso de genes *cry* e a caracterização fenotípica são insuficientes para distinguir essas espécies, sendo o estudo do genoma completo a alternativa mais robusta para diferenciação do grupo de *B. cereus* (BAEK et al., 2019).

Ao comparar o resultado de amplificação do regulador transcricional XRE com o dendrograma gerado a partir dos perfis polimórficos dos isolados, observou-se que as estirpes FORCN005, FORCN007, FORCN008, FORCN012, FORCN014, FORCN067, FORCN076, FORCN092, FORCN093 e FORCN135 apresentam perfis de bandas bastante similares (Figura 19), e compõem o mesmo grupo de microrganismos ou fazem parte de um grupo próximo. A exceção foi o isolado FORCN011 que se encontra mais distante dos demais isolados no dendrograma.

7.5.3 Amplificação de genes conservados “housekeeping” no genoma das estirpes

Através da amplificação de genes conservados *housekeeping* foi possível obter diferentes árvores para visualizar a evolução filogenética dos isolados bacterianos pertencente ao grupo de *B. cereus* e assim agrupá-los filogeneticamente.

Ao analisar as árvores geradas a partir das sequências dos genes *glp* (Figura 24), *gmk* (Figura 25) e *pta* (Figura 26) foi observado que os isolados FORCN075, FORCN076, FORCN089, FORCN090, FORCN091, FORCN092 e FORCN093 ficaram agrupados juntos com a estirpe de *B. thuringiensis* serovar *berliner*. Os isolados FORCN070 e FORCN096 ficaram agrupados com a estirpe de *B. thuringiensis* serovar *berliner* nas árvores dos genes *glp* e *gmk* (Figura 24 e 25). As sequências desses dois isolados (FORCN070 e FORCN096) não foram avaliadas para o gene *pta*, pois não estavam com qualidade para ser analisada.

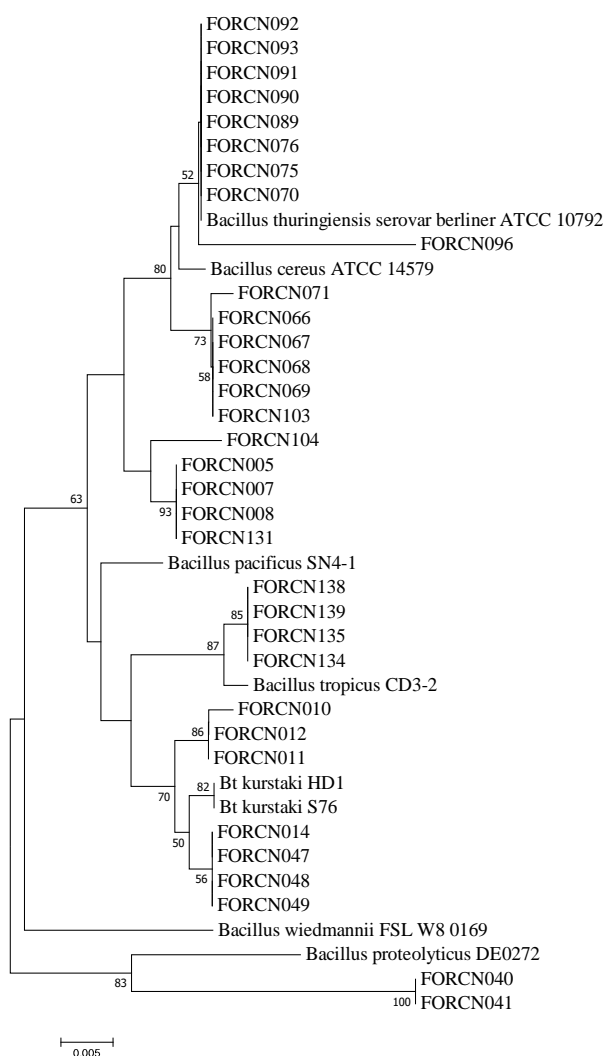


Figura 24. Árvore filogenética utilizando o método *Neighbor-Joining* estimado a partir de 440 posições de nucleotídeos do gene *glp*. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura 3-parâmetros como indicado pela função de teste de modelo do programa MEGA 7.0. Valores de Bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 réplicas. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. Sequências de espécies do gênero *Bacillus* depositadas no banco de dados NCBI foram utilizadas para agrupar os isolados bacterianos no dendrograma.

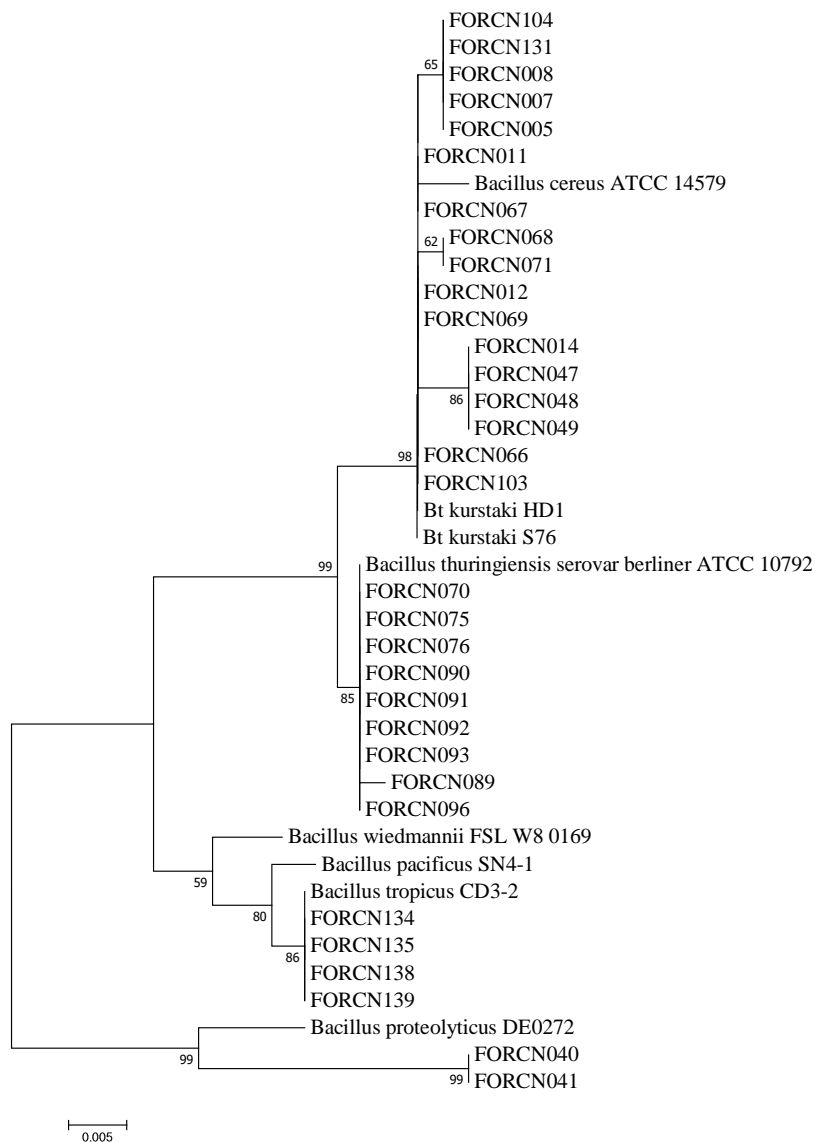


Figura 25. Árvore filogenética construída utilizando o método *Neighbor-Joining* estimado a partir de 463 posições de nucleotídeos do gene *gmk*. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura 3-parâmetros como indicado pela função de teste de modelo do programa MEGA 7.0. Valores de Bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 réplicas. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. Sequências de espécies do gênero *Bacillus* depositadas no banco de dados NCBI foram utilizadas para agrupar os isolados bacterianos no dendrograma.

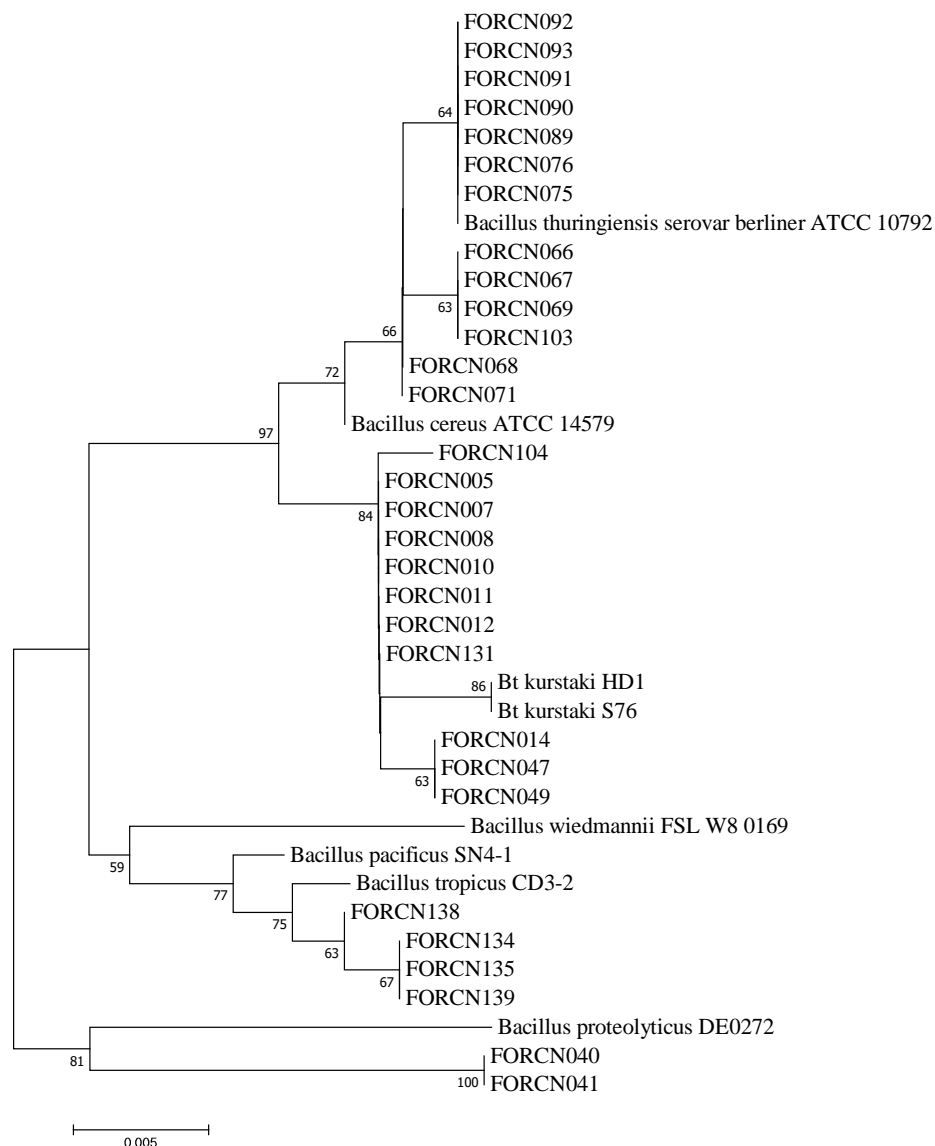


Figura 26. Árvore filogenética utilizando o método *Neighbor-Joining* estimado a partir de 498 posições de nucleotídeos do gene *pta*. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura 3-parâmetros como indicado pela função de teste de modelo do programa MEGA 7.0. Valores de Bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 réplicas. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. Sequências de espécies do gênero *Bacillus* depositadas no banco de dados NCBI foram utilizadas para agrupar os isolados bacterianos no dendrograma.

A árvore gerada a partir de sequências do gene *tpi*, agrupou os isolados FORCN005, FORCN007, FORCN008, FORCN010, FORCN011, FORCN012, FORCN014, FORCN047, FORCN048, FORCN049, FORCN068, FORCN070, FORCN071, FORCN075, FORCN076, FORCN089, FORCN090, FORCN091, FORCN092, FORCN093, FORCN096, FORCN103, FORCN104 e FORCN131 com as estirpes *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* S76, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 e *B. cereus* (Figura 27).

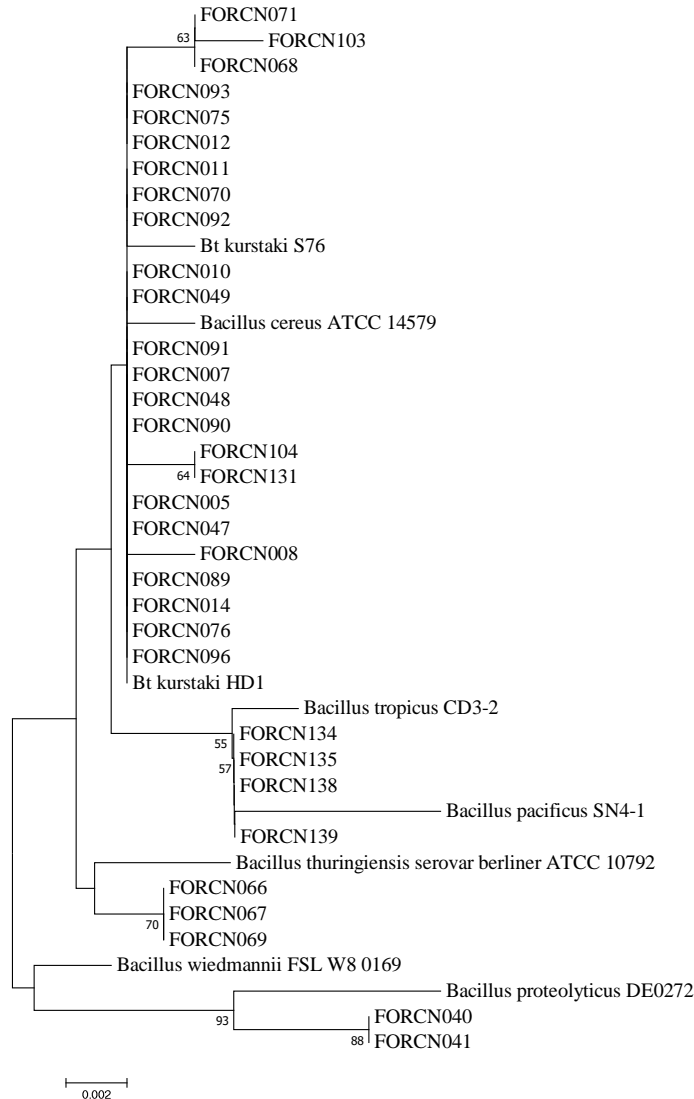


Figura 27. Árvore filogenética utilizando o método *Neighbor-Joining* estimado a partir de 453 posições de nucleotídeos do gene *tpi*. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura 3-parâmetros como indicado pela função de teste de modelo do programa MEGA 7.0. Valores de Bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 réplicas. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. Sequências de espécies do gênero *Bacillus* depositadas no banco de dados NCBI foram utilizadas para agrupar os isolados bacterianos no dendrograma.

Os isolados bacterianos FORCN010, FORCN011, FORCN012, FORCN048 e FORCN049 ficaram agrupados com as estirpes S76 e HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* na árvore gerada a partir de sequências do gene *pycA* (Figura 28).

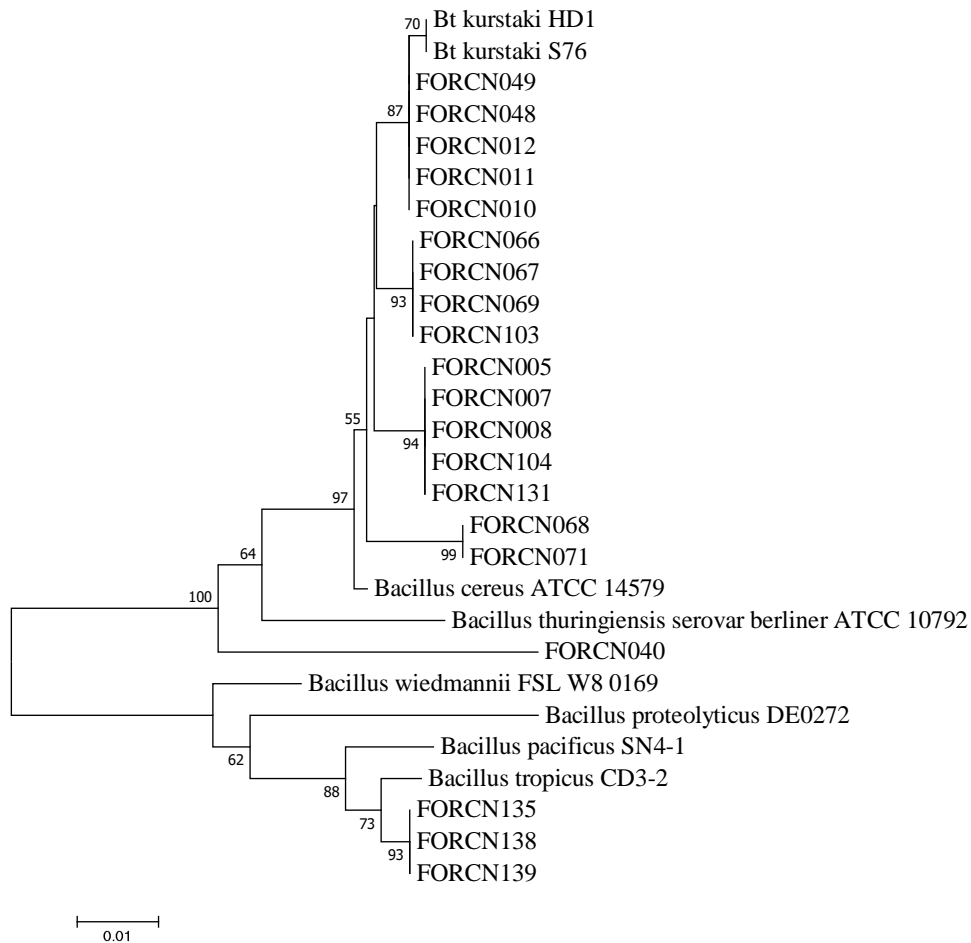


Figura 28. Árvore filogenética utilizando o método *Neighbor-Joining* estimado a partir de 480 posições de nucleotídeos do gene *pycA*. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura 3-parâmetros como indicado pela função de teste de modelo do programa MEGA 7.0. Valores de Bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 réplicas. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. Sequências de espécies do gênero *Bacillus* depositadas no banco de dados NCBI foram utilizadas para agrupar os isolados bacterianos no dendrograma.

Ao construir a árvore filogenética utilizando sequências do gene *ilvD*, os isolados agrupados com as espécies de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* S76 foram FORCN010, FORCN049 e FORCN104 (Figura 29).

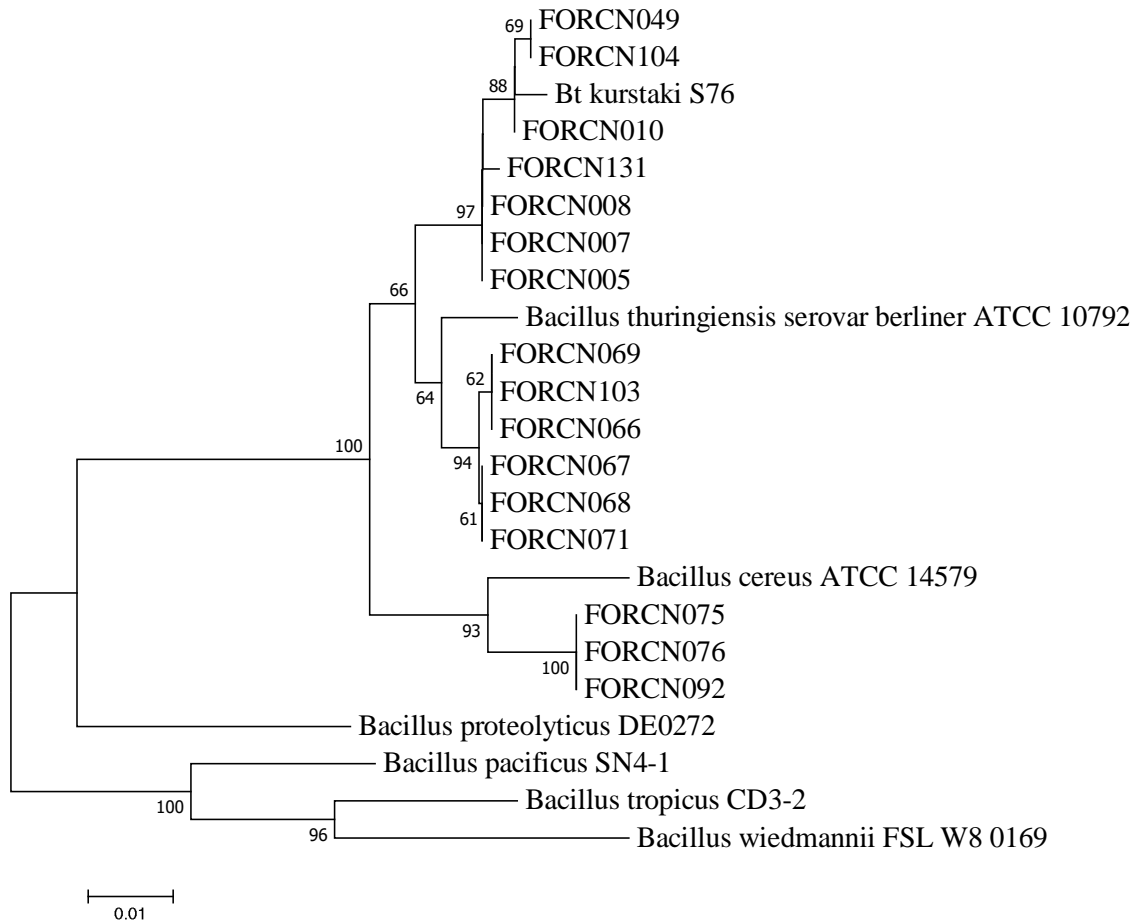


Figura 29. Árvore filogenética utilizando o método *Neighbor-Joining* estimado a partir de 541 posições de nucleotídeos do gene *ilvD*. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura 3-parâmetros como indicado pela função de teste de modelo do programa MEGA 7.0. Valores de Bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 réplicas. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. Sequências de espécies do gênero *Bacillus* depositadas no banco de dados NCBI foram utilizadas para agrupar os isolados bacterianos no dendrograma.

Os genes conservados “*housekeeping*” que melhor agruparam as espécies de *B. thuringiensis* foram o *glp*, *gmk*, *pta* e *tpi*. De acordo com trabalho desenvolvido por Wang et al. (2018), a análise utilizando genes conservados “*housekeeping*” mostrou uma separação satisfatória dos isolados bacterianos a nível de serovar. Desta forma, pode-se inferir que os isolados bacterianos analisados estão relacionados com subespécies diferentes das analisadas e por isso ficaram agrupadas separadamente.

Os isolados bacterianos FORCN005, FORCN007, FORCN008, FORCN011, FORCN012, FORCN014, FORCN067, FORCN076, FORCN092, FORCN093 e FORCN135, positivos no resultado de amplificação do regulador transcricional XRE, ou seja correspondentes a espécie *B. thuringiensis*, podem ser considerados subespécies diferentes de acordo com a análise de genes conservados, já que alguns ficaram agrupados separadamente nas árvores evolutivas para os diferentes genes.

Alguns isolados não foram analisados pois as sequências tinham baixa qualidade ou não amplificaram para determinados genes.

A árvore filogenética concatenada estimada a partir de 1862 posições de nucleotídeos de sequências de quatro genes conservados (*glp*, *gmk*, *pta* e *tpi*) agrupou os isolados FORCN075, FORCN076, FORCN089, FORCN090, FORCN091, FORCN092 e FORCN093 com a espécie *B. thuringiensis* serovar *berliner* (Figura 30).

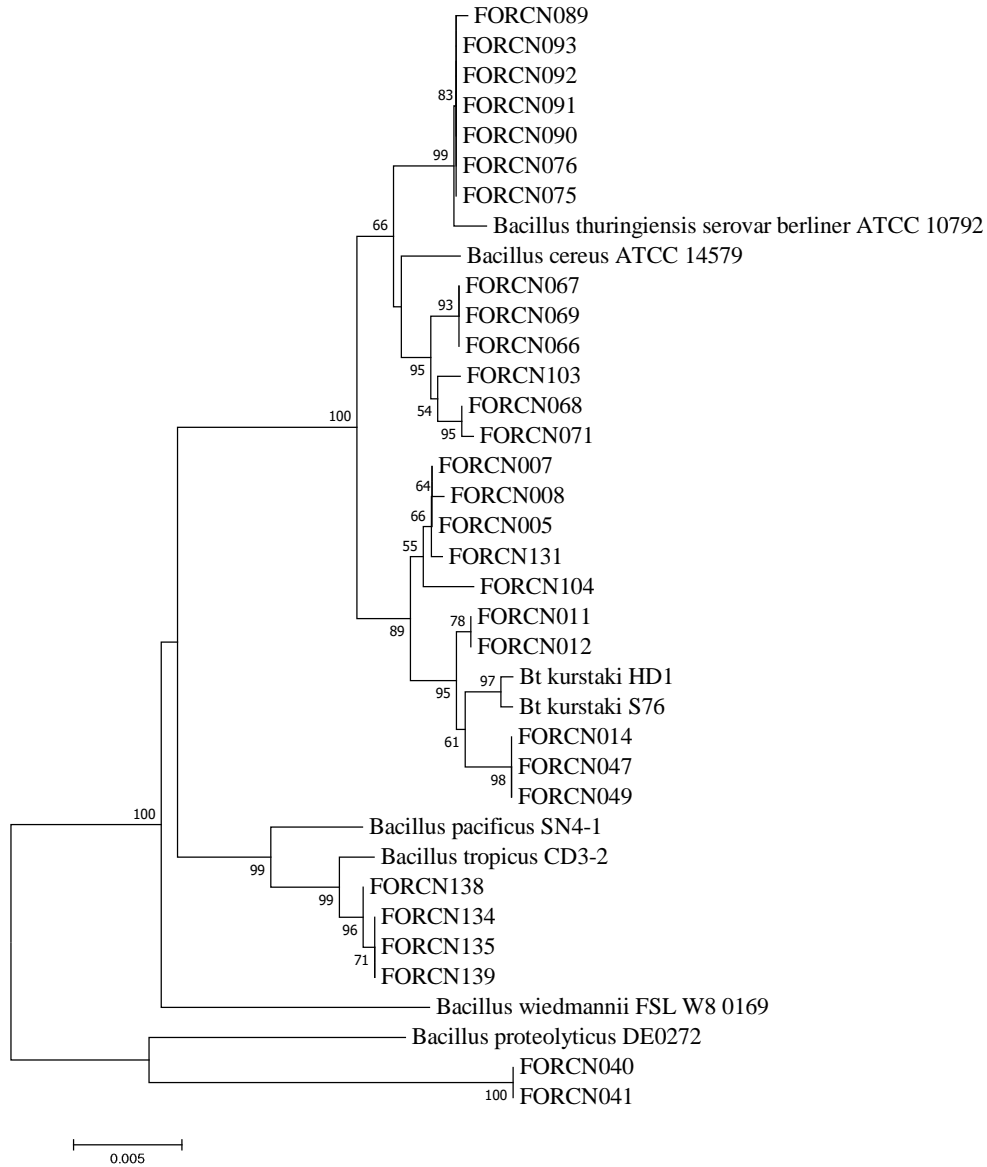


Figura 30. Árvore filogenética utilizando o método *Neighbor-Joining* estimado a partir das sequências concatenadas de quatro genes conservados (*glp*, *gmk*, *pta* e *tpi*). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura 3-parâmetros como indicado pela função de teste de modelo do programa MEGA 7.0. Valores de Bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 réplicas. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. Sequências de espécies do gênero *Bacillus* depositadas no banco de dados NCBI foram utilizadas para agrupar os isolados bacterianos no dendrograma.

7.6 Indução de esporulação e produção de cristais proteicos

A avaliação microscópica dos cristais proteicos com contraste de fase não permitiu diferenciar a espécie *B. thuringiensis* de *B. cereus* em nenhum dos períodos avaliados (24, 48 e 72 horas após o crescimento). Como podemos observar na Figura 31, a estirpe HD1 de *Bt* subsp. *kurstaki* aparentemente produziu estrutura similar a cristais proteicos em forma bipiramidal em 24 e 48 horas. No entanto, as imagens não permitiram afirmar se realmente há produção de cristais. Diante da dificuldade em observar cristais produzidos em microscópio ótico, optou-se pela visualização em gel de poliacrilamida (SDS-Page) do perfil de proteínas produzidas pelos isolados bacterianos conforme sugerido por Boonmee et al. (2019).

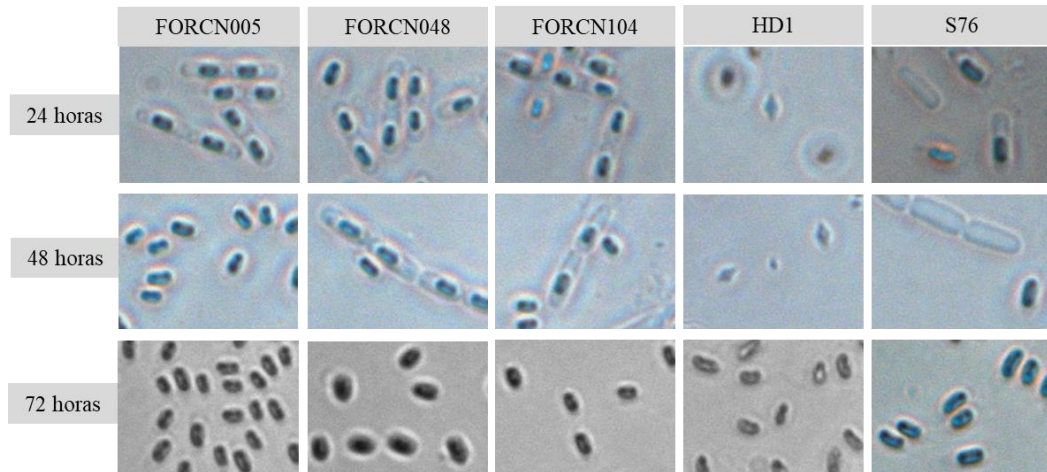


Figura 31. Esporos e cristais produzidos por isolados bacterianos 24, 48 e 72 horas após o crescimento em meio HCT. FORCN005 (*B. thuringiensis*), FORCN048 (*B. cereus*), FORCN104 (*B. wiedmannii*), HD1 e S76 (estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*).

7.7 Obtenção de proteínas produzidas por *B. thuringiensis*

Como não foi possível visualizar cristais proteicos utilizando microscópio, optou-se por visualizar os perfis de bandas das proteínas em gel de poliacrilamida 10%. A massa molecular das proteínas Cry pode variar entre 14 e 142 kDa (CRICKMORE et al., 2018). Observando a figura 32A, a amostra de *B. thuringiensis* estirpe HD-1 (comercial) possui a banda de 130KDa (correspondente a proteína Cry1), assim como nos isolados FORCN138, FORCN071, FORCN049, FORCN069, FORCN012, FORCN067, FORCN008, FORCN041, FORCN139, FORCN070 e FORCN075, mas em menor quantidade. Outras proteínas produzidas podem ser observadas no gel de poliacrilamida (Figura 32). Não se sabe quais são as proteínas produzidas por esses isolados bacterianos, mas estas proteínas foram oferecidas para lagartas da broca gigante com o objetivo de avaliar os efeitos que causam neste inseto.

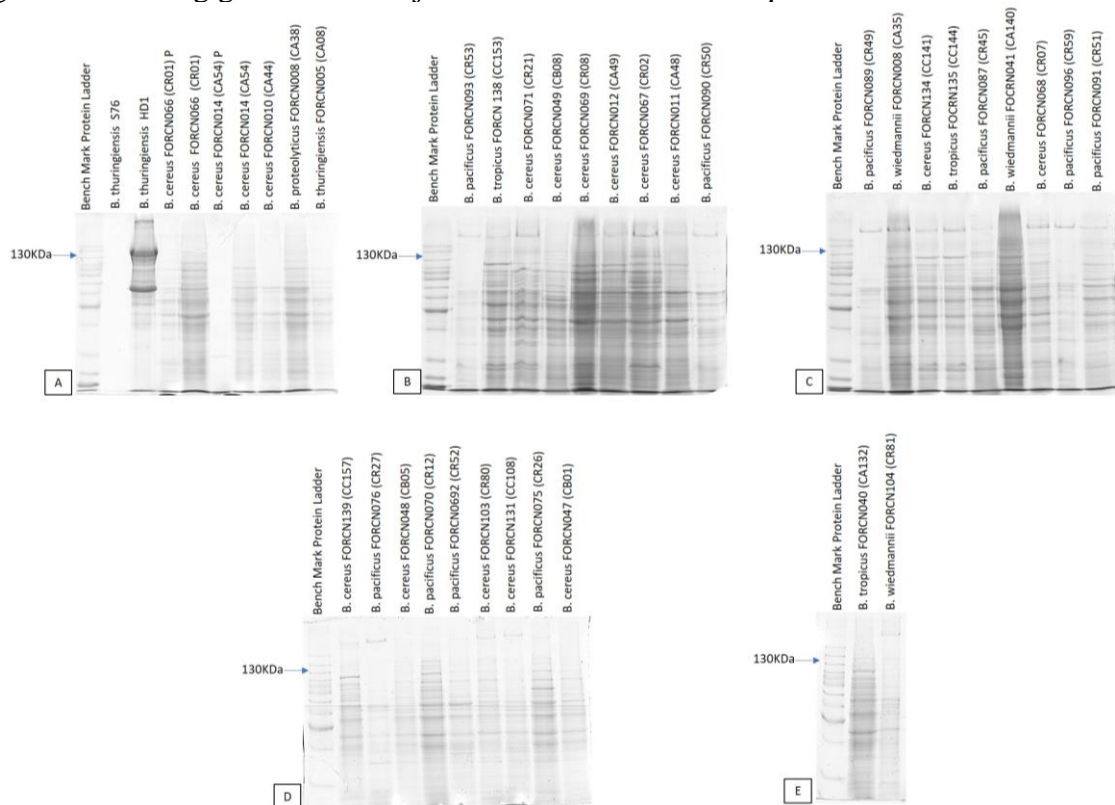


Figura 32. Géis de poliacrilamida a 10% para visualização de proteínas produzidas por isolados bacterianos do gênero *Bacillus*. A) Perfil de proteína dos isolados *Bacillus thuringiensis* estirpe S76, *Bacillus thuringiensis* estirpe HD-1; FORCN066; FORCN014; FORCN010; FORCN008 e FORCN005. B) Perfil de proteína dos isolados FORCN093; FORCN138; FORCN071; FORCN049; FORCN069; FORCN012; FORCN067; FORCN011 e FORCN090. C) Perfil de proteína dos isolados FORCN089; FORCN007; FORCN134; FORCN135; FORCN087; FORCN041; FORCN068; FORCN096 e FORCN091. D) Perfil de proteína dos isolados FORCN139; FORCN076; FORCN048; FORCN070; FORCN092; FORCN103; FORCN131; FORCN075 e FORCN047. E) Perfil de proteína dos isolados FORCN040 e FORCN104.

7.8 Bioensaios *in vitro* para avaliação da capacidade entomopatogenicidade de estirpes de *Bacillus* contra lagartas da broca gigante

Os resultados referentes aos oito bioensaios realizados contra lagartas da broca gigante coletadas no campo estão apresentados a seguir:

Bioensaio 1 – Neste bioensaio foi observado uma taxa de mortalidade das larvas de até 57,1% (Figura 33) com destaque para as estirpes FORCN066 (isolado de raízes de cana) e *Bt* HD-1 (estirpe comercial). Os tratamentos FORCN014 (isolado do líquido do apoplasto) e FORCN068 (isolado de raízes de cana) apresentaram uma taxa de mortalidade 42,9% das lagartas.

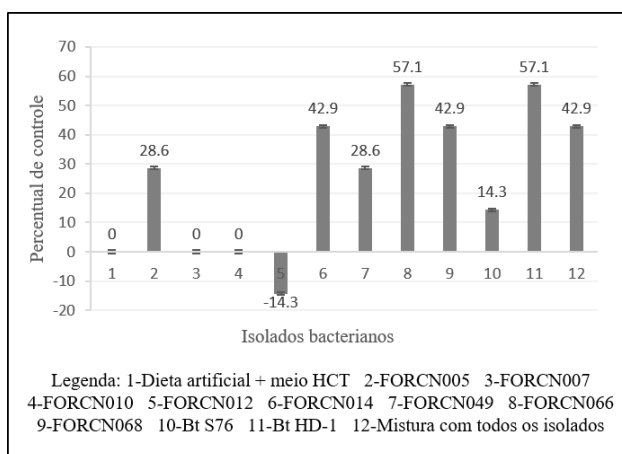


Figura 33. Taxa de mortalidade das lagartas de *Telchin licus licus* no bioensaio 1. Avaliação realizada após 15 dias do início do bioensaio com dieta artificial contendo 100µL de suspensão bacteriana esporulada. Bioensaio realizado em julho de 2018.

Bioensaio 2: No segundo bioensaio foi observado que os melhores tratamentos promoveram uma taxa de mortalidade de 50% (Figura 34). Os tratamentos responsáveis por essa taxa de mortalidade foram novamente as estirpes FORCN066 e *Bt* HD-1, além da estirpe *Bt* S76. Cabe ressaltar que o isolado FORCN014 foi responsável pela taxa de mortalidade de 37,5%, estando entre os melhores tratamentos desse bioensaio.

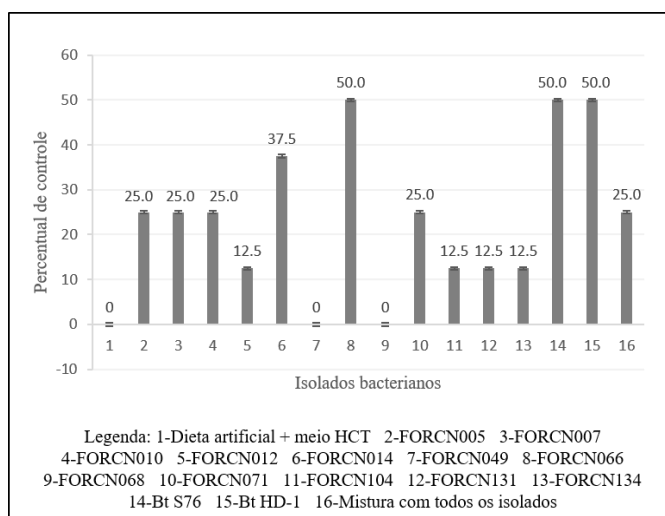


Figura 34. Taxa de mortalidade das lagartas de *Telchin licus licus* no bioensaio 2. Avaliação realizada após 15 dias do início do bioensaio com dieta artificial contendo 100µL de suspensão bacteriana esporulada. Bioensaio realizado em setembro de 2018.

Bioensaio 3: No bioensaio três não foi observado taxas de mortalidades elevadas. As estirpes S76 e HD-1 de *Bt* promoveram 14,3% de mortalidade e os isolados FORCN014, FORCN066 não promoveram mortalidade das lagartas utilizadas nesse bioensaio (Figura 35).

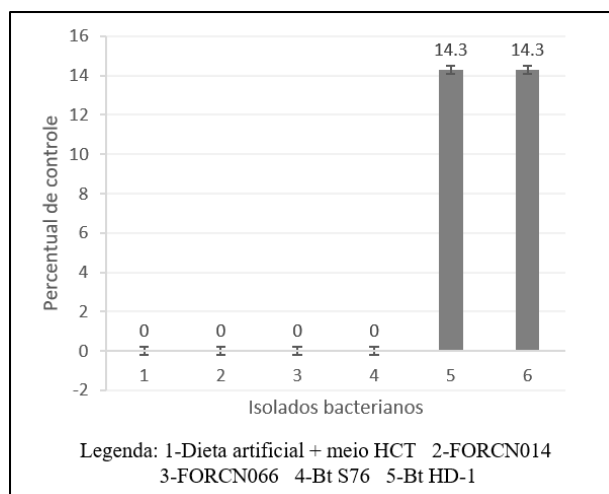


Figura 35. Taxa de mortalidade das lagartas de *Telchin licus licus* no bioensaio 3. Avaliação realizada após 15 dias do início do bioensaio com dieta artificial contendo 100 μ L de suspensão bacteriana esporulada. Bioensaio realizado outubro de 2018.

Ao proceder com a dissecação das lagartas utilizadas no bioensaio 3, foi observado que todas estavam infectadas com nematoide (Figura 36). Não se sabe qual a espécie do nematoide encontrado. No entanto, eles podem ter sido responsáveis pela morte das lagartas, assim como podem estar interferindo no desenvolvimento desses insetos. A presença de nematoides pode ter inibido o apetite, fazendo com que as lagartas perdessem o interesse pela dieta oferecida.



Figura 36. Presença de nematoide no interior de lagartas da broca gigante.

Bioensaio 4: Os isolados bacterianos FORCN014 e FORCN066 promoveram taxa de mortalidade de 50% das lagartas utilizadas no bioensaio (Figura 37), sugerindo que as estirpes previamente testadas possuem potencial de controle da broca gigante.

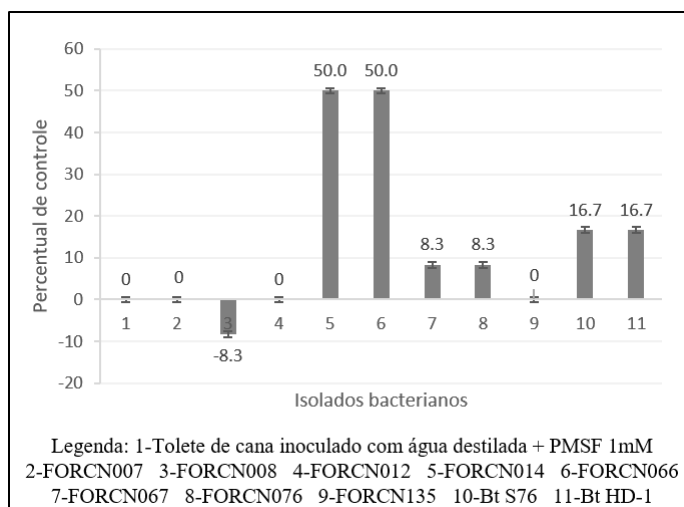


Figura 37. Taxa de mortalidade das lagartas de *Telchin licus licus* no bioensaio 4. Avaliação realizada após 15 dias do início do bioensaio com toletes de cana-de-açúcar inoculados com toxinas de *Bacillus* na concentração de 1000ng/cm². Bioensaio realizado em outubro de 2019.

Bioensaio 5: As toxinas utilizadas no bioensaio 5 não promoveram taxa significativa de mortalidade das lagartas da broca gigante (Figura 38). Neste bioensaio as toxinas foram colocadas diretamente no aparato bucal das lagartas e mesmo assim não houve efeito tóxico.

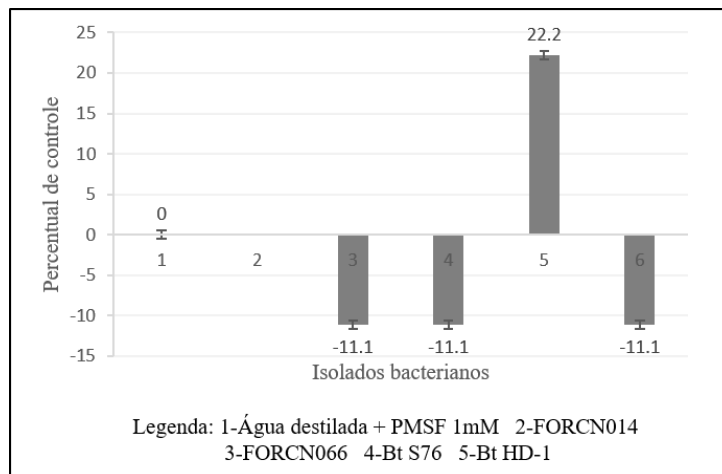


Figura 38. Taxa de mortalidade das lagartas de *Telchin licus licus* no bioensaio 5. Avaliação realizada após 15 dias do início do bioensaio com dieta líquida (4µL de toxina) adicionada diretamente no aparato bucal das lagartas na concentração de 2000ng/cm². Bioensaio realizado em dezembro de 2019.

Ao fim dos bioensaios foi verificado que os isolados FORCN014, FORCN066 e as estirpes S76 e HD1 de *Bt* foram aquelas que promoveram maiores taxas de mortalidade, podendo ser considerados os isolados mais promissores no controle da broca gigante (Tabela 8).

Tabela 8. Características dos isolados bacterianos pertencentes ao grupo de *Bacillus cereus*.

Isolados	Amplificação dos Genes				Provável espécie de <i>Bacillus</i>	% Mortalidade nos Bioensaios				
	<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>cry9</i>	<i>XRE</i>		1	2	3	4	5
FORCN005	-	-	-	+	<i>B. thuringiensis</i>	37,5%	25%	na	na	na
FORCN007	-	+	-	+	<i>B. thuringiensis</i>	12,5%	25%	na	8%	na
FORCN008	-	-	-	+	<i>B. thuringiensis</i>	na	na	na	0%	na
FORCN010	-	-	-	-	<i>B. cereus</i> *	12,5%	25%	na	na	na
FORCN011	-	-	-	+	<i>B. thuringiensis</i>	na	na	na	na	na
FORCN012	-	+	-	+	<i>B. thuringiensis</i>	0%	12,5%	na	8%	na
FORCN014	-	+	-	+	<i>B. thuringiensis</i>	50%	37,5%	30%	54%	0%
FORCN040	-	-	-	-	<i>B. tropicus</i> *	na	na	na	na	na
FORCN041	-	-	-	-	<i>B. wiedmannii</i> *	na	na	na	na	na
FORCN047	-	-	-	-	<i>B. cereus</i> *	na	na	na	na	na
FORCN048	-	-	-	-	<i>B. cereus</i> *	na	na	na	na	na
FORCN049	-	-	-	-	<i>B. cereus</i> *	37,5%	0%	na	na	na
FORCN066	-	-	-	-	<i>B. cereus</i> *	62,5%	50%	30%	54%	0%
FORCN067	-	-	-	+	<i>B. thuringiensis</i>	na	na	na	15%	na
FORCN068	-	-	-	-	<i>B. cereus</i> *	50%	0%	na	na	na
FORCN069	-	-	-	-	<i>B. cereus</i> *	na	na	na	na	na
FORCN070	-	-	-	-	<i>B. pacificus</i> *	na	na	na	na	na
FORCN071	-	-	-	-	<i>B. cereus</i> *	25%	25%	na	na	na
FORCN075 ^a	-	-	-	-	<i>B. pacificus</i> *	na	na	na	na	na
FORCN076 ^a	-	-	-	+	<i>B. thuringiensis</i>	na	na	na	15%	na
FORCN087	-	+	-	-	<i>B. pacificus</i> *	na	na	na	na	na
FORCN089 ^a	-	-	-	-	<i>B. pacificus</i> *	na	na	na	na	na
FORCN090 ^a	-	-	-	-	<i>B. pacificus</i> *	na	na	na	na	na
FORCN091 ^a	-	-	-	-	<i>B. pacificus</i> *	na	na	na	na	na
FORCN092 ^a	-	+	-	+	<i>B. thuringiensis</i>	na	na	na	na	na
FORCN093 ^a	-	-	-	+	<i>B. thuringiensis</i>	na	na	na	na	na
FORCN096	-	+	-	-	<i>B. pacificus</i> *	na	na	na	na	na
FORCN103	-	-	-	-	<i>B. cereus</i> *	na	na	na	na	na
FORCN104	-	-	-	-	<i>B. wiedmannii</i> *	25%	12,5%	na	na	na
FORCN131	-	-	-	-	<i>B. cereus</i> *	25%	12,5%	na	na	na
FORCN134	-	-	-	-	<i>B. cereus</i> *	25%	12,5%	na	na	na
FORCN135	-	-	-	+	<i>B. thuringiensis</i>	na	na	na	8%	na
FORCN138	-	-	-	-	<i>B. tropicus</i> *	na	na	na	na	na
FORCN139	-	-	-	-	<i>B. cereus</i> *	na	na	na	na	na
Controle Bioensaio						12,5%	0%	30%	8%	10%

Símbolo: (+) positivo e (-) negativo para a amplificação do gene.

*espécies classificadas de acordo com sequenciamento da região 16S rRNA.

A espécie *B. thuringiensis* foi classificada a partir do resultado de amplificação do regulador transcricional XRE. na – isolados não avaliados no teste.

^aIsolados agrupados com *B. thuringiensis* subsp. *berliner* de acordo com o resultado da árvore concatenada (genes *glp*, *gmk*, *pta* e *tpi*).

Resultados variáveis obtidos nos bioensaios podem ter ocorrido em decorrência da variação na coleta de lagartas, como época de coleta, tamanho das lagartas, instares distintos, além da presença de nematoides no interior das lagartas e microrganismos associados. A letalidade das toxinas de *B. thuringiensis* varia de acordo com a dose de toxina e o tamanho das lagartas (BIERNE & NIELSEN-LEROUX, 2017).

Os resultados obtidos neste trabalho deixam claro que o grande impasse para o sucesso no controle dessa praga é a criação destes insetos em laboratório. A criação permite entender

a biologia do inseto, identificar seus inimigos naturais (PARRA et al., 2002) e assim desenvolver métodos mais eficientes de controle. Além da falta de homogeneidade nos tratamentos utilizando lagartas de diferentes instares, poucos bioensaios puderam ser realizados, já que ficamos dependentes da sazonalidade do inseto nas áreas de cultivo e por apresentarem problemas de sanidade e injúrias (NEGRISOLI JÚNIOR et al., 2015) muitas lagartas são inutilizadas para testes em laboratórios.

Outro fator que pode ter influenciado nos resultados dos bioensaios é a associação da microbiota intestinal com o inseto hospedeiro. Sabe-se que esta associação traz inúmeros benefícios para os insetos, dentre eles o auxílio na aquisição de nutrientes e proteção contra microrganismos entomopatogênicos (DILLON & DILLON 2004; FLÓREZ et al., 2015). Estes microrganismos podem ter conferido resistência das lagartas às toxinas de *B. thuringiensis* utilizadas, mantendo-as vivas.

As comunidades bacterianas intestinais podem produzir substâncias bactericidas que agem contra bactérias exógenas, protegendo o hospedeiro (DILLON & DILLON, 2004). Exemplo desta associação benéfica é a bactéria *Enterococcus mundtii*, nativa da microbiota de *Spodoptera littoralis*, que produz um composto antimicrobiano (bacteriocina de classe IIa mundticin KS) contra agentes patogênicos e garante proteção a seu hospedeiro (SHAO et al., 2017). Segundo Broderick et al. (2004), a bactéria *Enterococcus faecalis*, muito frequente na microbiota intestinal de *Lymantria dispar*, pode proteger as lagartas das toxinas de *B. thuringiensis*, pois é capaz de diminuir o pH do intestino médio desse inseto e essa acidificação não permite a ativação das toxinas, que para ser ativada necessita de condição alcalina (BRAVO et al., 2013). Outros estudos mostraram que o desenvolvimento de resistência de insetos às toxinas de *B. thuringiensis* foi conferida pela microbiota intestinal dessas pragas, como por exemplo o desenvolvimento de resistência de *Plutela xylostella* e de *Helicoverpa armigera* (RAYMOND et al., 2009; PARAMASIVA et al., 2014).

Insetos tem exibido grande eficiência no que se diz respeito ao desenvolvimento de mecanismos de resistência contra pesticidas, patógenos ou toxinas (BIERNE & NIELSEN-LEROUX, 2017). Sucessivas infecções com toxinas de *B. thuringiensis* também pode induzir resistência em insetos, como a resistência adquirida de *G. mellonella* às toxinas de *B. thuringiensis* após 20 gerações, tornando-se nove vezes mais resistente às toxinas (DUBOVSKIY et al., 2016). Alguns fatores contribuem para a evolução de resistência de insetos, como por exemplo, a resposta imune elevada (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2010), a resistência cruzada (SHABBIR et al., 2018) e a mutação nos receptores de ligação das toxinas de *B. thuringiensis*, resultando em uma redução da ligação das toxinas nas membranas intestinais ou ausência do receptor de ligação (BRAVO et al., 2011; PARDO-LOPEZ, SOBERON & BRAVO, 2013).

De modo a estudar a influência da imunossupressão na vulnerabilidade de *Spodoptera littoralis* às toxinas de *B. thuringiensis*, Caccia et al. (2016) silenciaram o gene imune 102 SI através da mediação de um RNA interferente. O gene está localizado na hemolinfa do inseto e é importante para o encapsulamento de moléculas indesejáveis, como as toxinas de *B. thuringiensis*. Os resultados obtidos pelos autores mostraram que a mortalidade do hospedeiro foi mais acentuada quando a imunocompetência do hospedeiro foi reduzida com o silenciamento do gene 102 SI. A imunossupressão do hospedeiro é uma estratégia para aumentar a eficiência de controle dos microrganismos entomopatogênicos (CACCIA et al., 2016).

Diante dos estudos sobre a relação de insetos com a microbiota intestinal e as toxinas do entomopatógeno, pode-se concluir que o conhecimento da biologia do inseto, da microbiota intestinal, das funções que desempenham em simbiose com seu hospedeiro e dos mecanismos envolvidos na evolução de resistência são fundamentais para elucidar métodos de controle eficientes.

8 CONCLUSÕES

- O líquido do apoplasto de cana-de-açúcar é o nicho com maior número de espécies bacterianas, sendo identificadas 17 espécies, distribuídas entre os gêneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* e *Terribacillus*, habitando esse nicho;

- Dentre os isolados obtidos, a espécie *B. megaterium* é a mais representativa de acordo com a caracterização taxonômica (amplificação da região 16S rRNA), seguida das espécies *B. safensis*, *B. cereus*, *B. oleronius*, *B. amyloliquefaciens* e *B. pacificus*;

- Os isolados pertencentes ao grupo de *B. cereus* (16S rRNA) compõem o mesmo grupo no dendrograma gerado com a análise de BOX-PCR ou estão em grupos próximos. Esses isolados apresentaram um número pequeno de bandas amplificadas, sendo difícil a distinção através da técnica de BOX-PCR;

- Através do uso de iniciadores específicos para amplificação de genes *cry*, os isolados FORCN007 (*B. wiedmannii*), FORCN012 (*B. cereus*), FORCN014 (*B. cereus*), FORCN087 (*B. pacificus*), FORCN092 (*B. pacificus*) e FORCN096 (*B. pacificus*) possuem o gene *cry2*;

- Os isolados FORCN005, FORCN007, FORCN008, FORCN011, FORCN012, FORCN014, FORCN067, FORCN076, FORCN092, FORCN093 e FORCN135 são filogeneticamente pertencentes às espécies de *B. thuringiensis* de acordo com o resultado de amplificação utilizando o marcador biológico XRE;

- A árvore concatenada construída com base nas sequências de quatro genes conservados (*glp*, *gmk*, *pta* e *tpi*) mostra correspondência dos isolados FORCN075, FORCN076, FORCN089, FORCN090, FORCN091, FORCN092 e FORCN093 com a espécie *B. thuringiensis* serovar *berliner*;

- As bactérias FORCN014 (*B. thuringiensis*) e FORCN066 (*B. cereus*) foram eficazes no controle da broca gigante, comparando com o controle negativo, sendo consideradas as estirpes mais promissoras para controle da broca gigante de cana-de-açúcar nas condições testadas neste projeto.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse projeto de pesquisa abriram um leque de informações a respeito dos isolados bacterianos provenientes de plantas de cana-de-açúcar e do trato digestivo da broca gigante. Ainda não se sabe a fundo o papel da microbiota intestinal vivendo em simbiose com insetos, mas é comprovado que a microbiota influencia fortemente na sobrevivência destes. Diante das informações obtidas, novos ensaios devem ser realizados com larvas oriundas de ovos mantidos em laboratório de modo a determinar a concentração letal (LC₅₀) de toxina de *B. thuringiensis* para promover a mortalidade das lagartas da broca gigante.

Um dos grandes entraves para realização dos bioensaios foi a obtenção de lagartas da broca gigante. A criação da broca gigante no laboratório da Embrapa Agrobiologia foi inviável, visto que foi observado assincronia na emergência de adultos machos e fêmeas, impossibilitando a cópula. Alguns fatores estão envolvidos no comportamento de acasalamento desse inseto, como a atração química por meio de feromônio, atração visual, movimentação do inseto e luz solar (WADT, 2012), determinando o sucesso ou insucesso do acasalamento. Diante desse obstáculo, as lagartas utilizadas neste trabalho foram coletadas em áreas produtoras de cana-de-açúcar com incidência da praga. Estas apresentavam diferentes tamanhos, o que dificultou a homogeneidade entre os tratamentos. Além disso, muitas não tinham mais interesse pelo alimento oferecido devido ao estresse gerado durante o transporte de Alagoas até o Rio de Janeiro e se transformaram em pupas.

Além dos ensaios *in vitro*, ensaios em casa de vegetação devem ser realizados para confirmar a eficiência de controle dos isolados selecionados. E, somente após a confirmação dos resultados, que os métodos mais eficientes para intoxicação das lagartas da broca gigante em áreas de cultivo serão testados. Desta forma, é possível indicar a dosagem do produto biológico a ser utilizada pelo produtor e a melhor forma de aplicação para garantir o máximo de controle desta praga.

Cortes histológicos para visualização da morfologia das células do trato digestivo da broca gigante após a exposição a diferentes concentrações de toxinas produzidas por *B. thuringiensis* podem ser realizados a fim de enriquecer o conhecimento sobre o efeito que causam nas células intestinais após a ingestão.

Além das considerações mencionadas, estudos utilizando microrganismos nativos do trato digestivo da broca gigante visando garantir um melhor desenvolvimento desses insetos pode ser uma alternativa para viabilizar a criação em laboratório, já que a microbiota intestinal confere diversos benefícios ao inseto.

10 APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho faz parte do projeto PA: 02.14.14.002.00.04.001 e foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes) - Código de Financiamento 001 (PORTARIA Nº206, DE 4 DE SETEMBRO DE 2018 DA CAPES); FAPERJ, EMBRAPA Agrobiologia, EMBRAPA Tabuleiros Costeiros e Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, Walter S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **J. Econ. Entomol**, v. 18, n. 2, p. 265-267, 1925.
- AGAISSÉ, Herve; LERECLUS, Didier. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* cryIII_A toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a spo0A mutant. **Journal of bacteriology**, v. 176, n. 15, p. 4734-4741, 1994.
- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Consulta de ingrediente ativo. 2020. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 3 de mar. de 2020.
- DE ALMEIDA, Luiz Carlos; DIAS FILHO, Manoel Martins; ARRIGONI, Enrico De Beni. PRIMEIRA OCORRÊNCIA DE *Telchin licus* (DRURY, 1773), A BROGA GIGANTE DA CANA-DE-AÇUCAR, NO ESTADO DE SÃO PAULO. **BRAZILIAN JOURNAL OF AGRICULTURE-Revista de Agricultura**, v. 82, n. 2, p. 223-226, 2015.
- DE ALMEIDA, Luiz Carlos; ARRIGONI, Enrico De Beni. Parâmetros biológicos da broca gigante da cana-de-açúcar, *Telchin licus* (DRURY, 1773). **Brazilian Journal of Agriculture-Revista de Agricultura**, v. 84, n.1, p. 56-61, 2009.
- ALTSCHUL, Stephen F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ARANDA, Eduardo et al. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of invertebrate pathology**, v. 68, n. 3, p. 203-212, 1996.
- ARANTES, Olivia; LERECLUS, Didier. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. **Gene**, v. 108, n. 1, p. 115-119, 1991.
- ARGÔLO-FILHO, Ronaldo Costa; LOGUERCIO, Leandro Lopes. *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches. **Insects**, v. 5, n. 1, p. 62-91, 2014.
- ARONSON, Arthur I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiological reviews**, v. 50, n. 1, p. 1-24, 1986.
- AZEVEDO, João Lúcio et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 15-16, 2000.
- AZIZOGLU, Ugur et al. Expression of *cryIAb* gene from a novel *Bacillus thuringiensis* strain SY49-1 active on pest insects. **Brazilian journal of microbiology**, v. 47, n. 3, p. 597-602, 2016.
- AZIZOGLU, Ugur. An overview of the microbial insecticide: *Bacillus thuringiensis*. **EC Microbiology**, ECO.01, p. 28-30, 2017.
- BAEK, Inwoo et al. Comparative genomic and phylogenomic analyses clarify relationships within and between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*: proposal for the recognition of two *Bacillus thuringiensis* genomovars. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1978, 2019.
- BALDANI, Vera Lucia Divan. **Especificidade na infecção de raízes de milho, trigo e arroz por *Azospirillum* spp.** UFRRJ, 1980. 116p. Tese de Doutorado. Tese Mestrado.

DE BARJAC, H.; FRACHON, E. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. **Entomophaga**, v. 35, n. 2, p. 233-240, 1990.

BEL, Yolanda et al. Toxicity and binding studies of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac, Cry1F, Cry1C, and Cry2A proteins in the soybean pests *Anticarsia gemmatilis* and *Chrysodeixis (Pseudoplusia) includens*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 83, n. 11, p. e00326-17, 2017.

BEN-DOV, Eitan et al. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 12, p. 4883-4890, 1997.

BENEDINI, M. S.; CONDE, A. J. Broca gigante nova praga da cana-de-açúcar na região centro-sul. Revista Coplana, Guariba, n. 24, p. 24-25, set. 2008. Disponível em: <<https://www.yumpu.com/pt/document/read/12748638/broca-gigante-coplana>>. Acesso em: 8 jan. 2009.

BENSIDHOUM, Leila et al. Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens* isolates from agricultural well water in northeastern Algeria with plant growth promoting, insecticidal and antifungal activities. **European journal of soil biology**, v. 75, p. 38-46, 2016.

BIERNE, Hélène; NIELSEN-LEROUX, Christina. Is there a transgenerational inheritance of host resistance against pathogens? Lessons from the *Galleria mellonella*-*Bacillus thuringiensis* interaction model. **Virulence**, v. 8, n. 8, p. 1471-1474, 2017.

BIOSANI. Bio-inseticidas de *Bacillus thuringiensis*. Disponível em: <<https://document.onl/documents/bio-inseticidas-de-bacillus-thu-os-bio-inseticidas-em-p-base-de-bt-so-compostos.html>>. Acesso em: 5 de jan. de 2018.

BOBROWSKI, Vera Lucia et al. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 843-850, 2003.

BOONMEE, Kesorn; THAMMASITTIRONG, Sutticha Na-Ranong; THAMMASITTIRONG, Anon. Molecular characterization of lepidopteran-specific toxin genes in *Bacillus thuringiensis* strains from Thailand. **3 Biotech**, v. 9, n. 4, p. 117, 2019.

BRAVO, Alejandra et al. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

BRAVO, A. et al. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1667, n. 1, p. 38-46, 2004.

BRAVO, Alejandra; GILL, Sarjeet S.; SOBERÓN, Mario. *Bacillus thuringiensis*: Mechanisms and use. In: GILBERT, Lawrence I. **Comprehensive Molecular Insect Science**. Elsevier BV, Amsterdam, v. 6, p. 175-206, 2005.

BRAVO, Alejandra; GILL, Sarjeet S.; SOBERON, Mario. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRAVO, Alejandra; SOBERÓN, Mario. How to cope with insect resistance to Bt toxins?. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 573-579, 2008.

BRAVO, Alejandra et al. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011.

- BRAVO, Alejandra et al. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 17-26, 2013.
- BRODERICK, Nichole A. et al. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 1, p. 293-300, 2004.
- CACCIA, Silvia et al. Midgut microbiota and host immunocompetence underlie *Bacillus thuringiensis* killing mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 34, p. 9486-9491, 2016.
- CALVO-GARRIDO, Carlos et al. Microbial antagonism toward *Botrytis* bunch rot of grapes in multiple field tests using one *Bacillus ginsengihumi* strain and formulated biological control products. **Frontiers in plant science**, v. 10, 2019.
- CANA ONLINE. Broca gigante se alastra pelos canaviais do centro-sul. 2015. Disponível em: <<http://www.canaonline.com.br/conteudo/broca-gigante-se-alastra-pelos-canaviais-do-centro-sul.html#.V4JV2EvBFQs>>. Acesso em: 10 de jul. de 2016.
- CANUTO, Débora Maria Ferreira et al. Resistência de diferentes cultivares de cana-de-açúcar a broca gigante sob cultivo orgânico no agreste alagoano. In: **XII REUNIÃO SUL-BRASILEIRA SOBRE PRAGAS DE SOLO**. PRAGAS SOLO-SUL. PIRACICABA-SP: FEALQ, 2011. v. 1. p. 160-162.
- CASTILLO, Hernández FD et al. Biological control of root pathogens by plantgrowth promoting *Bacillus* spp. In: SOLONESKI, S. **Weed and pest control-conventional and new challenges**, p. 79-103, 2013.
- DE CASTRO, Diana L. Martínez et al. Identification of *Bacillus thuringiensis* Cry1AbMod binding-proteins from *Spodoptera frugiperda*. **Peptides**, v. 98, p. 99-105, 2017.
- CHARLES, J.-F.; DE BARJAC, H. Action des cristaux de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* sur l'intestin moyen des larves de *Aedes aegypti* L., en microscopie électronique. In: **Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie**. Elsevier Masson, 1983. p. 197-218.
- CHERIF, Ameer et al. Genomic diversity and relationship of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* by multi-REP-PCR fingerprinting. **Canadian journal of microbiology**, v. 53, n. 3, p. 343-350, 2007.
- CLAUS, Dieter. A standardized Gram staining procedure. 1992. Disponível em: ><http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.537.848&rep=rep1&type=pdf><. Acesso em: 27 de jan. de 2016.
- CONAB. ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE CANA-DE-AÇÚCAR. v. 6 - Safra 2019/20, n.3- Terceiro levantamento, dezembro de 2019. Disponível em: ><https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar><. Acesso em: 12 de jan. de 2020.
- COSTA, Emerson Luís Nunes et al. Artrópodes e bactérias entomopatogênicos. In **Biociência: Ciência e Desenvolvimento**. Edição especial: Ecotoxicologia de *Bacillus thuringiensis*. Ano XI, n.38, p. 4-13, 2010.
- COSTA, Poliene Martins. **Caracterização da comunidade bacteriana associada ao trato intestinal de *Spodoptera frugiperda* provenientes de diferentes dietas**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

- COY, Richard Murphey; HELD, David W.; KLOPPER, Joseph W. Rhizobacterial colonization of bermudagrass by *Bacillus* spp. in a Marvyn loamy sand soil. **Applied Soil Ecology**, v. 141, p. 10-17, 2019.
- CRAVEIRO, Kilvia Inês Chaves. **Evolução *in vitro* e seleção de variantes *cry* para o controle da broca-gigante da cana-de-açúcar**. 2009. XVII, 83 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
- CRAVEIRO, Kilvia IC et al. Variant CryIIa toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer. **Journal of biotechnology**, v. 145, n. 3, p. 215-221, 2010.
- CRICKMORE, Neil. et al. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. 2018. Disponível em: >http://www.lifesci.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt<. Acesso em: 17 de jan. de 2018.
- DAI, Shu-mei; GILL, Sarjeet S. *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 23, n. 2, p. 273-283, 1993.
- DAVID, Aditi et al. Coproduction of protease and mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11 in solid state fermentation and their combined application as detergent additives. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 1176-1184, 2018.
- DILLON, Rod J.; DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. **Annual Reviews in Entomology**, v. 49, n. 1, p. 71-92, 2004.
- DÖBEREINER, Johanna; BALDANI, Vera Lúcia Divan; BALDANI, José Ivo. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Embrapa-CNPAB, 60p, 1995.
- DOLEY, Prabhali; JHA, Dhruva Kumar. Antimicrobial activity of bacterial endophytes from medicinal endemic plant *Garcinia lancifolia* Roxb. **Ann. Plant Sci**, v. 4, n. 12, p. 1243-1247, 2016.
- DONG, Zhongmin et al. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (a new role for the apoplast). **Plant Physiology**, v. 105, n. 4, p. 1139-1147, 1994.
- DOSS, Victor A. et al. Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein (*vip3V*) gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli*. **Protein expression and purification**, v. 26, n. 1, p. 82-88, 2002.
- DU, Cheng; NICKERSON, Kenneth W. *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized CryIAc toxin: physiological and pathogenic consequences. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 10, p. 3722-3726, 1996.
- DUBOVSKIY, Ivan M. et al. Immuno-physiological adaptations confer wax moth *Galleria mellonella* resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Virulence**, v. 7, n. 8, p. 860-870, 2016.
- DULMAGE, Howard T. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 15, n. 2, p. 232-239, 1970.
- EDWARDS, David L.; PAYNE, Jewel; SOARES, George G. **Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes**. U.S. Patent n. 5,093,120, 3 mar. 1992.
- ENGEL, Philipp; MORAN, Nancy A. The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 5, p. 699-735, 2013.

ESKI, Ardahan et al. Biodiversity and pathogenicity of bacteria associated with the gut microbiota of beet armyworm, *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Microbial pathogenesis**, v. 121, p. 350-358, 2018.

FEITELSON, Jerald S.; PAYNE, Jewel; KIM, Leo. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Nature Biotechnology**, v. 10, p. 271–275, 1992.

FERNANDEZ-LUNA, Maria Teresa et al. Toxicity of *Bacillus thuringiensis*-Derived Pesticidal Proteins Cry1Ab and Cry1Ba against Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera). **Toxins**, v. 11, n. 3, p. 173, 2019.

FIGUEIRÊDO, MARIA DE F. et al. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a broca gigante da cana-de-açúcar *Castnia licus* (Drury) (Lepidoptera: Castniidae). **Neotropical entomology**, v. 31, n. 3, p. 397-403, 2002.

FIUZA, Lídia M. Mecanismo de Ação de *Bacillus thuringiensis*. In: **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. Edição especial: Ecotoxicologia de *Bacillus thuringiensis***. Ano XI, n.38, 2010. p. 32-35.

FLÓREZ, Laura V. et al. Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 7, p. 904-936, 2015.

FONSECA, Fernando Campos de Assis. Aplicação de estratégias moleculares visando o controle da broca-gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus licus*, Drury 1770) (Lepidoptera: Castniidae). Tese (Doutorado) - Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2013.

FRANCIS, Isolde; HOLSTERS, Marcelle; VEREECKE, Danny. The Gram-positive side of plant–microbe interactions. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2010.

FURUSHITA, Manabu et al. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 9, p. 5336-5342, 2003.

GAHAN, Linda J. et al. An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **PLoS genetics**, v. 6, n. 12, 2010.

GAO, Zhenfeng et al. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. **Biological control**, v. 105, p. 27-39, 2017.

GARCIA, J. F. Manual de identificação de pragas da cana. Campinas - SP. 2013. Disponível em: ><https://www.fmcagricola.com.br/Home/DetalhesColetaneas/30><. Acesso em: 7 de fev. de 2018.

GITAHY, Patrícia de Medeiros. **Seleção e caracterização de uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* com atividade entomopatogênica para a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 135p., 2000.

GITAHY, Patrícia de Medeiros et al. A Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 531-537, 2007.

- GÖKTÜRK, Temel; TOZLU, Göksel. The Effect of Pyrethrum and *Bacillus thuringiensis* Biopesticides on *Diprion pini* L. and *Neodiprion sertifer* (Geoffr.) (Hymenoptera: Diprionidae) Larvae. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 51, n. 3, 2019.
- GÓMEZ, I. et al. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, v. 28, n. 1, p. 169-173, 2007.
- GRAM, Christian. Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. **Fortschritte der Medicin**, v. 2, p. 185-189, 1884.
- GUINEBRETIERE, Marie-Hélène et al. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 851-865, 2008.
- HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. **Controle microbiano de insetos**, v. 2, p. 383-446, 1998.
- HAMMER, Tobin J.; MCMILLAN, W. Owen; FIERER, Noah. Metamorphosis of a butterfly-associated bacterial community. **PloS one**, v. 9, n. 1, 2014.
- HAMMER, Tobin J. et al. Caterpillars lack a resident gut microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 36, p. 9641-9646, 2017.
- HANSEN, Bjarne Munk; SALAMITOU, Sylvie. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: **Entomopathogenic bacteria: From laboratory to field application**. Springer, Dordrecht, p. 41-64, 2000.
- HARVEY, William R. Physiology of V-ATPases. **Journal of Experimental Biology**, v. 172, n. 1, p. 1-17, 1992.
- HELGASON, Erlendur et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 6, p. 2627-2630, 2000.
- HERNANDEZ-MARTINEZ, Patricia et al. Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in *Bt*-resistant *Spodoptera exigua*. **PLoS One**, v. 5, n. 9, 2010.
- HÖFTE, Herman; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.
- HOLLENSTEINER, Jacqueline et al. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus weihenstephanensis* inhibit the growth of phytopathogenic *Verticillium* species. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2171, 2017.
- HOSSAIN, Mohammad Tofajjal; CHUNG, Young Ryun. Endophytic *Bacillus* Species Induce Systemic Resistance to Plant Diseases. In: **Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol**. Springer, Cham, 2019. p. 151-160.
- IBARGUTXI, María A. et al. Use of *Bacillus thuringiensis* toxins for control of the cotton pest *Earias insulana* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 1, p. 437-442, 2006.
- JENSEN, Gert B. et al. The aggregation-mediated conjugation system of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: host range and kinetics of transfer. **Current microbiology**, v. 33, n. 4, p. 228-236, 1996.

- KARTHIK, M. et al. Endophytic bacteria associated with banana cultivars and their inoculation effect on plant growth. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 92, n. 6, p. 568-576, 2017.
- KEITA, Mamadou Bhoie et al. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Bacillus massiliogorillae* sp. nov. **Standards in genomic sciences**, v. 9, n. 1, p. 93, 2013.
- KIKUCHI, Yoshitomo et al. Symbiont-mediated insecticide resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 22, p. 8618-8622, 2012.
- KIM, Leo. *Advanced Engineered Pesticides: Technology and Engineering*. New York: Marcel Dekker Inc., 448 p, 1993.
- KNOWLES, Barbara H.; ELLAR, David J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 924, n. 3, p. 509-518, 1987.
- KNOWLES, Barbara H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *In: Advances in insect physiology*. Academic Press, 1994. p. 275-308.
- KOCH, Michael S. et al. The food and environmental safety of *Bt* crops. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 283, 2015.
- KOLSTØ, Anne-Brit; TOURASSE, Nicolas J.; ØKSTAD, Ole Andreas. What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species?. **Annual review of microbiology**, v. 63, p. 451-476, 2009.
- KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.
- LANNA-FILHO, Roberto; SOUZA, Ricardo M.; ALVES, Eduardo. Induced resistance in tomato plants promoted by two endophytic bacilli against bacterial speck. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 2, p. 96-108, 2017.
- LATEEF, Agbaje; ADELERE, Isiaka Adedayo; GUEGUIM-KANA, Evariste Bosco. The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis*. **Biologia**, v. 70, n. 4, p. 411-419, 2015.
- LECADET, M.-M. et al. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 4, p. 660-672, 1999.
- LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. *In: ENWISTLE, P. F., CORY, J. S., BAILEY, M. J., HIGGS, S. Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. John Wiley & Sons, New York, p. 37-69, 1993.
- LERECLUS, D. et al. Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. **International journal of medical microbiology**, v. 290, n. 4-5, p. 295-299, 2000.
- LEUCONA, Roberto Eduardo. Técnicas empleadas con hongos entomopatógenos, p. 143-157. *In: Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*. Buenos Aires, 1996. p.143-157.
- LIU, Yang et al. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2015.

- LIU, Yang et al. *Bacillus zhangzhouensis* sp. nov. and *Bacillus australimaris* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1193-1199, 2016.
- LIU, Di et al. Promotion of iron nutrition and growth on peanut by *Paenibacillus illinoisensis* and *Bacillus* sp. strains in calcareous soil. **Brazilian journal of microbiology**, v. 48, n. 4, p. 656-670, 2017.
- LODEWYCKX, Cindy et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical reviews in plant sciences**, v. 21, n. 6, p. 583-606, 2002.
- LOGAN, Niall A., VOS, Paul. Genus I. *Bacillus* Cohn 1872. In: VOS, Paul et al. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes**. Springer Science & Business Media, 2011. p. 21-127.
- LUPSKI, James R.; WEINSTOCK, GEORGE M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 14, p. 4525, 1992.
- LÜTHY, Peter; WOLFERSBERGER, Michael G. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxins. In: **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Springer, Dordrecht, 2000. p. 167-180.
- DE MAAGD, Ruud A.; BRAVO, Alejandra; CRICKMORE, Neil. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **TRENDS in Genetics**, v. 17, n. 4, p. 193-199, 2001.
- DE MAAGD, Ruud A. et al. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual review of genetics**, v. 37, 2003.
- MADIGAN, Michael T. et al. Evolução e Sistemática Microbianas. In: **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016. p. 347-378.
- MAGNANI, G. S. et al. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genet Mol Res**, v. 9, n. 1, p. 250-258, 2010.
- MAKART, Lionel et al. Horizontal transfer of chromosomal markers mediated by the large conjugative plasmid pXO16 from *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*. **Plasmid**, v. 91, p. 76-81, 2017.
- MARTÍNEZ-ZAVALA, Sheila A. et al. Chitinases of *Bacillus thuringiensis*: Phylogeny, Modular Structure, and Applied Potentials. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 3032, 2020.
- MELATTI, V. M. et al. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains toxic against cotton aphid, *Aphis gossypii* glover (Hemiptera: Aphididae). **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2010.
- MELO, L.H.V.; et al. Evaluation of the endophytic colonization ability of *Bacillus thuringiensis* in sugarcane plants. In: 3º Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2010, Fortaleza. v. 1.
- MENDONÇA, A. F. A broca gigante *Castnia licus* Drury, 1770 [sic] (Lepidoptera: Castniidae) no Brasil. **Saccharum, São Paulo**, v. 5, n. 20, p. 53-60, 1982.
- MENDONÇA, A. F.; VIVEIROS, A. J. A.; SAMPAIO, F. F. A broca gigante da cana-de-açúcar, *Castnia licus* Drury, 1770 (Lep.: Castniidae). **Pragas da cana-de-açúcar. Insetos & Cia, Maceió**, p. 133-167, 1996.

MILANO, Heloíze de Souza. **Identificação de microrganismos do trato digestivo de pragas de cana-de-açúcar com atividade enzimática para degradação de substratos lignocelulósicos e potencial para bioconversão de D-xilose em xilitol**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 112p. 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA) Mercado de biodefensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano. 2019. Disponível em: ><http://www.agricultura.gov.br/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil><. Acesso em: 05 de jan. de 2020.

MONNERAT, Rose Gomes; BRAVO, Alejandra. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. **Controle Biológico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, v. 3, p. 163-200, 2000.

MONNERAT, Rose et al. **Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.

MONNERAT, Rose Gomes, PRAÇA, Lílian Botelho. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. In: OLIVEIRA-FILHO, Eduardo Cyrino; MONNERAT, Rose Gomes. **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Embrapa Cerrados, 2006.

MONNERAT, Rose Gomes et al. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* living inside of plants. **Microbial biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 512-520, 2009.

MORAES, Simeão S.; DUARTE, Marcelo. Morfologia externa comparada das três espécies do complexo *Telchin licus* (Drury) (Lepidoptera, Castniidae) com uma sinonímia. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 2, p. 245-265, 2009.

MUÑOZ-GARAY, Carlos et al. Characterization of the mechanism of action of the genetically modified Cry1AbMod toxin that is active against Cry1Ab-resistant insects. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1788, n. 10, p. 2229-2237, 2009.

MUSHTAQ, Rubina et al. Activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ie2, Cry2Ac7, Vip3Aa11 and Cry7Ab3 proteins against *Anticarsia gemmatalis*, *Chrysodeixis includens* and *Ceratoma trifurcata*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 150, p. 70-72, 2017.

NEGRISOLI JUNIOR, A. S. et al. Manejo da broca-gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus*) (Drury) (Lepidoptera: Castniidae) no nordeste do Brasil. **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Documentos (INFOTECA-E)**, 2015.

NIKOLIĆ, Ivan et al. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* on sugar beet with *Bacillus pumilus* SS-10.7 and *Bacillus amyloliquefaciens* (SS-12.6 and SS-38.4) strains. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 1, p. 165-176, 2019.

NISHITSUTSUJI-UWO, Junko; OHSAWA, Ayako; NISHIMURA, Masaji S. Factors affecting the insecticidal activity of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 29, n. 2, p. 162-169, 1977.

NOVA CANA. A produção de cana-de-açúcar no Brasil (e no mundo). 2008. Disponível em: ><https://www.novacana.com/cana/producao-cana-de-acucar-brasil-e-mundo/><. Acesso em: 20 de jun. de 2016.

NOVA CANA. Açúcar: Exportação. 2019. Disponível em: ><https://www.novacana.com/n/acucar/exportacao/brasil-deve-registrar-menor-exportacao-acucar-decada-2019-031219><. Acesso em: 7 de jan. de 2020.

- NOVA CANA. Açúcar: Exportação. 2019. Disponível em: ><https://www.novacana.com/n/etanol/mercado/exportacao/exportacao-brasileira-etanol-sobe-23-novembro-181-06-milhoes-litros-031219><. Acesso em: 7 de jan. de 2020.
- OHBA, Michio; MIZUKI, Eiichi; UEMORI, Akiko. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. **Anticancer research**, v. 29, n. 1, p. 427-433, 2009.
- OKUMURA, S. et al. Parasporin nomenclature. 2010. Disponível em ><http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/><. Acesso em: 13 de jan. de 2018.
- ORFANÓ, Alessandra da Silva et al. **Avaliação do papel da microbiota intestinal do *Aedes aegypti* no desenvolvimento esporogônico do *Plasmodium gallinaceum***. Dissertação de Mestrado, 62p., 2012.
- OROZCO-FLORES, Alonso A. et al. Regulation by gut bacteria of immune response, *Bacillus thuringiensis* susceptibility and hemolin expression in *Plodia interpunctella*. **Journal of insect physiology**, v. 98, p. 275-283, 2017.
- PALAZZINI, Juan et al. Biocontrol of *Fusarium graminearum* sensu stricto, reduction of deoxynivalenol accumulation and phytohormone induction by two selected antagonists. **Toxins**, v. 10, n. 2, p. 88, 2018.
- PALMA, Leopoldo et al. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3296-3325, 2014.
- PANIAGUA VOIROL, Luis R. et al. Bacterial symbionts in Lepidoptera: Their diversity, transmission, and impact on the host. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 556, 2018.
- PARAMASIVA, Inakarla; SHARMA, Hari C.; KRISHNAYYA, Pulipaka Venkata. Antibiotics influence the toxicity of the delta endotoxins of *Bacillus thuringiensis* towards the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 200, 2014.
- PARDO-LOPEZ, Liliana; SOBERON, Mario; BRAVO, Alejandra. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 1, p. 3-22, 2013.
- PARKER, Michael W.; FEIL, Susanne C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 88, n. 1, p. 91-142, 2005.
- PARRA, J. R. P.; MIHSFELDT, L. H. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. **Advances in insect rearing for research and pest management**, p. 195-209, 1992.
- PARRA, José Roberto Postali. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Editora Manole Ltda, São Paulo, 6 ed., 635p., 2002.
- PÉREZ, V. J. Genética y Biología Molecular de *Bacillus thuringiensis*. In: BRAVO, A., CERON, J. ***Bacillus thuringiensis* en el control biológico**. Bogotá: Colômbia, p. 207-232, 2004.
- PINTO, Laura M. N. et al. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. In: **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. Edição especial: Ecotoxicologia de *Bacillus thuringiensis***. Ano XI, n.38, 2010. p. 24-31.
- POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociencia-Sitio en Reparación**, v. 7, n. 2, p. 1-9, 2003.

- PORTUGAL, Leivi et al. Toxicity of Cry1A toxins from *Bacillus thuringiensis* to CF1 cells does not involve activation of adenylate cyclase/PKA signaling pathway. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 80, p. 21-31, 2017.
- PRAÇA, Lilian Botelho et al. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 11-16, 2004.
- PRAÇA, L. B. et al. *Bacillus thuringiensis* Berliner (EUBACTERIALES: BACILLACEAE): aspectos gerais, modo de ação e utilização. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- Documentos (INFOTECA-E)**, 2007.
- QUECINE, Maria Carolina et al. Control of *Diatraea saccharalis* by the endophytic *Pantoea agglomerans* 33.1 expressing cry1Ac7. **Archives of microbiology**, v. 196, n. 4, p. 227-234, 2014.
- RAYMOND, Ben et al. A mid-gut microbiota is not required for the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* to diamondback moth larvae. **Environmental microbiology**, v. 11, n. 10, p. 2556-2563, 2009.
- RAYMOND, Ben et al. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen?. **Trends in microbiology**, v. 18, n. 5, p. 189-194, 2010.
- REYES-RAMIREZ, Arturo; IBARRA, Jorge E. Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR analysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 3, p. 1346-1355, 2005.
- RICIETO, Ana Paula Scaramal et al. Effect of vegetation on the presence and genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil. **Canadian journal of microbiology**, v. 59, n. 1, p. 28-33, 2013.
- RICIETTO, Ana Paula Scaramal et al. Susceptibility of *Grapholita molesta* (Busck, 1916) to formulations of *Bacillus thuringiensis*, individual toxins and their mixtures. **Journal of invertebrate pathology**, v. 141, p. 1-5, 2016.
- ROCHA, Francine Yuriko Otsuka et al. Taxonomical and functional characterization of *Bacillus* strains isolated from tomato plants and their biocontrol activity against races 1, 2 and 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. **Applied soil ecology**, v. 120, p. 8-19, 2017.
- ROSSETTO, R., SANTIAGO, A. D. Pragas no colmo. 2013. Disponível em: >http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_131_272200817517.html<. Acesso em: 20 de jun. de 2016.
- SAEED, Shafqat; SAYYED, Ali H.; AHMAD, Ijaz. Effect of host plants on life-history traits of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pest Science**, v. 83, n. 2, p. 165-172, 2010.
- SALEM, Hassan et al. An out-of-body experience: the extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1804, p. 20142957, 2015.
- SANAHUJA, Georgina et al. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant biotechnology journal**, v. 9, n. 3, p. 283-300, 2011.
- SHELLENBERGER, Ute et al. A selective insecticidal protein from *Pseudomonas* for controlling corn rootworms. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 634-637, 2016.

SCHNEPF, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

SHABBIR, Muhammad Zeeshan et al. Characterization of the Cry1Ah resistance in Asian corn borer and its cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* toxins. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.

SHAHZAD, Raheem et al. Plant growth-promoting endophytic bacteria versus pathogenic infections: an example of *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici in tomato. **PeerJ**, v. 5, p. e3107, 2017.

SHAO, Yongqi et al. Symbiont-derived antimicrobials contribute to the control of the Lepidopteran gut microbiota. **Cell chemical biology**, v. 24, n. 1, p. 66-75, 2017.

SCHULTZ, N.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. Resposta da cana-de-açúcar à adubação nitrogenada: fontes nitrogenadas, formas de aplicação, épocas de aplicação e efeito varietal. **Embrapa Agrobiologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2015.

SINGH, Poonam C. et al. Biological Control of *Fusarium* sp. NBRI-PMSF12 Pathogenic to Cultivated Betelvine by *Bacillus* sp. NBRI-W9, a Potential Biological Control Agent. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 36, n. 1, p. 106-117, 2017.

DA SILVA, S. Ferreira; DIAS, JMC de S.; MONNERAT, R. G. Comparação entre três métodos de isolamento de bacilos entomopatogênicos. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2002.

SOBERON, M.; GILL, S. S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells?. **Cellular and molecular life sciences**, v. 66, n. 8, p. 1337-1349, 2009.

DE SOUZA, M. Teixeira; LECADET, M. M.; LERECLUS, D. Full expression of the cryIIIA toxin gene of *Bacillus thuringiensis* requires a distant upstream DNA sequence affecting transcription. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 10, p. 2952-2960, 1993.

SOUZA, Suzane A. et al. Endophytic bacterial diversity in banana'Prata Anã'(Musa spp.) roots. **Genetics and molecular biology**, v. 36, n. 2, p. 252-264, 2013.

SUBBANNA, A. R. N. S., KHAN, M. S., SHIVASHANKARA, H. Characterization of antifungal *Paenibacillus illinoisensis* strain UKCH21 and its chitinolytic properties. **African Journal of Microbiology Research**, 10 (34), p. 1380-1387, 2016.

SUMAN, Archana; YADAV, Ajar Nath; VERMA, Priyanka. Endophytic microbes in crops: diversity and beneficial impact for sustainable agriculture. *In: Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity*. Springer, New Delhi, 2016. p. 117-143.

TEJERA-HERNÁNDEZ, Berto; ROJAS-BADÍA, Marcia M.; HEYDRICH-PÉREZ, Mayra. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. **Revista CENIC. Ciencias Biológicas**, v. 42, n. 3, p. 131-138, 2011.

THAMMASITTIRONG, Anon; ATTATHOM, Tipvadee. PCR-based method for the detection of cry genes in local isolates of *Bacillus thuringiensis* from Thailand. **Journal of invertebrate pathology**, v. 98, n. 2, p. 121-126, 2008.

- THOMAS, Wendy E.; ELLAR, David J. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. **Journal of Cell Science**, v. 60, n. 1, p. 181-197, 1983.
- THORSEN, Line et al. Characteristics and phylogeny of *Bacillus cereus* strains isolated from Maari, a traditional West African food condiment. **International journal of food microbiology**, v. 196, p. 70-78, 2015.
- TINDALL, Brian J. et al. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 60, n. 1, p. 249-266, 2010.
- TORRES-QUINTERO, Mary-Carmen et al. Engineering *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxin specificity from dipteran to lepidopteran toxicity. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.
- VAN DEN BOSCH, Tijds J.M.; WELTE, Cornelia U. Detoxifying symbionts in agriculturally important pest insects. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 531-540, 2017.
- VELÁZQUEZ, Encarna et al. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be found in the apoplastic sap of the medullary parenchyma of the stem of healthy sugarcane plants. **Journal of basic microbiology**, v. 48, n. 2, p. 118-124, 2008.
- VERSALOVIC, James et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in molecular and cellular biology**, v. 5, n. 1, p. 25-40, 1994.
- VIVEIROS, A. J. A. (1989). Efeito do dano da broca gigante, *Castnia licus* Drury, 1770 (Lepidoptera, Castniidae) sobre algumas características agroindustriais da cana-de-açúcar no estado de Alagoas, Brasil. 93f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1989.
- WADT, Lucila. **Comportamento reprodutivo da broca gigante da cana-de-açúcar, *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae), como base para seu controle.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 77p. 2012.
- WANG, Rong-Fu; CAO, Wei-Wen; CERNIGLIA, Carl E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium prausnitzii* based upon the 16S rRNA gene sequence and PCR confirmation. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 341-343, 1996.
- WANG, Jinhong et al. Characterization of cry1, cry2, and cry9 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, n. 1, p. 63-71, 2003.
- WANG, Kui et al. Systematic characterization of *Bacillus* genetic stock center *Bacillus thuringiensis* strains using multi-locus sequence typing. **Journal of invertebrate pathology**, v. 155, p. 5-13, 2018.
- WANG, Zhen et al. Diversity of sugarcane root-associated endophytic *Bacillus* and their activities in enhancing plant growth. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 3, p. 814-827, 2020.
- WEI, Shuai et al. Differentiation of *Bacillus thuringiensis* from *Bacillus cereus* group using unique marker based on real-time PCR. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 883, 2019.

- WEISER, J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in the Soviet Union. In: KRIEG, A., HUGER, A. M. **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt fuer Land-und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem (Germany, FR)**, v. 233, p. 37-50, 1986.
- WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. Ernest. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 549-576, 1986.
- WOLFERSBERGER, MICHAEL G. V-ATPase-energized epithelia and biological insect control. **Journal of experimental biology**, v. 172, n. 1, p. 377-386, 1992.
- WHO. International programme on chemical safety (IPCS): microbial pest control agent *Bacillus thuringiensis*. **Environmental Health Criteria**, v. 217, p. 1-105, 1999.
- XIA, Xiaofeng et al. Metagenomic sequencing of diamondback moth gut microbiome unveils key holobiont adaptations for herbivory. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 663, 2017.
- XU, Zhenshang et al. *Paenibacillus panacisoli* enhances growth of *Lactobacillus* spp. by producing xylooligosaccharides in corn stover ensilages. **Carbohydrate polymers**, v. 184, p. 435-444, 2018.
- ZHANG, Xuebin et al. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 26, p. 9897-9902, 2006.
- ZHOU, Zishan et al. Insecticidal specificity of Cry1Ah to *Helicoverpa armigera* is determined by binding of APN1 via domain II loops 2 and 3. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 83, n. 4, p. e02864-16, 2017.
- ZORZETTI, Janaina et al. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains active against *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera, Pyralidae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 39, n. 4, p. 417-425, 2017.

12 ANEXOS

Anexo A – Solução salina (BALDANI, 1980)

Componentes: Quantidade para 1000mL

1mL K_2HPO_4 sol.10%

0,5mL $MgSO_4$ sol.10%

0,2mL $NaCl$ sol.10%

0,5mL $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ sol.1%

1mL $FeEDTA$ sol.1,64%

0,5mL de sol. de micronutrientes para meio de cultura

500mL de água destilada

Misturar todos os componentes e ajustar o pH para 6,5 utilizando ácido sulfúrico 5%.
Após o ajuste do pH, avolumar a solução para 1000mL com água destilada.

Anexo B – Preparo de Meio HCT para esporulação de *Bacillus thuringiensis* (MUÑOZ-GARAY et al., 2009)

Componentes: Quantidade para 250mL

Bactotripton - 1,25g
Casoaminoacido - 0,5g
Solução I - 12,5ml
Solução II - 0,25ml
Solução III - 2,5ml
Solução IV - 2,5ml
Glicose 10% - 7,5ml
Água destilada - 223,93ml

- 1) Pesar e dissolver bactotripton e casoaminoacido.
- 2) Ajustar pH para 7,25 com KOH (Para 250 ml adicionar mais ou menos 150 µl KOH 2M).
- 3) Meio sólido – adicionar 15 g de ágar por litro.
- 4) Autoclavar.
- 5) Filtrar as soluções I, II, III, IV e glicose com milipore e adicionar ao meio autoclavado. Caso seja necessário, adicionar antibiótico neste momento.

Solução I

6,8g de KH_2PO_4
Completar volume para 100ml com água destilada

Solução II

1,23g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,0169g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0,19g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Completar volume para 100ml com água destilada

Solução III

0,2g de $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
10ml de H_2SO_4 (estoque 1N)
Completar volume para 100ml com água destilada

Solução IV

1,47g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Completar volume para 100ml com água destilada

Glicose 10%

10g de glicose
Completar volume para 100ml com água destilada

Anexo C – Dieta artificial para criação de *D. saccharalis* (PARRA & MISHFELDT, 1992)

Componentes da dieta:

42g de germe de trigo

45g de levedura

168g de farinha de milho

6g de ácido ascórbico

3 g de ácido benzoico

2,4g de metil parahidroxibenzoato (nipagin)

30g de ágar

1400mL de água destilada

Para o preparo da dieta, os componentes foram misturados no liquidificador e a dieta foi autoclavada. Assim que a dieta saiu da autoclave cerca de 20mL foi vertida em tubos de vidro com fundo chato (8cm de altura x 2cm de diâmetro) e estes foram postos inclinados para secar sob incidência da luz ultravioleta por 20 minutos. Após a secagem os tubos contendo a dieta foram utilizados nos bioensaios.