

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Prospecção de isolados de *Chromobacterium* spp. para controle de
Dalbulus maidis (Hemiptera: Cicadellidae)**

Luiz Felipe Zumpano

Trabalho de conclusão de curso apresentado como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo

Piracicaba
Ano 2024

Luiz Felipe Zumpano

Prospecção de isolados de *Chromobacterium* spp. para controle de *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae)

Orientador:

Prof. Dr. ITALO DELALIBERA JÚNIOR

Coorientadora:

Dr^a. NATASHA SANT'ANNA IWANICKI

Trabalho de conclusão de curso apresentado como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo

Piracicaba

Ano 2024

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de estar realizando este projeto com conhecimento, saúde e capacitação para tal.

A minha mãe e pai pelo esforço, amor e dedicação para a minha formação.

A minha noiva Danielly Nathalia Ferreira pelo amor, incentivo, ajuda e apoio durante esse tempo, bem como toda a sua família.

A minha irmã, Gabriela Constantino Zumpano, e meu cunhado, Eliel Constantino, que muito me ajudaram para a conclusão do curso.

A Pós Doutoranda Natasha Sant'Anna Iwanicki que desde 2022 muito me ajudou e orientou nos projetos desenvolvidos no laboratório, dando total suporte, apoio e aconselhamentos para meu desenvolvimento pessoal, acadêmico e profissional.

Ao Professor Dr. Italo Delalibera Junior pela oportunidade e incentivo no desenvolvimento dos projetos desde 2022, bem como por sua orientação durante todo esse tempo.

A doutora Aline Wasem Zanotto que me orientou durante todo o processo de desenvolvimento do presente projeto, bem como toda a sua equipe (Renan Murbach Pereira, Raquel Giselli Assis do Rosário e Laura Setten Correa).

Aos meus amigos do laboratório: Leonardo Fernandes Veloso, Laryssa Marinho Gomes, Daniela Milanez Silva, Eliane Christina Mota Lopes, Taís Cabrera Reque, Daniel de Macedo Martins, Isabella Carolina da Rocha Pires que me ajudaram de muitas maneiras e sempre estiveram dispostos a ajudar no que foi necessário.

Ao pessoal da República CEU que sempre estiveram comigo durante a graduação;

Ao pessoal da República Avarandado por todos os conselhos, auxílios e incentivo para meu desenvolvimento pessoal e profissional durante minha graduação.

A todo o laboratório de Patologia e Controle Microbiano pela ajuda e oportunidade durante esse tempo.

Ao GMIP (Grupo de Pesquisa e Extensão em Manejo Integrado de Pragas) que sempre me auxiliou em formações sobre os diferentes temas sobre entomologia.

Aos meus amigos que por vezes me ajudaram em alguma tarefa do TCC: Gustavo de Ângelo Luca, João Vitor Mendes Ferraz de Toledo, Otávio César Martins Ferreira.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" pelas oportunidades oferecidas durante a minha graduação.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Objetivos gerais	8
1.2 Objetivos específicos	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 Histórico mundial de <i>Chromobacterium</i>	9
2.2 Importância da origem e condição geográfica dos isolados	10
2.2.1 <i>Chromobacterium subtsugae</i>	10
2.2.2 <i>Chromobacterium amazonens</i>	12
2.2.3 <i>Chromobacterium sphagni</i>	12
2.2.4 <i>Chromobacterium paludis</i>	14
2.2.5 <i>Chromobacterium alticapitis</i>	14
2.3 Cigarrinha do milho: <i>Dalbulus maidis</i>	15
2.3.1 <i>Dalbulus maidis</i> : origem, associação com milho e distribuição geográfica	16
2.3.2 Características biológicas	17
2.4 Estratégias de manejo e táticas de controle	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Seleção de isolados	23
3.2 Produção das bactérias	23
3.3 Preparo das suspensões de células e obtenção do filtrado	26
3.4 Cultivo dos milhos para bioensaio	28
3.5 Criação de <i>Dalbulus maidis</i>	29
3.6 Bioensaios com insetos	30
3.7 Bioensaios de doses	32
3.8 Análise estatística	32
4 RESULTADOS	33
4.1 Ensaios de dose para 6200	38
4.2 Pigmentação da <i>Dalbulus maidis</i>	40
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	47
ANEXOS	54

RESUMO

Prospecção de isolados de *Chromobacterium* spp. para controle de *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae)

O mercado de bioprodutos para o controle de pragas agrícolas tem crescido significativamente no Brasil, impulsionado pela vasta biodiversidade do país e pelo potencial de exploração de micro-organismos para fins de controle biológico. Este trabalho investiga a eficácia de isolados de *Chromobacterium* spp. no controle da cigarrinha-do-milho (*Dalbulus maidis*), uma praga de grande impacto na cultura do milho. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano da ESALQ/USP e se concentrou em cinco isolados: *Chromobacterium amazonense* 6197, *Chromobacterium sphagni* 6198, *Chromobacterium subtsugae* 6199, *Chromobacterium paludis* 6200e *Chromobacterium alticaptis* 6201. Inicialmente, os isolados foram ativados e cultivados em meio TSA e fermentados em meio ESALQ adaptado. Em um primeiro conjunto experimental foi avaliado o potencial dos cinco isolados de *Chromobacterium* no controle da cigarrinha-do-milho. Em um segundo conjunto de experimentos foi selecionado um isolado (6200) e feito um estudo de dose resposta com metabólitos e células. Três estratégias de processamento do caldo fermentado foram utilizadas como tratamento para os bioensaios: caldo contendo células vivas e metabólitos (B+M), suspensão apenas de bactérias (B) e o caldo fermentado filtrado sem células contendo metabólitos (M). Em seguida, foram realizados bioensaios com cigarrinhas-do-milho em plantas de milho, avaliando a mortalidade dos insetos a cada dois dias ao longo de 9 dias. O isolado *C. paludis* 6200apresentou os melhores resultados, alcançando mortalidades médias de 78,7% no tratamento com células e metabólitos e 72,9% para tratamentos com apenas metabólitos. Os resultados mostraram que os metabólitos de *Chromobacterium* spp. possuem um potencial inseticida, com uma rápida taxa de mortalidade observada nos primeiros seis dias após a aplicação. Além disso, o tratamento à base de metabólitos de *C. paludis* em concentração de 1% foi eficaz no controle do inseto resultando em mortalidade média de 67%. Esta pesquisa foi a primeira a demonstrar o potencial de células e/ou caldo fermentado filtrado de diferentes espécies de *Chromobacterium* em controlar a cigarrinha-do-milho além de destacar a necessidade de mais estudos para elucidar o mecanismo de ação pelo qual esse grupo de bactéria atua na mortalidade dos insetos.

Palavras-chave: Controle microbiológico, metabólitos, bioinsumos, bactérias

ABSTRACT

Prospection of *Chromobacterium* spp. Isolates for Control of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae)

The market for bioproducts for agricultural pest control has grown significantly in Brazil, driven by the country's vast biodiversity and the potential for exploiting microorganisms for biological control purposes. This work investigates the efficacy of *Chromobacterium* spp. isolates in controlling the corn leafhopper (*Dalbulus maidis*), a pest with a major impact on corn crops. The research was conducted at the Laboratory of Pathology and Microbial Control at ESALQ/USP and focused on five isolates: *Chromobacterium amazonense* 6197, *Chromobacterium sphagni* 6198, *Chromobacterium subtsugae* 6199, *Chromobacterium paludis* 6200, and *Chromobacterium alticaptis* 6201. Initially, the isolates were activated and cultured in TSA medium and fermented in an adapted ESALQ. In a first set of experiments, the potential of the five *Chromobacterium* isolates to control the corn leafhopper was evaluated. In a second set of experiments, one isolate (6200) was selected, and a dose-response study with metabolites and cells was conducted. Three fermentation broth processing strategies were used as treatment for the bioassays: broth containing live cells and metabolites (B+M), bacteria suspension only (B), and filtered fermented broth without cells containing metabolites (M). Subsequently, bioassays were conducted with corn leafhoppers on corn plants, evaluating insect mortality every two days over a period of 9 days. The *C. paludis* 6200 isolate showed the best results, achieving average mortalities of 78.7% in the treatment with cells and metabolites and 72.9% for treatments with metabolites only. The results demonstrated that the metabolites of *Chromobacterium* spp. possess insecticidal potential, with a rapid mortality rate observed in the first six days after application. Additionally, the metabolite-based treatment of *C. paludis* at a concentration of 1% was effective in controlling the insect, resulting in an average mortality of 67%. This research was the first to demonstrate the potential of cells and/or filtered fermentation broth from different *Chromobacterium* species in controlling the corn leafhopper, besides highlighting the need for further studies to elucidate the mechanism of action by which this group of bacteria causes insect mortality.

Keywords: Microbial control, metabolites, bioproducts, innovation

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o mercado de bioprodutos para o controle de pragas agrícolas vem crescendo de forma expressiva nos últimos anos (VERO et al., 2023). Além disso, o Brasil é considerado o maior celeiro de biodiversidade; logo, o potencial para a exploração racional de micro-organismos para fins de controle biológico é inestimável, abrindo grandes oportunidades de pesquisa em bioprospecção e biotecnologia, exercendo um papel economicamente importante na vida do homem (FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020).

Micro-organismo, como fungos e bactérias atualmente compõem a maioria dos bioinseticidas, bionematicidas e bioinoculantes disponíveis no mercado. Contudo, são poucas as opções de produtos à base de bactérias não esporulantes para o controle de pragas (FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020).

Em 2007, Martin e colaboradores isolaram uma bactéria pigmentada de roxo de um solo florestal em Maryland -USA. Na triagem inicial, descobriram que esta bactéria apresentava toxicidade para o besouro da batata do Colorado e outros insetos. A bactéria foi identificada como uma nova espécie, a *Chromobacterium subtsugae* (MARTIN et al., 2007a).

Estudos laboratoriais demonstram que a bactéria *C. subtsugae* provocou um percentual de mortalidade de 80 a 100% em insetos adultos de *Diabrotica undecimpunctata* e *Diabrotica virgifera*, e em larvas de *Leptinotarsa decemlineata*, pragas de culturas de pepino, soja, amendoim e batata. Além disso, o inseto *Nezara viridula* praga da cultura de algodão mostrou-se susceptível a bactéria que ocasionou 100% de letalidade (KOIVUNEN et al., 2009). *Chromobacterium* é um gênero de beta-proteobactéria, gram-negativa facultativamente aeróbica, móvel, com flagelos polares. As colônias são formadas de 2 a 3 dias em ágar TSA a 28 °C sendo inicialmente de cor creme, gradualmente transformando-se em violeta escuro após 24 horas de crescimento. As colônias crescem bem em meios à base de peptona, pH 6,5-8,0 e com 0-1,5% de NaCl (MARTIN et al., 2007a).

Embora taxa de mortalidade de insetos seja alta, o mecanismo de infecção de linhagens de *Chromobacterium* não é totalmente esclarecido, podendo apresentar vários efeitos em insetos como toxicidade oral, repelência, redução da fecundidade em fêmeas e oviposição (WEE, 2020) e, inibição da alimentação (GOLEC et al., 2020).

A cigarrinha-do-milho (*Dalbulus maidis*) é um inseto vetor de mollicutes causadores das doenças enfezamento pálido e vermelho, sendo hoje a principal praga da cultura do milho. Atualmente vários inseticidas químicos não estão performando satisfatoriamente para o controle dessas pragas e métodos alternativos, assim como o desenvolvimento de um novo manejo, são necessários.

Estudos realizados no laboratório de Patologia e Controle Microbiano do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP com bactérias do gênero *Chromobacterium* demonstraram grande potencial para controle de insetos sugadores. Esses estudos serviram como premissas para este projeto de pesquisa.

A atividade inseticida vem sendo considerada de amplo espectro, devido aos possíveis múltiplos modos de ação que envolverem todos os metabólitos sintetizados pela bactéria. Apesar de avanços na sua utilização, são escassas as informações acerca de sua patogenicidade e mecanismo de ação.

1.1 Objetivos gerais

Investigar a eficácia e os mecanismos de ação de isolados de *Chromobacterium* spp e seus metabólitos no controle de adultos de cigarrinha-do-milho, visando a potencial aplicação no manejo biológico dessa praga.

1.2 Objetivos específicos

- Estudar a virulência de cinco isolados de *Chromobacterium* contra adultos de cigarrinha-do-milho, analisando a mortalidade da praga ao longo do tempo.
- Construir uma curva de doses para elucidar as melhores concentrações de bactérias e metabólito para o controle mais rápido de 50% da população de *D. Maidis*

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico mundial de *Chromobacterium*

No ano de 1880, Bergonzini, no curso de suas investigações sobre o mecanismo de retardo da putrefação, preparou diversas soluções de albumina de ovo (PITLOVANCIV, 2005). Em um lapso, uma das soluções destinadas ao controle foi inadvertidamente deixada no laboratório, resultando, posteriormente, mediante a evaporação e redução do volume, em uma solução caracterizada por um filme violeta de densidade considerável. Inicialmente cogitou-se tratar-se de *Cromococcus violaceus*, a única bactéria conhecida por apresentar coloração violeta. Entretanto, Bergonzini identificou que se tratava de uma espécie bacteriana distinta. Após conduzir experimentos adicionais, o pesquisador italiano denominou-a como *Cromobacterium violaceum*, e formalizou sua descoberta em um artigo intitulado "*Sobre uma nova bactéria colorida*" (BERGONZINI, 1882; ANTUNES, 2006).

Ainda no século XIX (em 1882), foi publicado um importante artigo abordando a presença de uma cor violeta em substrato à base de arroz, o qual descreve as características a um "pequeno organismo" (BOISBAUDRAN, 1882). Posteriormente, De Moss aprofundou seus estudos sobre o "pequeno organismo" e seu pigmento relatado por Boisbaudran, atribuindo tais elementos a *C violaceum* e violaceína, respectivamente (DEMOSS, 1967).

Nos anos 2000, o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) selecionou a bactéria *Chromobacterium violaceum*, para ter o seu genoma completamente sequenciado, sendo devido ao seu potencial relacionado a biotecnologia, sendo finalizado o seu sequenciamento em 2002 (MARQUES, 2002).

No contexto brasileiro, a notificação de *Chromobacterium violaceum* ocorreu aproximadamente cem anos após sua inicial descrição. Em abril de 1976, foi realizada uma análise bacteriológica em amostras de água nas proximidades da estação de tratamento de água em Manaus, localizada no estado do Amazonas. O propósito desse exame era avaliar a composição microbiana da amostra (CALDAS, 1977; CALDAS et al., 1978).

Como resultado, foi constatado o desenvolvimento de colônias bacterianas brancas e roxas. Desse modo, Wilson Chagas de Araújo, estudou essas colônias bacterianas de coloração arroxeada, sendo pioneiro no isolamento da *Chromobacterium violaceum* no país (CALDAS, 1977; CALDAS et al., 1978). Wilson

foi também o pioneiro na sugestão de que a violaceína poderia funcionar como uma defesa do micro-organismo contra os efeitos nocivos da radiação solar e raios UV (DURÁN; FALJONI, 1980).

A partir disso, houveram diversos avanços em estudos relacionados a *Chromobacterium* spp e suas peculiaridades, sendo estudado, inclusive, no setor agrícola. Desse modo, novas cepas de *Chromobacterium* foram selecionadas e estudadas. O presente trabalho estudou a relação dos isolados *C. amazonense*, *C. sphagni*, *C. subtsugae*, *C. paludis* e *C. alticapitis*.

2.2 Importância da origem e condição geográfica dos isolados

A compreensão da origem, local de isolamento e linhagem filogenética da *Chromobacterium* spp tem significativa importância nos estudos laboratoriais voltados para o controle de pragas agrícolas, apresentando implicações fundamentais para a pesquisa entomológica e o aprimoramento de estratégias de manejo. A identificação da origem do micro-organismo é essencial, uma vez que a distribuição geográfica e as condições ambientais específicas podem influenciar suas propriedades fisiológicas e comportamentais, afetando, por conseguinte, sua aplicabilidade no controle biológico de pragas agrícolas. Considerando que a interação entre a *Chromobacterium* e pragas agrícolas pode ser sensível a fatores ambientais específicos, temos que a identificação do local de origem da bactéria é essencial para compreender a relação hospedeiro-patógeno em condições naturais.

Além disso, compreender a linhagem filogenética da *Chromobacterium* é uma base para estabelecer conexões evolutivas e taxonômicas, oferecendo informações sobre suas características genéticas e potencialidades biológicas. Logo, a análise da filogenia da bactéria contribui para situar suas propriedades específicas, proporcionando uma base para investigações mais detalhadas sobre sua ecologia, interações com hospedeiros e possíveis aplicações no controle de pragas agrícolas.

2.2.1 *Chromobacterium subtsugae*

Essa cepa de *Chromobacterium* apresenta pesquisas mais aprofundadas em relação as demais na literatura. Recentemente, as “bactérias pigmentadas de roxo” pertencentes ao gênero *Chromobacterium* têm sido objeto de estudo em todo o mundo, principalmente no setor agrícola. Ao longo dos anos, essa bactéria foi aceita como uma única exclusiva espécie de *C. violaceum* (ANTUNES, 2006).

Após anos de estudos, descobriu-se que essa espécie não apresentava apenas uma única cepa e que é reconhecida por sua notável capacidade de produzir um pigmento roxo denominado violaceína, o qual apresenta diversas atividades antimicrobianas e antitumorais. Consideráveis esforços de pesquisa foram dedicados à compreensão da biossíntese da violaceína, bem como ao sistema de detecção de *quorum sensing* que regula esta síntese (HARRISON et al., 2020). A sequência genômica de *C. violaceum* foi detalhadamente documentada pelo Consórcio do Projeto Genoma Nacional do Brasil, sendo um projeto de alto investimento nacional (MARTIN et al., 2007b).

Ainda no ano de 2007, elucidaram as características distintivas de *Chromobacterium subtsugae*, uma espécie que não apenas sintetiza a violaceína, mas também produz fatores inseticidas eficazes contra diversas pragas de insetos. Como exemplo desse fator inseticida, temos a elaboração de um produto agrícola de um extrato de *C. subtsugae* que obteve aprovação da EPA (Environmental Protection Agency) para ser utilizado como inseticida orgânico e comercializado sob o nome de Grandevo® pela Marrone BioInnovations Incorporated, com sede em Davis, CA, EUA. Após seu descobrimento inicial de *C. subtsugae*, foram identificadas mais seis espécies de *Chromobacterium*: *C. haemolyticum*, *C. pseudoviolaceum*, *C. piscinae*, *C. aquaticum*, *C. vaccinii* e *C. amazonense*. Porém, a biologia e os metabólitos produzidos por essas novas espécies permanecem, em grande parte, desconhecidos, exigindo estudos adicionais para uma compreensão abrangente (MARTIN et al., 2007a).

Após estudos, percebeu-se que 70% dos genes de *C. subtsugae*, identificados pelo servidor RAST, apresentavam mais de 70% de similaridade de sequência em relação a *C. violaceum* (BLACKBURN, 2016). Essa comparação permitiu a percepção de que essas duas espécies de *Chormobaterium* apresentavam significativas diferenças em relação aos seus metabólitos e sua biossíntese. Em relação a *C. subtsugae*, a espécie apresentou uma considerável redução nos genes relacionados à produção de polissacarídeos capsulares e extracelulares, assim como nos componentes da parede celular gram-negativa. Outra descoberta foi que a *C. subtsugae* apresentava menos genes para metabolizar o nitrogênio, principalmente relacionada a equação química para transformar nitrato em nitrito (BLACKBURN, 2016).

2.2.2 *Chromobacterium amazonense*

A *Chromobacterium amazonense* é um isolado que apresenta como características células aeróbicas, Gram-negativas, em forma de bastonete ($2,2\text{--}2,6 \times 0,6\text{--}0,8\mu\text{m}$) e móveis. Quando cultivadas em laboratório, em placas de ágar, suas colônias são violetas, lisas e regulares. A temperatura ideal para o desenvolvimento das colônias é de 28 a 30° C. No entanto, estudos na literatura indicam que o crescimento pode ocorrer em uma faixa de 10 a 45°C, mas não cresce em ágar nutriente com 3,5% de NaCl. Isso nos permite interpretar que a bactéria pode ser sensível em maiores concentrações salinas, o que pode ser base para novas pesquisas. O pH ideal para crescimento varia de 6,0 a 8,0. A cepa advinda da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) 6197 (=DSM 26508 T), uma das mais antigas relatadas em território nacional, foi obtida a partir do Rio Negro, na cidade de Rio Preto da Eva, localizada no estado do Amazonas (MENEZES et al., 2015).

Além dessas características temos que a bactéria apresenta fatores de virulência semelhantes as cepas *C. violaceum* e *C. haemolyticum* que podem ser fatais em seres humanos. Para comprovar isso, estudo relacionados ao seu genoma foram feitos, levando a conclusão de que a cepa apresenta a produção de diversas proteínas como hemolisinas, enterotoxinas hemolíticas, colicina V, proteínas líticas e hidrolases Nudix que são associadas as bactérias patogênicas para destruir e infectar células hospedeiras, além de apresentar motilidade flagelar facilitando ainda mais a colonização de hospedeiros (SANTOS et al., 2018).

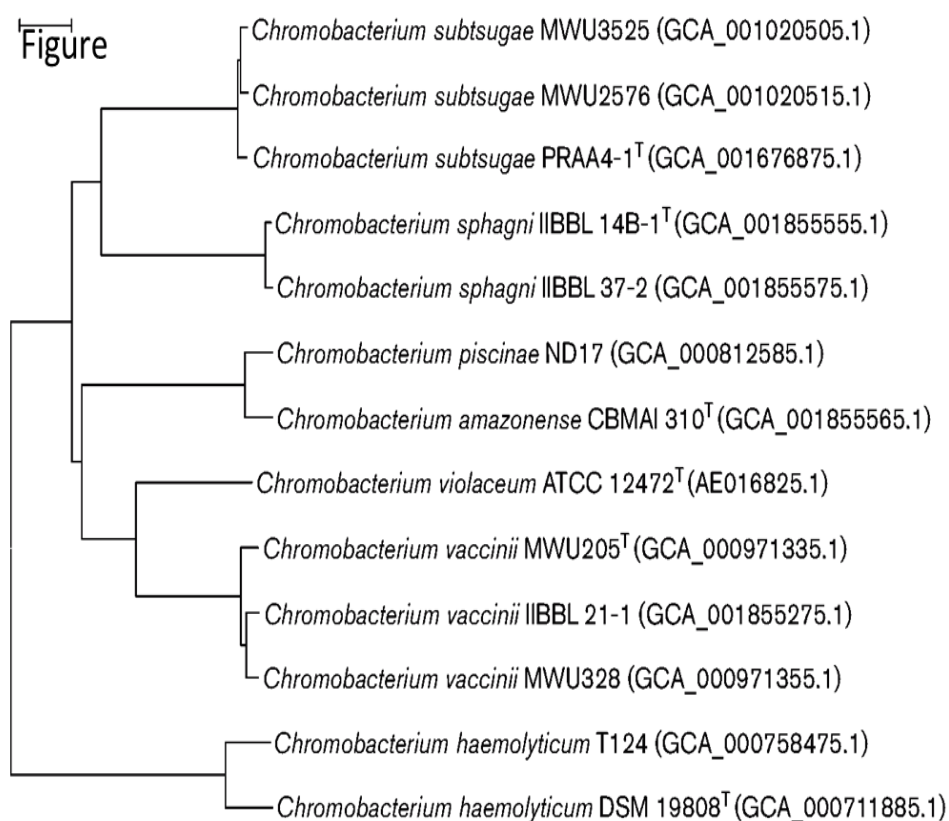
2.2.3 *Chromobacterium sphagni*

Chromobacterium sphagni (sphagni. N.L. gen. n. sphagni, proveniente de Sphagnum; em referência à aparente associação da espécie com pântanos predominantemente colonizados por musgos do gênero *Sphagnum*) (BLACKBURN et al., 2017).

As células são Gram-negativas e apresentam uma morfologia bacilar, com dimensões médias de $2,30 \pm 0,37$ por $0,78 \pm 0,10 \mu\text{m}$, além de demonstrar motilidade. Ao serem cultivadas em meio ágar, a 24°C por 48 horas, originam colônias lisas, convexas e violetas, caracterizadas por margens regulares. A manifestação visual inicial das colônias ocorre com uma tonalidade violeta, tornando-se progressivamente evidente a presença de um pigmento marrom

difusível no meio de cultivo ao longo do tempo. Em ambientes sob luz ultravioleta de curto ou longo comprimento de onda, as colônias não exibem fluorescência (BLACKBURN et al., 2017).

As células individuais apresentam um único flagelo polar, acompanhado por um número variável de flagelos laterais ou subpolares. A faixa de temperatura propícia ao crescimento ocorre entre 15 e 40°C, porém não há crescimento a 10 ou 45°C. O pH varia de 4,5 e 9,0, observa-se crescimento, mas não ocorre a 4,0 ou 9,5. Apresenta-se viável com até 2,0% de NaCl, ao passo que a presença de 2,5% de NaCl inibe o crescimento (BLACKBURN et al., 2017). Diante disso, pode-se perceber que a cepa é mais sensível em relação à salinidade por NaCl do que a cepa *Chromobacterium amazonense*.



© 2024 Microbiology Society

Figura 1 – Filogenia da *Chromobacterium*

Fonte: Blackburn et al. (2017)

Nota: Análise da filogenia de *Chromobacterium* baseado em seu genoma, com base na identidade média de nucleotídeos (gANI). Os valores foram subtraídos de 100% para obter distâncias utilizadas para reconstruir a filogenia. Barra, distância de 2% de gANI.

2.2.4 *Chromobacterium paludis*

Identificada em meados de 2020, em pequenas lagoas de águas paradas, mais precisamente na Ilha Langrells, próximo à foz do rio Nanticoke, no condado de Dorchester, Maryland, EUA, a *Chromobacterium paludis* pode apresentar certa tolerância à água salgada (salinidade do local de 10 a 20 ppt), uma vez que foi identificada em locais pantanosos e com frequente inundação de água salobra. Estudos mais aprofundados identificaram que a *C. paludis* (pa.lu'dis. L. gen. n. *paludis* de uma zona úmida ou pântano) são em formato de bastonete, com a dimensão de $2,58 (\pm 0,53) \mu\text{m} \times 0,81 (\pm 0,04) \mu\text{m}$. As células também são Gram-negativa e móveis com flagelos polares únicos (BLACKBURN, 2020).

Com relação a suas colônias, apresentam textura lisas, convexas, de cor violeta escura, com margens regulares em ágar após 48 horas a 24 °C. Além disso, as colônias não apresentam fluorescência sob UV de comprimento de onda curto ou longo (BLACKBURN, 2020). Esta cepa apresenta poucos estudos relatados na literatura, despertando a curiosidade sobre seus potenciais no meio agrícola.

2.2.5 *Chromobacterium alticapitis*

Em estudos nos EUA, em regiões pantanosas de cranberry selvagem no *Cape Cod National Seashore*, foram isoladas duas cepas de *Chromobacterium* (MWU14-2602 e MWU13-2610). Após observações genômicas e também do seu fenótipo, conclui-se que se tratavam de duas novas espécies de *Chromobacterium*. Assim, pelo sequenciamento total do genoma, percebeu-se que eram mais próximas ao grupo da *C. amazonense*, que também inclui a recente cepa da *C. paludis*. Logo, foram propostos os nomes para esses isolados ainda sem muitos estudos aprofundados sobre o tema, apenas entendendo que se diferenciavam a ponto de serem classificadas em novas cepas as quais foram denominadas de *Chromobacterium alticapitis* sp. e *Chromobacterium sinuscluepearum* sp. (O'HARA-HANLEY, 2022).

Diante disso, podemos concluir que as cepas abordadas neste trabalho foram recentemente descobertas e demandam mais pesquisas para compreendermos seu verdadeiro modo de ação, eficácia de controle e potencial produtivo através da fermentação líquida. Além disso, pelo que se pode observar na presente literatura, ainda há poucos artigos e trabalhos relacionados a

algumas cepas de *Chromobacterium* spp, sendo necessários muitos outros projetos para entendermos seu real modo de ação e potencial produtivo.

2.3 Cigarrinha do milho: *Dalbulus maidis*

A cigarrinha do milho *Dalbulus maidis*, pertencente à ordem dos Hemiptera (Cicadellidae), é tida como uma das pragas mais significativas do milho (*Zea mays* L.) no território brasileiro e em toda a América Latina nos últimos anos (VILANOVA, 2024). Isso ocorre, devido a sua habilidade em transmitir diversos patógenos à cultura do milho que causam doenças como o Enfezamento Pálido, o Enfezamento Vermelho e à Risca do milho (PEDREIRA et al., 2017).

O Enfezamento Pálido é desencadeado por uma bactéria denominada *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb, ao passo que o Enfezamento Vermelho está associado ao fitoplasma *Phytoplasma asteris*. Adicionalmente, a cigarrinha desempenha um papel crucial na disseminação do vírus Raiado Fino do Milho (MRFV), ocasionador desta doença. Até o que se sabe, a transmissão desses patógenos ocorre durante a alimentação da cigarrinha no floema das plantas, resultando na propagação efetiva dessas doenças sistêmicas e vasculares, com potencial para causar perdas significativas na produção de milho (NAULT, 1980; 1990; OLIVEIRA; LOPES, 2004).

As enfermidades que afetam o milho são caracterizadas por sua natureza sistêmica e vascular, impactando tanto a fisiologia quanto a nutrição das plantas. Tais condições têm o potencial de acarretar prejuízos consideráveis, chegando até 70% na produtividade de grãos (SABATO, 2020). A literatura revela registros dessas doenças no Brasil há mais de 50 anos (KITAJIMA; COSTA, 1972), com surtos epidêmicos esporádicos desde a década de 1990 (OLIVEIRA et al., 1998; 2003).

Contudo, a partir de 2015, as plantações de milho no Brasil enfrentam prejuízos significativos devido à propagação sistemática dessas enfermidades, especialmente em regiões como os Sudeste, Centro-Oeste e Sul, indicando um potencial adaptativo do inseto a diferentes condições ambientais, tanto para regiões mais quentes quanto para regiões mais frias (OLIVEIRA et al., 2020; RIBEIRO; CANALE, 2021).

A conjuntura atual do mercado de grãos, marcada por uma demanda crescente e preços historicamente elevados, impulsiona o aumento da produção de milho nacional a fim de se reduzir importações. Contudo, no atual cenário de

contínuo crescimento de área plantada, bem como a atual janela de semeadura em três possibilidades (primeira safra entre setembro/outubro, segunda safra em fevereiro/março e terceira safra em maio), junto com atividades que abrangem grandes, médios e pequenos proprietários para produção de silagem, suplementação de gado e produção de sementes, permitem que a cultura ocorra no campo ao longo de todo o ano agrícola. Essa transformação no sistema de produção do milho, estabelecendo uma "ponte verde", que perpetua a presença de pragas e patógenos, apresentando problemas fitossanitárias ao longo do tempo.

Notavelmente, os aumentos na população de cigarrinhas do milho e na relevância das doenças de raquitismo do milho nos últimos anos parecem correlacionados às mudanças nas características da produção de milho brasileira. Desse modo, esse cenário favorece o suprimento de milho para *Dalbulus maidis*, bem como os demais patógenos que são transmitidos por esses insetos vetores (OLIVEIRA et al., 2020).

2.3.1 *Dalbulus maidis*: origem, associação com milho e distribuição geográfica

Até onde temos conhecimento, o México constitui o epicentro da diversidade genética do gênero *Dalbulus*. A cigarrinha do milho, *Dalbulus maidis*, tem sua origem mais provável nos elevados vales da região central do país, estando intrinsecamente relacionada à evolução dos ancestrais selvagens do milho que habitam essa localidade (VILANOVA, 2024; NAULT, 1983).

De acordo com o que se sabe na literatura, o *Tripsacum* L. (*gamagrass*), como a *teosinto* (*Zea spp.*) são tidos como as espécies que deram origem ao milho atual que temos hoje (WILKES, 1972; DOEBLEY; ILTIS, 1980). Essas plantas são particularmente abundantes no México, onde as populações de *Dalbulus* spp. apresentam uma distribuição geográfica que se sobrepõe às áreas habitadas por espécies de *Tripsacum* e *teosintos* (NAULT; DELONG, 1980), indicando uma longa história de associação e coevolução com as plantas locais.

Desta forma, presume-se que a *D. maidis* provavelmente se adaptou ao *teosinto* e, posteriormente, ao milho (NAULT, 1983). Durante todo o processo de domesticação do milho, desde os primórdios, até o presente momento, a cigarrinha do milho, cujo principal hospedeiro é o milho, acompanhou o avanço do cultivo à medida que esse cereal se expandiu pelas regiões tropicais e subtropicais das Américas, mantendo uma estreita ligação com o milho. Existem estudos que nos

permitem inferir que a *D. maidis* pode ter sido a primeira praga da cultura tal qual conhecemos hoje (WILKES, 1972).

Embora tenhamos outras espécies de cigarrinhas em território americano, como a *D. elimatus* (Ball), que também possuem o milho como hospedeiro, somente a *Dalbulus maidis* apresenta-se em tantos lugares no continente Americano. Isso se dá pelo fato da *D. maidis* apresentar características biológicas, ecológicas e comportamentais que garantem uma melhor adaptação ao ambiente. Seu ciclo de desenvolvimento são notavelmente rápido e destaca-se pela elevada taxa de fecundidade (NAULT; MADDEN, 1985; NAULT, 1990).

Adicionalmente, a espécie gera pelo menos duas progênies ao longo do ciclo do milho e tem preferência pelo verticilo do milho, buscando tecidos meristemáticos com maior valor nutricional para se alimentar e depositar ovos, sendo essencial para o estabelecimento de uma segunda geração da praga no campo. Até onde se pode observar, a praga tem potencial para explorar plenamente os recursos disponíveis em uma planta de milho desde a fase inicial até a fase de envelhecimento, ou seja, em todas as estádios fenológicos do milho.

Demonstrando alta mobilidade, apresenta uma considerável capacidade de dispersão (BRADFUTE et al., 1981). Essas distintivas características proporcionaram a *D. maidis* uma superioridade na competição entre espécies e possibilitaram sua ampla utilização do milho como fonte, disseminando-se por todas as regiões cultivadas, em detrimento de outras espécies (OLIVEIRA et al., 2013).

2.3.2 Características biológicas

A Cigarrinha-do-milho, é um inseto hemimetábolo, logo, sofre uma metamorfose incompleta ao longo do seu ciclo de vida. Além disso, apresenta aparelho bucal do tipo sugador labial, conferindo à cigarrinha a capacidade de obter alimento por meio da sucção do floema do milho, permitindo-a procriar ao longo de todo o ciclo da cultura do milho devido ao acesso ao alimento.

Além do seu impacto direto na cultura, a cigarrinha também ocasiona danos indiretos, disseminando patógenos responsáveis por doenças vasculares, frequentemente chamadas de complexos de enfezamentos, como já mencionados. Essa interação entre a cigarrinha e a cultura do milho realça a importância de estratégias eficientes de manejo para assegurar a saúde e produtividade das plantações (PINTO, 2021).

Os insetos adultos possuem, em média, cerca de 4 mm de comprimento e menos de 1 mm de largura, exibindo uma tonalidade predominantemente branca palha (TRIPLEHORN; NAULT, 1985; FELDMANN, 2023). Além disso, possuem um par de asas semitransparentes, e no abdômen, destacam-se manchas negras, mais proeminentes em indivíduos desenvolvidos em climas que apresentam baixas temperaturas (FELDMANN, 2023). A transmissão de patógenos ocorre quando esses insetos consomem a seiva de folhas novas, concentrando-se na parte superior das plantas de milho, sua área favorita devido às condições úmidas (SILVA et al., 2017; ALVES et al., 2020).

Na extremidade superior da cabeça, especificamente na área frontal, destacam-se duas manchas arredondadas de coloração preta, uma característica morfológica distintiva que facilita o reconhecimento e a diferenciação desta espécie em relação às demais cigarrinhas que impactam a cultura do milho (FELDMANN, 2023). O ciclo de vida desses insetos estende-se por aproximadamente dois meses, durante os quais cada fêmea pode realizar a oviposição de até 600 ovos. Essas particularidades morfológicas e comportamentais ressaltam a importância de métodos precisos de identificação e controle para gerenciar adequadamente a presença dessas cigarrinhas na produção de milho (WAQUIL et al., 2004).

Os ovos da *D. maidis* possuem uma tonalidade esbranquiçada, com córion transparente, registrando 1,3 mm de extensão e uma região do opérculo mais estreita em comparação com a extremidade posterior (MARÍN, 1987). A postura dos ovos pela fêmea desse inseto ocorre de forma endofítica, isto é, abaixo da camada externa da folha, de preferência na nervura central das folhas de milho. Durante o ciclo de vida do inseto, conseguimos distinguir até cinco estágios de ninfas.

As ninfas predominantemente se fixam na face abaxial da folha (parte de baixo), apresentando uma coloração amarelada, e concluem o estágio ninfal em um período de 25 a 30 dias, a depender da temperatura do ambiente. A temperatura ótima para o desenvolvimento e progresso dessa espécie é em torno de 26,5°C; no entanto, abaixo de 20°C, a eclosão das ninfas não ocorre. Esses detalhes do ciclo de vida evidenciam como a cigarrinha-do-milho é afetada pelas flutuações de temperatura e sublinham a relevância das condições do clima no combate a essa praga na agricultura (WAQUIL et al., 2004; SILVA, 2017). Desse modo, podemos concluir que a cigarrinha do milho é uma praga que tem ganhado cada vez mais destaque na atualidade, tanto pela sua alta capacidade de adaptações ambientais

quanto sua alta resiliência para se selecionar indivíduos resistentes a inseticidas químicos. Além disso, devido as alterações climáticas que é possível perceber ao longo dos últimos anos, sejam por ações antrópicas ou não, o aumento de temperatura tem permitido um ambiente propício para o ciclo da *D. maidis*. Diante disso, estudos com inseticidas biológicos nunca foram tão necessários quanto o presente momento.

2.4 Estratégias de manejo e táticas de controle

Os inseticidas químicos começaram a ganhar uma grande notoriedade no final do século XIX e início do século XX, com o desenvolvimento de compostos como o DDT (diclorodifeniltricloroetano) e outros pesticidas organoclorados. O DDT, em particular, tornou-se amplamente utilizado após a Segunda Guerra Mundial devido à sua eficácia no controle de insetos vetores de doenças e pragas agrícolas (WAQUIL, 2004).

No entanto, ao longo do tempo, surgiram preocupações ambientais e de saúde pública associadas ao uso indiscriminado desses produtos químicos, levando a restrições e proibições em muitos países a partir da segunda metade do século XX. Mesmo com algumas restrições importantes, percebe-se que o uso exacerbado de químicos no setor agrícola tem gerado importantes consequências para a agricultura. Pensando nisso, foi elaborado um novo conceito denominado Manejo Integrado de Pragas (MIP), visando reduzir o uso exclusivo e irresponsável de inseticidas químicos e pensando em diferentes táticas de manejo para controlar as pragas agrícolas e as manter abaixo do nível de dano econômico (WAQUIL, 2004).

Diante disso, é possível observar que o uso inadequado de produtos químicos, como a aplicação de subdoses, doses acima do recomendado pela bula e a repetição de princípios ativos em aplicações sucessivas, está selecionando cada vez mais indivíduos resistentes aos grupos químicos. Esse mal uso dos produtos químicos tem tornado necessário realizar misturas com diferentes ingredientes ativos para se obter um controle eficaz das pragas. Um exemplo claro disso é a quantidade de produtos comerciais que temos hoje no mercado em relação ao número de Ingredientes ativos. Atualmente temos 76 produtos comerciais registrados para o controle de *Dalbulus maidis* na cultura do milho. Destes produtos comerciais temos apenas 32 Ingredientes ativos ou misturas para o controle, sendo que a maioria já conta com misturas para que atinja os valores mínimos de controle necessário para a comercialização (Agrofit, acesso em 24 junho de 2024).

Tabela 1 - Ingredientes Ativos presentes no mercado até o momento no ano de 2024(18/05/2024)

Número	Ingrediente Ativo (Grupo Químico)
1	acefato (organofosforado) + bifentrina (piretróide)
2	acefato (organofosforado)
3	acetamiprido (neonicotinóide) + alfa-cipermetrina (piretróide)
4	acetamiprido (neonicotinóide) + bifentrina (piretróide)
5	acetamiprido (neonicotinóide) + fenpropatrina (piretróide)
6	acetamiprido (neonicotinóide) + lambda-cialotrina (piretróide)
7	Argemone Mexicana, Extrato de (Derivado vegetal)
8	azadiractina (Tetranortriterpenóide)
9	beta-ciflutrina (piretróide) + imidacloprido (neonicotinóide)
10	bifentrina (piretróide) + carbossulfano (metilcarbamato de benzofuranila)
11	bifentrina (piretróide) + clorantraniliprole (antranilamida)
12	bifentrina (piretróide) + imidacloprido (neonicotinóide)
13	bifentrina (piretróide) + metomil (metilcarbamato de oxima)
14	buprofezina (tiadiazinona)
15	cipermetrina (piretróide) + profenofós (organofosforado)
16	clorfenapir (análogo de pirazol)
17	Clotianidina (neonicotinóide)
18	Esfenvalerato (piretróide) + fenitrothion (organofosforado)
19	Etiprole (Fenilpirazol)
20	Extrato hidroalcólico de Azadirachta indica (Triterpenóide)
21	imidacloprido (neonicotinóide) + tiodicarbe (metilcarbamato de oxima)
22	imidacloprido (neonicotinóide)
23	Isocicloseram (Isoxazoline) + lambda-cialotrina (piretróide)
24	lambda-cialotrina (piretróide) + sulfoxaflor (sulfoxaminas)
25	lambda-cialotrina (piretróide) + tiametoxam (neonicotinóide)
26	lambda-cialotrina (piretróide)
27	lufenurom (benzoiluréia) + profenofós (organofosforado)
28	malationa (organofosforado)
29	metomil (metilcarbamato de oxima)
30	óleo vegetal (ésteres de ácidos graxos)
31	profenofós (organofosforado)
32	tiametoxam (neonicotinóide)

Com relação aos produtos biológicos que temos no mercado, de acordo com o aplicativo de celular Bioinsumos da EMBRAPA (Android e Apple), seguindo os padrões de registro e que aparecem na base de dados do AGROFIT, temos a seguinte relação de produtos à base de micro-organismos.

Tabela 2 - Quantidade de produtos comerciais (registros) a base do micro-organismos para controle de cigarrinha do milho até o dia 18/05/2024

Ingrediente Ativo	Quantidade
<i>Beauveria bassiana</i>	64
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	2
<i>Isaria javanica</i>	1
<i>Isaria fumosorosea</i>	1
<i>Argemone Mexicana, Estrato de (Derivado vegetal)</i>	1
<i>Pseudomonas chlororaphis + Pseudomonas fluorescens</i>	3
Total	72

Fica evidente que, para o controle de *D. maidis*, no milho, há uma quantidade limitada de produtos biológicos, sendo a grande maioria a base de fungos entomopatogênicos como *Beuaveria bassiana* que abrange 88,89% dos produtos comerciais encontrados, sendo alterado os isolados, embora predomine o isolado IBCB66 do Instituto biológico, doses e quantidade de conídios que apresentam nos diferentes produtos comerciais das diferentes empresas.

Vale ressaltar ainda que muitos destes produtos são idênticos e pertencentes a mesma empresa, sendo separados apenas devido algumas poucas mudanças no processo de fabricação ou devido a uma questão de marketing, possuindo os mesmos micro-organismos e cepas em sua composição. Logo, estudos para ampliar o repertório de micro-organismo no controle desta importante praga é essencial, visto que existem poucos produtos à base de bactérias.

Embora a eficiência dos fungos no controle de pragas seja alta e sua manipulação já esteja consolidada nos processos industriais, há ainda gargalos a serem estudados seja na produção, por meio de fermentação sólida ou líquida, seja na sua forma de ação, tempo de contaminação e demais parâmetros.

O tempo de ação desses produtos no controle das pragas é extremamente importante, uma vez que por haver a necessidade de germinação, penetração no tegumento e colonização dos insetos, esse processo acaba levando mais tempo do que em relação ao controle químico e produtos biológicos à base de bactérias. Nesse sentido, estudos com produtos biológicos na cultura do milho à base de *Chromobacterium* se torna relevante para compor uma outra abordagem no controle de pragas, podendo apresentar uma resposta mais rápida e na busca da mesma eficiência ou até melhor do que as dos fungos, garantindo uma menor perda produtiva ao produtor nesse intervalo de tempo em que o produto expressa seu potencial.

Vale ressaltar que um produto não anula o outro, ou seja, a importância dos fungos entomopatogênicos é enorme dentro do agronegócio e detém diversos benefícios, sendo que produtos à base de bactérias podem ser uma outra forma de posicionar o controle de pragas dentro do cenário do produtor de modo a se complementar no campo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção de isolados

Neste estudo prospectamos cinco isolados de bactérias do gênero *Chromobacterium* sendo três deles adquiridos da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) sendo elas *Chromobacterium amazonense* 6197, *Chromobacterium sphagni* 6198, *Chromobacterium subtsugae* 6199 e os isolados 6200 *Chromobacterium paludis* e 6201 *Chromobacterium alticaptis* foram acessados do banco de culturas do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano da ESALQ/USP.

As linhagens foram ativadas conforme recomendação dos bancos de cultura em ágar TSA (Agar Trípico de Soja), utilizando a técnica de semeadura por esgotamento que possibilita a obtenção de colônias isoladas e incubadas em estufa a 28°C sem fotoperíodo. Após a ativação, a pureza da cultura foi checada pela formação de colônia característica, ausência de contaminantes, pigmentação violeta e coloração de gram.

3.2 Produção das bactérias

As linhagens de *Chromobacterium* armazenadas em criotubos, foram cultivadas previamente em ágar – TSA por um período de 2 dias. Em seguida, utilizou-se os seguintes passos: 1° replique das placas cheias por meio de técnica de esgotamento; 2° Após 1 dia do replique, cortou-se um plag de 1cm² de uma região com o desenvolvimento da bactéria e foi inserido em 10ml de salina (0,85% de NaCl); 3° inoculação de 3,5ml dessa solução salina nos frascos de fermentação. Foi utilizado um meio de cultura ESALQ adaptado. As fermentações foram realizadas em frascos de fermentação de 250 mL com defletores (*baffles*) e 50 mL de volume de trabalho, a 28 °C, 125 rpm. O tempo de fermentação foi de 48 horas em todos os experimentos.

A contagem foi realizada por meio da técnica de unidades formadoras de colônias em placas em TSA foi utilizada para determinação de células viáveis e quantificação do crescimento celular (ISO, 2013).

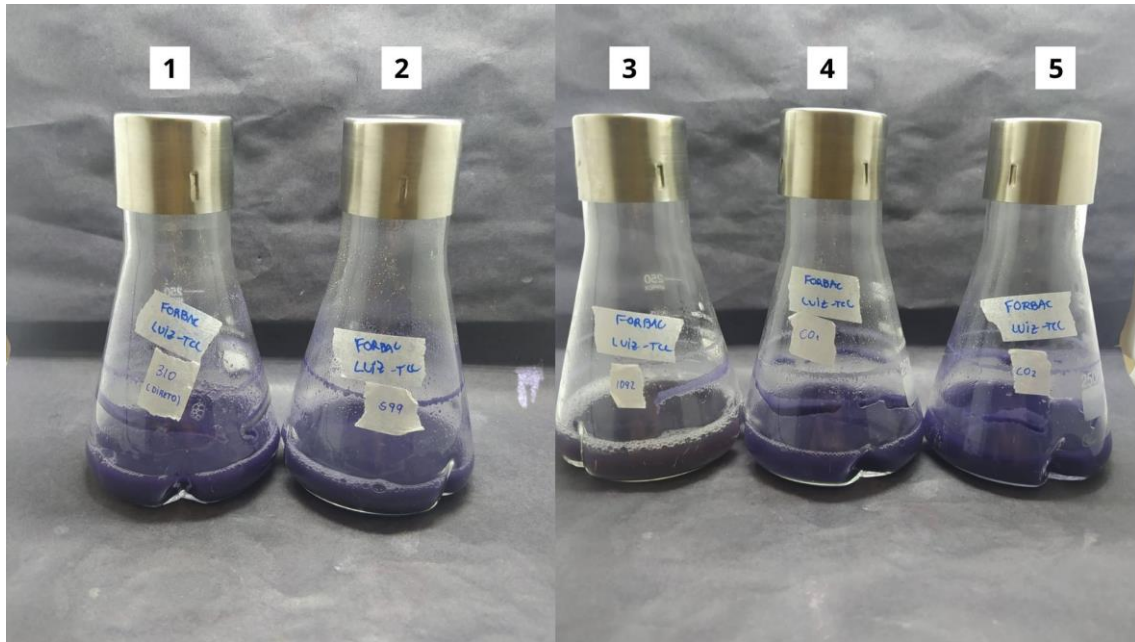


Figura 2 - Caldo fermentado de *Chromobacterium* após 48 horas de agitação.

1: *Chromobacterium amazonense* 6197, 2: *Chromobacterium sphagni* 6198, 3: *Chromobacterium subtsugae* 6199, 4: *Chromobacterium paludis* 6200 e 5: *Chromobacterium alticaptis* 6201. Fotos bioensaio 2

Após todo o processo de fermentação líquida durante a produção da *Chromobacterium* foi realizado diluição seriada para quantificar a concentração de células viáveis de cada um dos isolados durante o seu processo fermentativo. Esse procedimento foi realizado para cada isolado em cada replica experimental para que pudéssemos monitorar a qualidade do processo.

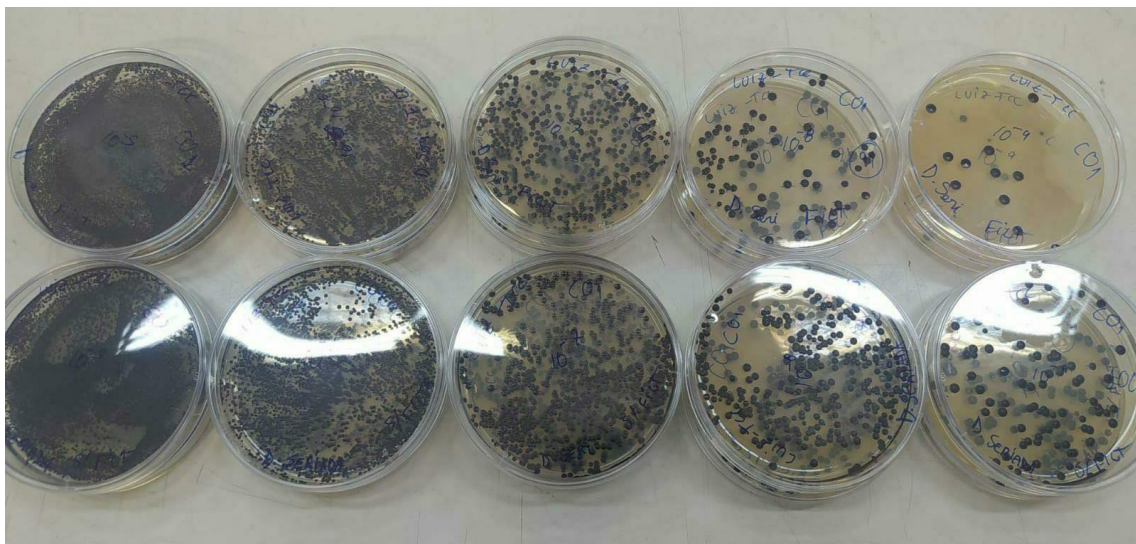


Figura 3 - Ilustração da diluição seriada do tratamento 6200. Intervalo de 10^{-5} a 10^{-9}

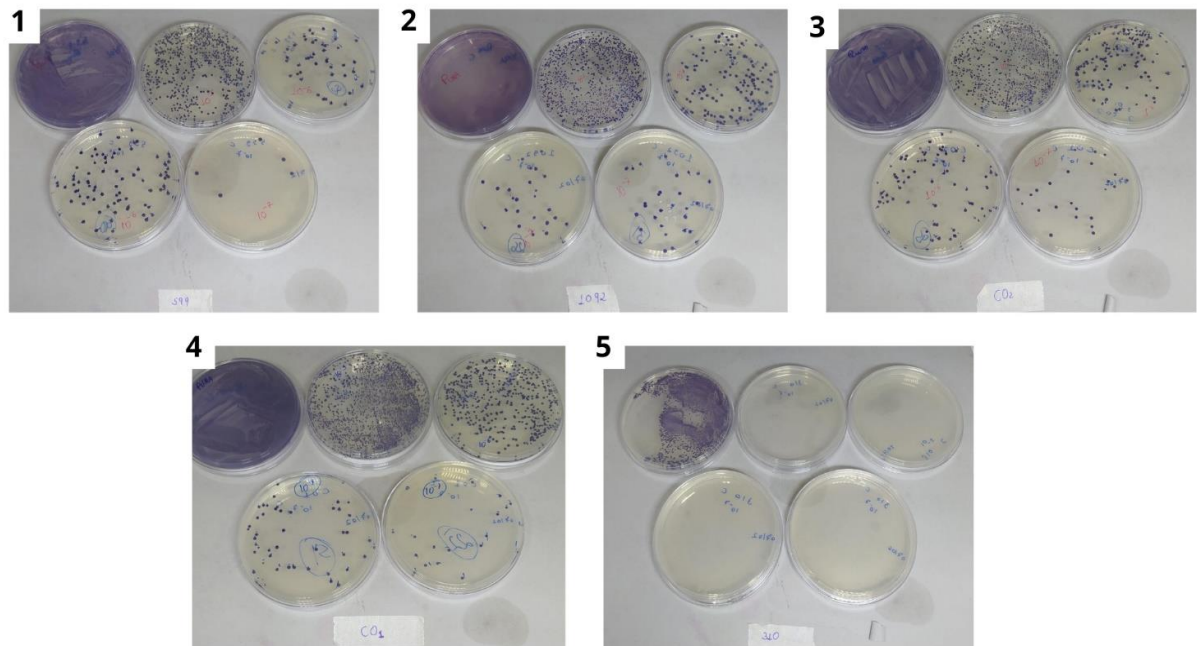


Figura 4 - Diluição seriada dos tratamentos no intervalo de 10^{-5} à 10^{-7} . Temos na respectiva ordem das fotos os seguintes tratamentos: 1-6198; 2-6199; 3-6201; 4-6200; 5-6197. Fotos do bioensaio 3 dos tratamentos contendo Células e Metabólitos

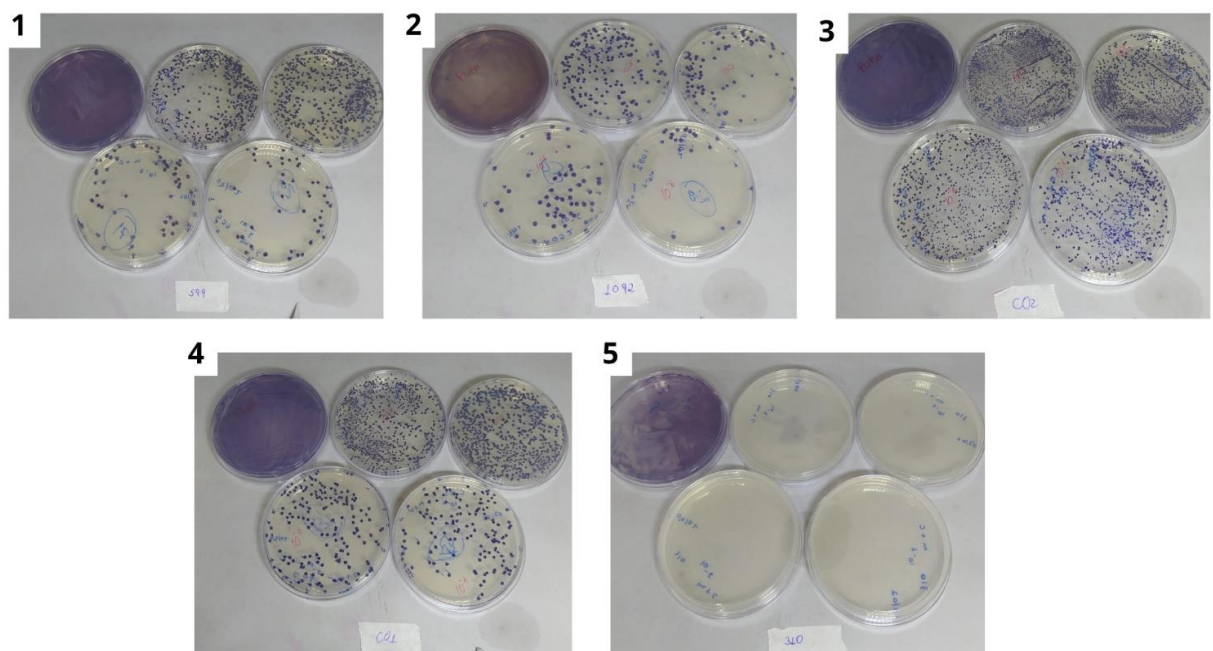


Figura 5 - Diluição seriada dos tratamentos no intervalo de 10^{-5} à 10^{-7} . Temos na respectiva ordem das fotos os seguintes tratamentos: 1-6198; 2-6199; 3-

6201; 4-6200;5-6197. Fotos do bioensaio 3 dos tratamentos contendo Células e solução de diluição

3.3 Preparo das suspensões de células e obtenção do filtrado

Para o meio de cultura ESALQ adaptado, utilizou-se, então, 3 estratégias para processamento e aplicação do caldo fermentado:

i) Caldo fermentado contendo células vivas e metabólitos

O caldo, que foi produzido por 48 horas, contendo células e metabólitos foi filtrado com gase esterilizada, uma vez que o meio de cultura utilizado como base para o desenvolvimento das cepas apresentavam granulações que causavam entupimento de “bico” no momento de aplicação do bioensaio. Para tal, utilizou-se um funil de polipropileno e uma dupla camada de gazes sobrepostas pela qual se despejava o caldo fermentado com todo o seu conteúdo, ou seja, bactérias e metabólitos. As partículas do meio ficavam retidas na gaze, enquanto que a maior parte das bactérias permaneciam no meio.

ii) Centrifugação do caldo fermentado para obtenção de concentrado celular

Nesta etapa, transferiu-se o caldo fermentado dos frascos de fermentação e os colocou em falcons de 45ml até a marca de 30ml. Após esse procedimento, foi utilizada a centrífuga do laboratório em uma rotação de 6000 rpm por 10 min a 20°C. Todo o material sólido ficava retido no fundo dos falcons e o sobrenadante (metabólitos) constituindo a porção líquida, eram removidos por meio de uma pipeta de Pauster e era adicionado uma solução de diluição (0,85 % NaCl, 0,1% Peptona Bacteriológica, 0,1% Sacarose e 0,05% Tween 80) na mesma quantidade. Após esse processo, os falcons eram homogeneizados e novamente eram centrifugados nas mesmas configurações. Novamente, removia-se o sobrenadante e era adicionado uma solução de diluição nas mesmas proporções. Por fim, os falcons eram homogeneizados e separados para a aplicação.

iii) Centrifugação dupla do caldo fermentado para obtenção do caldo cell free

Nesta etapa, transferiu-se o caldo fermentado dos frascos de fermentação e os colocou em falcons de 45ml até a marca de 30ml. Após esse procedimento, foi utilizada a centrífuga em uma rotação de 6000 rpm por 10 min a 20°C. A biomassa bacteriana ficava retida no fundo dos falcons e o sobrenadante (metabólitos) constituindo a porção líquida, eram removidos por meio de uma pipeta de Pauster para um outro tubo tomando cuidado para não coletar quaisquer biomassa

precipitada. Após esse procedimento, o material era homogeneizado e centrifugado novamente na mesma configuração, visando a sedimentação de quaisquer células remanescentes. O sobrenadante foi então removido e transferido para outro tubo, que foi armazenado na geladeira por um período de 7 dias. Após essa fase de refrigeração foi feito um plaqueamento do sobrenadante e verificado a ausência de crescimento celular, indicando que todas as células que eventualmente possam ter permanecido no sobrenadante haviam morrido durante esse intervalo de tempo.

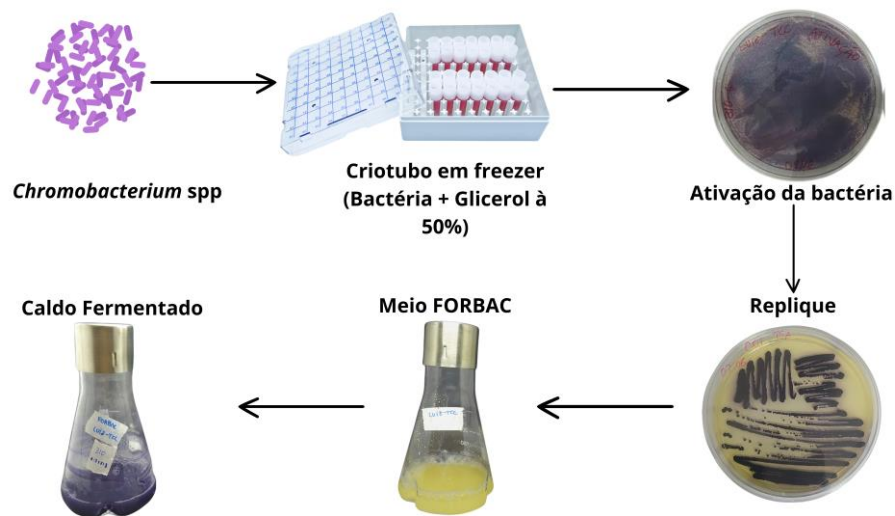


Figura 6 - Acervo pessoal: Luiz Felipe Zumpano. Procedimentos da produção de *Chromobacterium* spp por meio de fermentação líquida

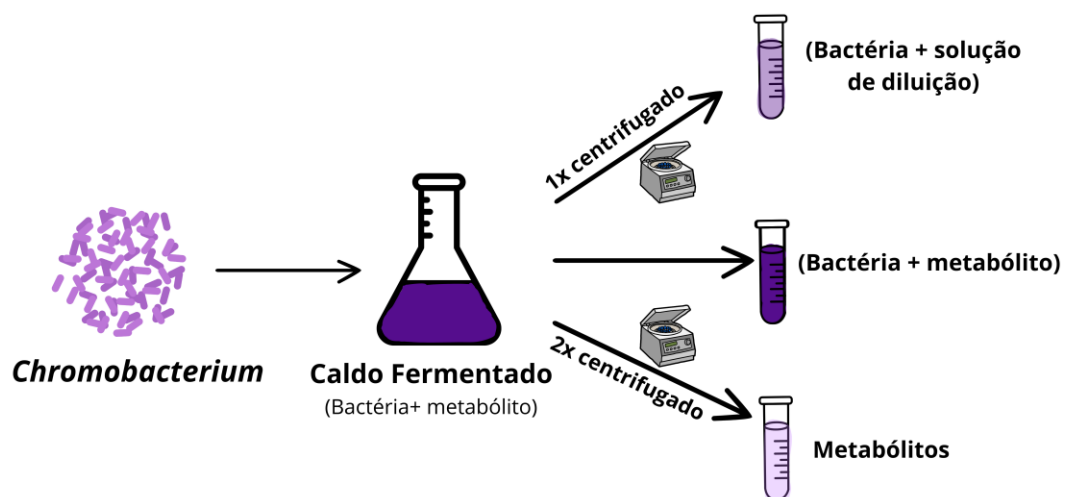


Figura 7 - Acervo pessoal: Luiz Felipe Zumpano. Explicação dos procedimentos de separação dos tratamentos de um mesmo isolado de *Chromobacterium* spp

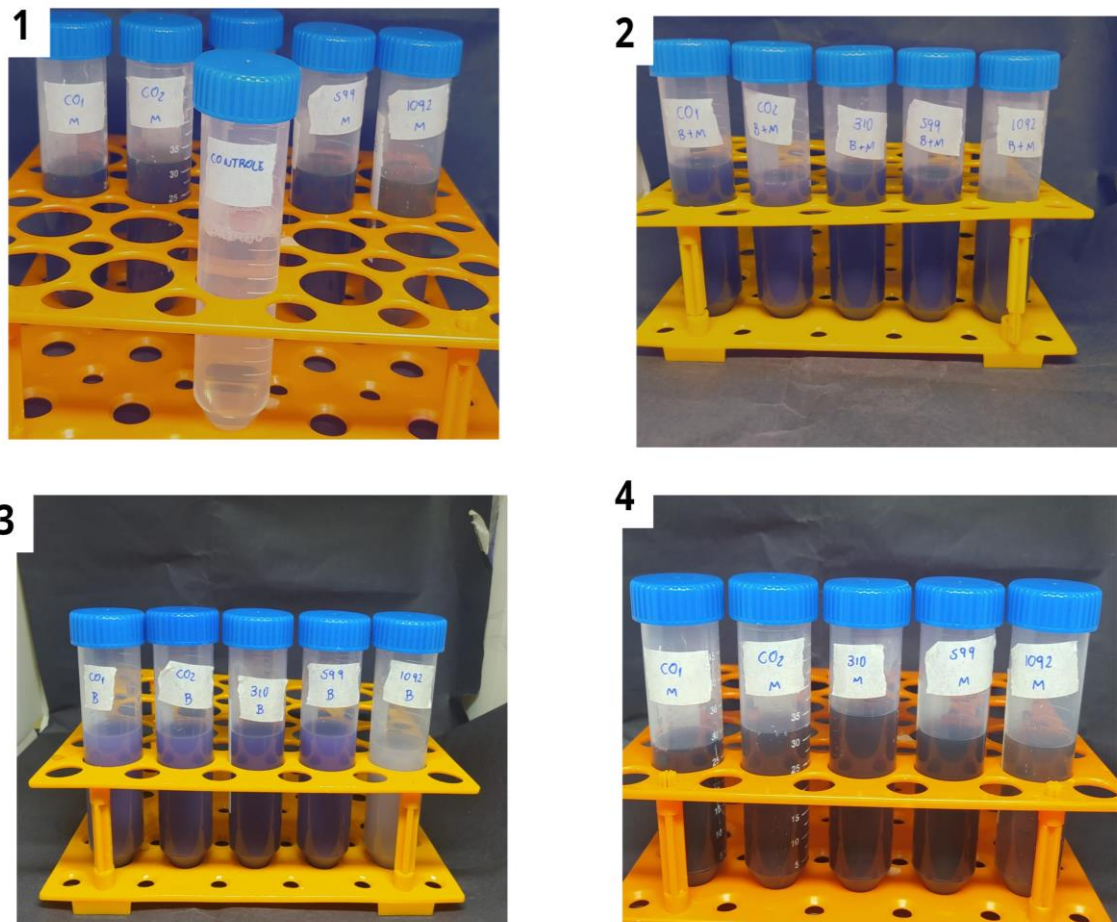


Figura 8 - Caldos fermentados antes de serem aplicados no bionesaio. 1 Controle. 2: Tratamentos contendo Bactéria e Metabólitos. 3: Tratamentos contendo apenas Bactéria. 4: Tratamentos contendo apenas metabólitos

3.4 Cultivo dos milhos para bioensaio

Para preparar os vasos para o experimento, foi necessário preencher cada um com substrato industrial, semear o milho e realizar um escalonamento para garantir que o milho estivesse na fase apropriada para o bioensaio.

Para garantir uma distribuição mais uniforme em relação à altura de plantas, optou-se por inicialmente semear o milho em bandejas e, após a emergência das plantas, transplantá-las para os vasos de tamanho adequado ao experimento (vaso número 11 - 430 ml).



Figura 9 - Cultivo do milho para experimentos e também para manutenção da caixa de criação de *Dalbulus maidis*

3.5 Criação de *Dalbulus maidis*

Com relação aos insetos, foi realizado a criação em caixas específicas de tela, permitindo a ventilação em seu interior. A criação foi escalonada de modo a se ter uma padronização das idades dos adultos, sendo utilizados em todos os ensaios insetos adultos com um tempo de aproximadamente 30 dias desde o início do ciclo.

As dimensões da caixa podem conter variações, porém foram utilizadas caixas nas dimensões de 40x40x60cm.



Figura 10 - Criação de *Dalbulus maidis* com 30 dias de idade em gaiolas de criação

3.6 Bioensaios com insetos

Os insetos foram obtidos de criação própria. Para os bioensaios foram utilizadas plantas de milho de aproximadamente 30 dias em estágio fenológico V4/V5. As mudas foram acopladas a gaiolas de acetato.

Cada gaiola possui uma tampa superior feita com tecido voil e uma pequena porta para acesso ao fundo da gaiola para retirada dos insetos mortos durante os bioensaios.

Antes da realização dos bioensaios, foram introduzidos de 12 a 15 adultos em cada gaiola. Foi avaliado o efeito de cinco isolados de *Chromobacterium*, nas frações: caldo fermentado, sobrenadante com metabólitos e somente bactérias.

Para aplicação das caldas com os tratamentos, foram utilizados um air brush acoplado a um compressor para aplicação de volumes de 1 mL em cada gaiola (0,5 mL por cima e 0,5 mL por baixo). As aplicações nas gaiolas foram realizadas através da abertura momentânea da tampa superior e da porta inferior, de modo a atingir tanto a parte superior quanto inferior das mudas com os insetos.

As gaiolas foram dispostas em salas com umidade de 70% e temperatura de 26°C, aproximadamente, de acordo com algumas variações comuns do ambiente. As avaliações foram feitas a cada dois dias por um período de 9 dias, contabilizando-se os indivíduos mortos em cada gaiola.

Os insetos mortos foram removidos com ajuda de um pincel e colocados em caixas container com divisórias contendo algodão umedecido para manutenção da umidade e posterior confirmação do agente causal da morte do inseto. Cada tratamento foi composto de 5 gaiolas e o experimento foi repetido três vezes no tempo.

Para algumas cigarrinhas que apresentavam pigmentação características da *Chromobacterium*, foram retiradas fotografias em microscópio de alta definição.



Figura 11 - Etapas para transferências de insetos para o ensaio. **1:** Câmera de transferência utilizada; **2:** Bomba para sucção de cigarrinhas; **3:** Aplicação de tratamentos durante bioensaio. Fotos bioensaio 2

Tabela 3 - Organização dos tratamentos que foram estudados

TRATAMENTOS		
T1	6200	Bactéria + Metabólitos
T2	6201	Bactéria + Metabólitos
T3	6197	Bactéria + Metabólitos
T4	6198	Bactéria + Metabólitos
T5	6199	Bactéria + Metabólitos
T6	6200	Bactéria
T7	6201	Bactéria
T8	6197	Bactéria
T9	6198	Bactéria
T10	6199	Bactéria
T11	6200	Metabólitos
T12	6201	Metabólitos
T13	6197	Metabólitos
T14	6198	Metabólitos
T15	6199	Metabólitos
T16	Controle	Solução de Diluição

3.7 Bioensaios de doses

Para este experimento, selecionados a cepa 6200 (*Chromobacterium paludis*). As formas de produção da cepa selecionada seguiram os mesmos protocolos da primeira etapa do projeto, bem como o protocolo para obtenção ou separação dos tratamentos de “Metabólitos + bactérias (B+M)” e “Metabólitos (M)”.

Para realização da curva de doses aplicadas, optou-se por utilizar uma diluição seriada assumindo que a produção do caldo fermentado tenha alcançado uma concentração de pelo menos 10^9 .

Diante disso, foi escolhida as concentrações por mL a seguir: 10^9 , 10^7 ; 10^6 ; 10^5 ; 10^4 ; e 100% do sobrenadante com metabólitos; diluição de 25% do sobrenadante com metabólitos e diluição de 1% de metabólitos e tratamento controle (solução de diluição utilizada - 0,85 % NaCl, 0,1% Peptona Bacteriológica, 0,1% Sacarose e 0,05% Tween 80).

Tabela 4 – Concentração dos isolados para o ensaio de doses para a cepa 6200.

Tratamentos	Concentração/mL
T1	10^9
T2	10^7
T3	10^6
T4	10^5
T5	10^4
T6	100% Metabólitos
T7	25% Metabólitos
T8	1% Metabólitos
T9	Controle

A contagem da concentração real aplicada foi realizada pela técnica de contagem padrão de placas, por meio do plaqueamento por superfície (UFC) para que fosse possível conferir o valor aplicado.

3.8 Análise estatística

Os dados de sobrevivência dos insetos adultos foram tabelados em planilha excel e analisados utilizando o estimador Kaplan-Meier para estimar a probabilidade de sobrevida durante o intervalo de oito dias de avaliação. As curvas de sobrevivência foram comparadas através do teste de Log-Rank ($p < 0,05$) utilizando o método Holm-Sidak para comparações múltiplas. As análises e os gráficos foram elaborados no software SigmaPlot v.14.

4 RESULTADOS

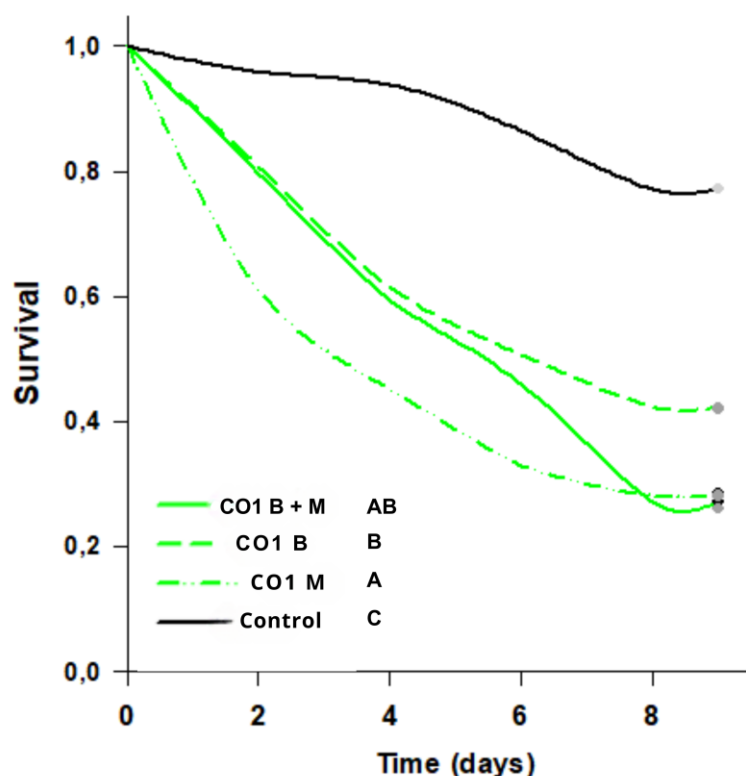


Figura 12 - Sobrevivência de adultos de *Dalbulus maidis* após aplicação dos tratamentos de bactérias + metabólitos (B+M) na concentração de $1,19 \times 10^9$, somente bactérias (B) à $3,20 \times 10^9$ e somente metabólitos (M) para a cepa de *Chromobacterium paludis* 6200. O controle foi realizado com solução de diluição usado para as cepas. As letras A, B e C referem-se às diferenciações estatísticas por Log-Rank ($p < 0,05$)

Para o isolado 6200, tanto os tratamentos “Metabólitos + Bactérias” (B+M) como só “Metabólitos (M)” apresentaram uma mortalidade final semelhante de 72,2% e 65,4% respectivamente (Tabela 5 em Anexo). Já em relação ao tratamento só bactérias (“B”) a mortalidade final foi de 56,1% e para o controle 22,9%. O tempo médio de sobrevivência (MTS) diferiu estatisticamente entre os tratamentos. Para o tratamento “M” foi de 5,06 dias e para os demais tratamentos foram de 5,97 e 6,28 para “B+M” e “B” respectivamente (Figura 12, Tabela 9 em Anexo). Desse modo, conclui-se que para este isolado, o tratamento “M” foi mais virulento para *D. maidis*

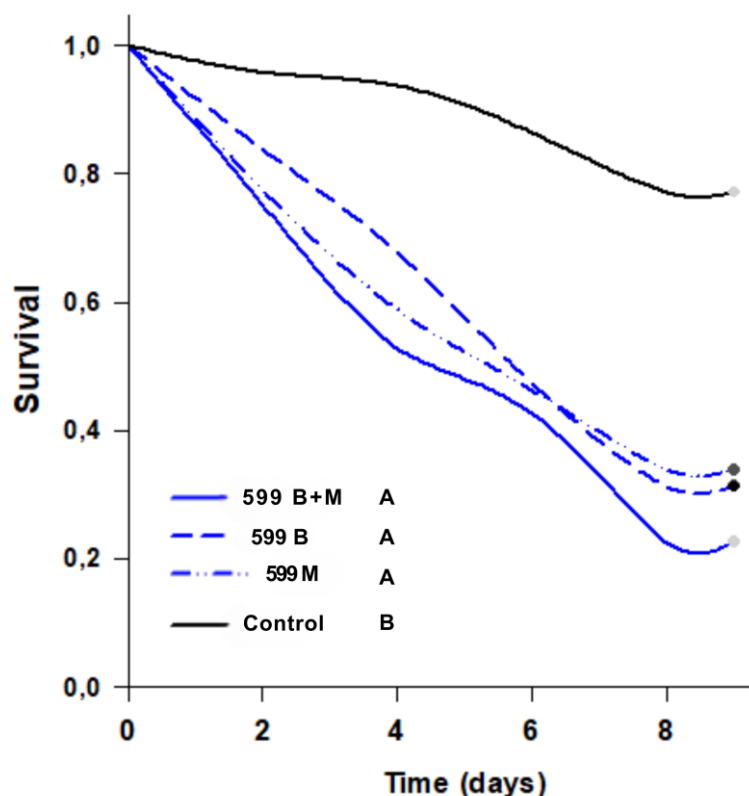


Figura 13 - Sobrevivência de adultos de *Dalbulus maidis* após aplicação dos tratamentos de “bactérias + metabólitos (B+M)” na concentração de $3,57 \times 10^8$, somente “bactérias (B)” à $3,87 \times 10^8$ e somente “metabólitos (M)” para a cepa de *Chromobacterium sphagni* 6198. O controle foi realizado com solução de diluição usado para as cepas. As letras A, B e C referem-se às diferenciações estatísticas por Log-Rank ($p < 0,05$)

Com relação ao isolado 6198, os tratamentos “B” e “M” apresentaram uma mortalidade final semelhante de 67,6% e 65,0 % respectivamente (Tabela 5 em Anexo). Para o tratamento “Metabólitos + Bactérias” (B+M) a mortalidade final foi de 76,6% e o controle de 22,9 %. Com relação ao tempo médio de sobrevivência (MTS), percebe-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos, mas todos diferiram em relação ao controle.

Para o tratamento “M” foi de 5,99 dias e para os demais tratamentos foram de 5,64 e 6,29 para “B+M” e “B” respectivamente (Figura 13, Tabela 9 em Anexo).

Desse modo, conclui-se que para este isolado, todos os tratamentos apresentaram valores aproximados de virulência para *D. maidis*.

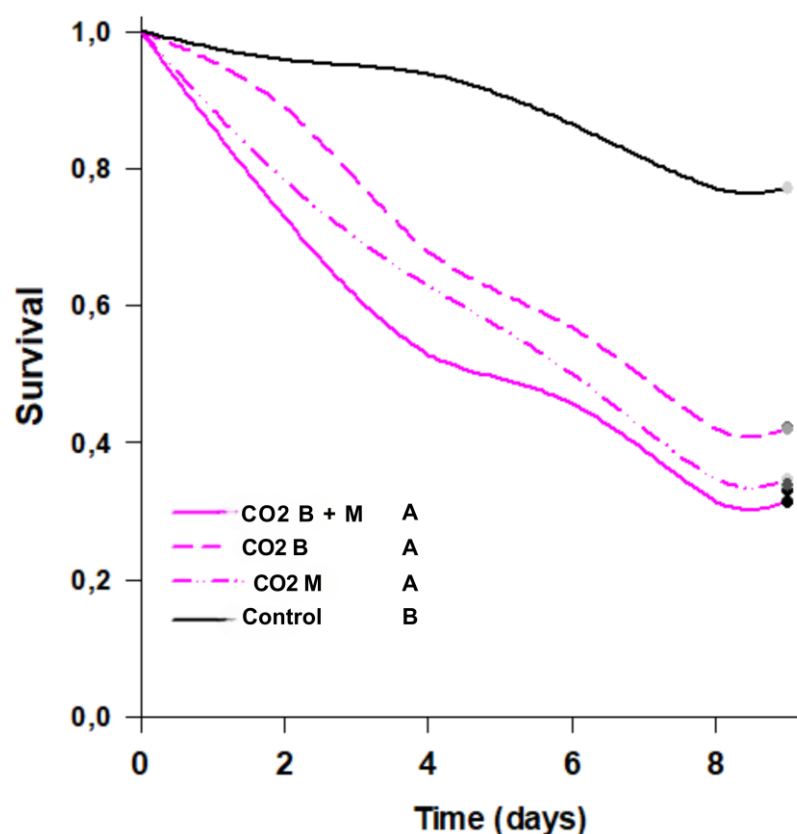


Figura 14 - Sobrevivência de adultos de *Dalbulus maidis* após aplicação dos tratamentos de bactérias + metabólitos (B+M) na concentração de $6,99 \times 10^9$, somente bactérias (B) à $1,16 \times 10^9$ e somente metabólitos (M) para a cepa de *Chromobacterium alticaptis* 6201. O controle foi realizado com solução de diluição usado para as cepas. As letras A, B e C referem-se às diferenciações estatísticas por Log-Rank ($p < 0,05$)

No caso do isolado 6201, os tratamentos “Metabólitos + Bactérias” (B+M) e “Metabólitos (M)” apresentaram uma mortalidade final bem próximos entre si de 68,1% e 65,4% respectivamente (Tabela 5 em Anexo).

Contudo, o tratamento só bactérias (“B”) a mortalidade final foi de 57,7% e para o controle 22,9%.

O tempo médio de sobrevivência (MTS) não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, mas todos diferiram em relação ao controle. Para o tratamento “M” foi de 6,17 dias, para “B” de 6,69 dias e 5,74 dias para “B+M” (Figura 14, Tabela 9 em Anexo). Desse modo, conclui-se que para este isolado, os tratamentos apresentaram virulência aproximadas para *D. maidis*.

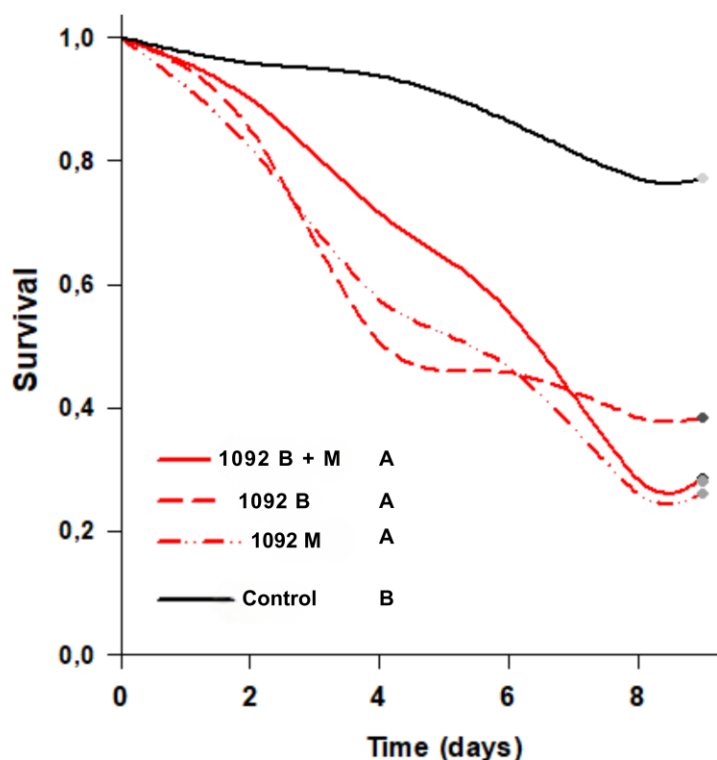


Figura 15 - Sobrevivência de adultos de *Dalbulus maidis* após aplicação dos tratamentos de bactérias + metabólitos (B+M) na concentração de $2,38 \times 10^8$, somente bactérias (B) à $1,50 \times 10^9$ e somente metabólitos (M) para a cepa de *Chromobacterium subtsugae* 6199. O controle foi realizado com solução de diluição usado para as cepas. As letras A, B e C referem-se às diferenciações estatísticas por Log-Rank ($p < 0,05$)

Com relação ao isolado 6199, os tratamentos “Metabólitos + Bactérias” (B+M) apresentaram mortalidade final de 68,2%, enquanto que “Metabólitos (M)” alcançou 74,3% (Tabela 5 em Anexo).

Já para o tratamento só bactérias (“B”) a mortalidade final foi de 61,5% e para o controle 22,9%. O tempo médio de Asobrevivência (MTS) também não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, mas todos diferiram em relação ao controle. Para o tratamento “M” foi de 5,99 dias, para “B” de 6,01 dias e 6,63 dias para “B+M” (Figura 15, Tabela 9 em Anexo). Desse modo, conclui-se que para este isolado, os tratamentos apresentaram virulência aproximadas para *D maidis*.

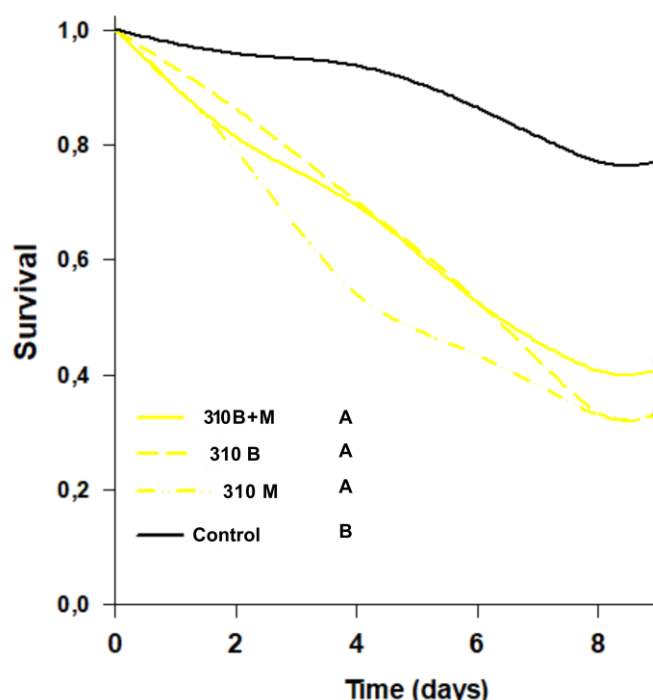


Figura 16 - Sobrevivência de adultos de *Dalbulus maidis* após aplicação dos tratamentos de bactérias + metabólitos (B+M), somente bactérias (B) e somente metabólitos (M) para a cepa de *Chromobacterium amazonense* 6197. O controle foi realizado com solução de diluição usado para as cepas. As letras A, B e C referem-se às diferenciações estatísticas por Log-Rank ($p < 0,05$)

Para o isolado 6197, os tratamentos “Metabólitos + Bactérias” (B+M) apresentaram mortalidade final de 59,5%, enquanto que “Metabólitos (M)” alcançou 67,5% (Tabela 5 em Anexo). Já para o tratamento só bactérias (“B”) a mortalidade final foi de 67,3% e para o controle 22,9%.

O tempo médio de sobrevivência (MTS) também não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, mas todos diferiram em relação ao controle. Para o tratamento “M” foi de 5,86 dias, para “B” de 6,52 dias e 6,48 dias para “B+M” (Figura 16, Tabela 9 em Anexo). Desse modo, conclui-se que para este isolado, os tratamentos apresentaram virulência aproximadas para *D. maidis*.

Para esse isolado não foi possível quantificar a concentração aplicada para os tratamentos “B+M” e “B” nos bioensaios pelo fato da bactéria não se desenvolver nas placas utilizadas para contagem de colônias em nenhum dos experimentos realizados.

4.1 Ensaios de dose para 6200

Considerando os resultados dos bioensaios com as cinco cepas de *Chromobacterium* spp. selecionamos a *C. paludis* (6200), considerada uma das mais virulentas, para realizar os bioensaios de dose resposta.

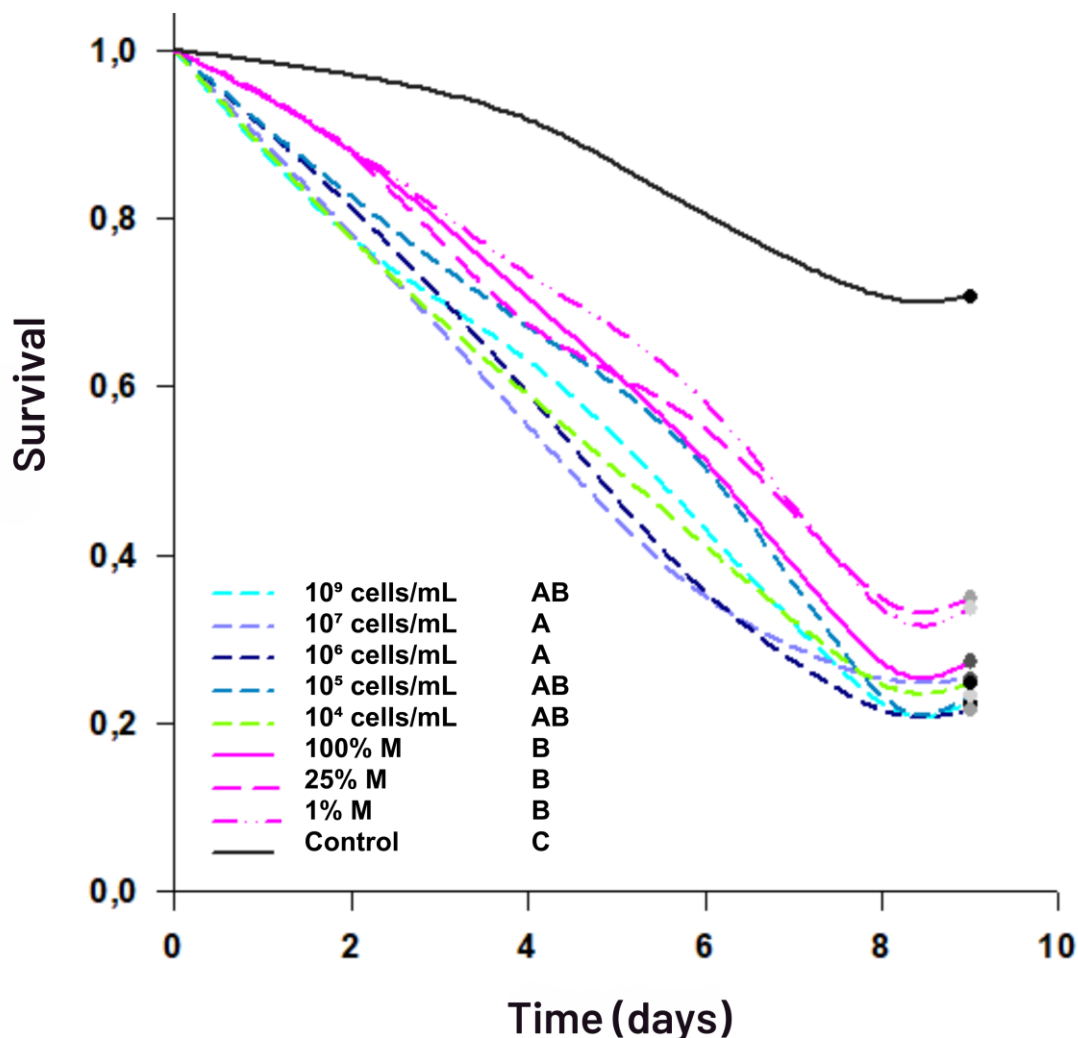


Figura 17 - Sobrevivência de adultos de *Dalbulus maidis* após aplicação dos tratamentos de bactérias + metabólitos (B+M) e somente metabólitos (M) para a cepa de *Chromobacterium paludis* 6200. O controle foi realizado com solução de diluição usado para as cepas. As concentrações de aplicação foram de $6,70 \times 10^9$, $6,81 \times 10^7$, $5,14 \times 10^6$, $5,03 \times 10^5$ e $3,55 \times 10^4$, para os caldos fermentados contendo B+M e a concentração dos metabólitos foi diluída de 100%, 25% e 1%. As letras A, B e C referem-se às diferenciações estatísticas por Log-Rank ($P < 0,05$)

A Figura 17 ilustra os resultados obtidos de três experimentos montados em datas distintas. Ao analisar o gráfico desta segunda etapa podemos concluir que os tratamentos de diferentes concentrações de metabólitos não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao tempo de sobrevivência dos insetos.

Vale ressaltar que foi possível quantificar as concentrações aplicadas do caldo fermentado somente após 48 horas do ensaio, quando as colônias de bactérias cresciam para quantificação (ISO, 2013).

Para os metabólitos não era possível realizar o plaqueamento, uma vez que eram livres de células, sendo a concentração real de cada um dos metabólitos uma incógnita tanto nos experimentos quanto na literatura.

Para a concentração $6,70 \times 10^9$, os tratamentos apresentaram mortalidade final de 76,9%, enquanto que os tratamentos $6,81 \times 10^7$, $5,14 \times 10^6$, $5,03 \times 10^5$ e $3,55 \times 10^4$, apresentaram respectivamente 75,2%, 78,7%, 77,0%, 74,5% (Tabela 8 em Anexo). Para o controle, esse valor foi de 29,1%.

O tempo médio de sobrevivência (MTS) não apresentou diferença estatística, mas todos diferiram em relação ao controle.

Para o tratamento $6,70 \times 10^9$ o MTS foi de 5,90 dias, para $6,81 \times 10^7$ de 5,62 dias, para $5,14 \times 10^6$ de 5,73 dias, para $5,03 \times 10^5$ de 6,23 dias e para $3,55 \times 10^4$ de 5,80 dias (Figura 17, tabela 13 em Anexo).

Para as concentrações de 100%, 25% e 1% de metabólitos, temos que a mortalidade final foi de 72,9%, 65,8%, 67,0%, respectivamente. Já o controle, foi observado uma mortalidade de 29,1%.

Com relação ao tempo médio de sobrevivência (MTS), ele também não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, mas todos diferiram em relação ao controle. Para o tratamento “100%” foi de 6,46 dias, para “25%” de 6,55 dias e para “1%” de 6,73 dias (Figura 17, Tabela 13 em Anexo).

Desse modo, conclui-se que para este isolado, os tratamentos apresentaram virulência aproximadas para *D. maidis*.

Vale ressaltar que os tratamentos $6,81 \times 10^7$, $5,14 \times 10^6$, foram os dois tratamentos que apresentaram uma diferença estatística em relação ao tempo médio sobrevivência (MTS) em relação aos tratamentos de apenas metabólitos (M), apresentando um controle mais rápido da praga.

4.2 Pigmentação da *Dalbulus maidis*

Durante as análises periódicas dos bionessaio, foi possível perceber que as cigarrinhas-do-milho (*Dalbulus maidis*) se pigmentavam na coloração arroxeada, típica da *Chromobacterium* spp para todos os isolados testados.



Figura 18 - *Dalbulus maidis* contaminada com *Chromobacterium paludis* (6200) após 4 dias de bioensaio

5 DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos o efeito de cinco espécies de bactérias Gram-negativas e não esporulantes do gênero *Chromobacterium* contra a mais importante praga do milho, a cigarrinha *D. maidis*. Estudamos também a virulência em função de diferentes concentrações de células e metabólitos do isolado 6200 de *C. paludis*. No experimento com as cinco espécies de *Chromobacterium* não foi notado diferença estatística entre a aplicação dos metabólitos, do caldo fermentado bruto (células mais metabolitos) ou somente das células, exceto para o isolado 6200 em que os metabólitos foram mais virulentos em relação ao tratamento com bactérias.

A rápida mortalidade da praga é uma característica desejável uma vez que quanto mais rápidos conseguirmos controlar o inseto em campo, menos danos haverá na lavoura e, conseqüentemente, menos perdas produtivas para o agricultor.

Em uma lavoura convencional, o momento de plântulas e os primeiros estádios fenológicos da cultura são os mais sensíveis, sendo que 10 adultos de cigarrinhas por planta reduzem em até 60% em massa seca da parte aérea e radicular da planta, apenas por meio da sucção que o inseto realiza (CRUZ et al, 2012).

De maneira geral os isolados de *Chromobacterium* prospectados neste estudo demoraram cerca de cinco a seis dias para causar morte em 50% da população de insetos. Em termos práticos e considerando um inseto vetor é desejado que a morte do inseto seja rápida para evitar a transmissão dos patógenos para as plantas.

Porém, embora o tempo para causar mortalidade possa ser longo, possíveis efeitos nocivos das *Chromobacterium* nos fitopatógenos que circulam no interior do inseto permanece desconhecido.

O controle biológico de pragas com bactérias é feito com cepas da espécie *Bacillus thuringiensis* que tradicionalmente controlam lagartas de instares menores e cujo mecanismo de ação é conhecido.

Considerando insetos sugadores existem relatos de isolados de *B. thuringiensis* que conseguem controlar fêmeas do inseto *Buenoa tarsalis* (Hemiptera Notonectidae) em aproximadamente 125 horas após aplicação (aproximadamente 5,2 dias) (GUTIÉRREZ, 2017), sendo um valor relativamente próximo ao encontrado para *Chromobacterium* spp no controle da cigarrinha-do-milho.

Diferentemente de *B. thuringiensis*, o mecanismo de ação das *Chromobacterium* contra insetos é pouco conhecido. Na literatura os relatos apontam para efeitos relacionados as células e aos metabólitos produzidos ao longo do cultivo.

Outra característica da *Chromobacterium*, em especial da espécie *C. subtsugae* é a diversidade de hospedeiros susceptíveis que vão desde ácaros (Dara et al. 2018), besouros (Martin et al. 2007), sugadores (SHANNAG; CAPINERA, 2018, Martin et al. 2007) e dípteros (WISE et al., 2018).

Neste estudo relatamos alguns insetos pigmentados de roxo, o que é indicio de uma possível colonização do inseto pela *Chromobacterium*. Uma vez que as bactérias não apresentam estruturas de penetração como no caso dos fungos como apressório e a produção de enzimas digestivas da cutícula (ZHANG et al., 2010), levantou-se algumas hipóteses em relação a forma dessa contaminação ocorrer, uma vez que pouco se sabe sobre a forma de ação desta bactéria em insetos sugadores.

Sugere-se algumas linhas de pesquisa para analisar as hipóteses levantadas, uma vez que a contaminação pode ocorrer pelos espiráculos e, de alguma forma, contaminar a hemolinfa do inseto, pigmentando seu corpo como um todo, assim como na imagem observada (Figura 18), por ser uma região mais úmida e de trocas gasosas do inseto com o meio ambiente.

Outra possibilidade, seria por meio da entrada dessas bactérias nas células estomáticas da planta e, de alguma forma, entrar em contato com o inseto durante a sua sucção de seiva.

Além disso, a cigarrinha apresenta um comportamento muito particular, em virtude de suas antenas não possuírem uma capacidade sensitiva tão aguçada como alguns sugadores como o psílídeo por exemplo, apresentando sensílas labiais, ou seja, uma estrutura capaz de sentir as plantas antes de iniciar a sução, tocando a superfície da planta com seu aparelho bucal e ingerindo a bactéria (BACKUS, 1988).

Este achado sugere que a *Chromobacterium* spp pode, de alguma forma produzir substâncias que afetam o comportamento e o metabolismo da cigarrinha, sendo necessários mais estudos para confirmar essa hipótese.

Neste estudo selecionamos o isolado 6200 da espécie *C. paludis* descrita em 2020 e isolada de uma região de lagos nos Estados Unidos (Blackburn et al. 2020) para os estudos de dose resposta. Uma questão interessante a ser considerada em

relação a essa cepa, em comparação com as demais, é o seu odor característico, que é mais intenso.

Esse fenômeno pode estar relacionado a uma possível alteração no comportamento das cigarrinhas durante sua alimentação, permitindo que o inseto evite a planta. Além disso, o que foi possível perceber é que para os tratamentos de “M” boa parte do controle de sobrevivência da *D. maidis* ocorreu nos primeiros 5 dias de ensaio, reduzindo sua velocidade de controle a partir deste tempo.

Logo, percebe-se que os metabólitos podem ter um potencial de morte em até 6 dias de aplicação para controlar a praga, salvo a cepa 6201 com o valor de MTS de 6,17, continuando de modo mais discreto nos demais dias do ensaio.

Considerando o experimento com o isolado 6200 chama a atenção que os tratamentos que apresentavam apenas metabólitos diferiram estatisticamente apenas das concentrações de $6,81 \times 10^7$ e $5,14 \times 10^6$. Ambas concentrações foram as que mais rapidamente controlaram as cigarrinhas quando comparados a todos os demais tratamentos analisados.

Além disso, o tratamento que apresentou maior concentração de bactérias e metabólitos ($6,70 \times 10^9$) não apresentou o maior controle da praga, sem sequer diferir dos tratamentos com apenas metabólitos. Isso despertou a atenção, uma vez que se imaginava que, assim como no caso dos fungos, maiores concentrações dos agentes microbiológicos controlariam de maneira mais eficaz a praga.

Contudo, como isso não ocorreu, foi realizada uma discussão acerca do que poderia ter ocorrido e chegou-se à conclusão de que isso pode estar relacionado com alguma atividade de *Quorum sensing*.

Quorum sensing é um mecanismo de comunicação célula a célula que pode ocorrer tanto entre micro-organismos da mesma espécie quanto entre espécies diferentes. Esse processo é dependente da densidade populacional no ambiente, sendo regulado por estímulos e respostas emitidos pelas células (SOLA et al., 2012).

Esse mecanismo de comunicação ocorre em proteobactérias Gram negativas que apresentam uma proteína do tipo LuxIR que, em conjunto com outros mecanismos de comunicação, conseguem perceber os sinais emitidos por células da mesma espécie, reconhecendo e identificando sinais (MANEFIELD et al., 2002).

Logo, o micro-organismo tem a capacidade de liberar e detectar autoindutores conforme a densidade populacional cresce, aumentando a concentração desses compostos.

A medida que essa concentração de sinalizadores e metabólitos se torna crítica à espécie, pode haver um estresse oxidativo, acúmulo de metabólitos tóxicos, depleção de nutrientes, desencadeando a expressão de alguns genes específicos expressando bioluminescência, sintetização de biofilmes, produção de toxinas e demais ações que podem reduzir a virulência do micro-organismo (WATERS et al., 2005; MANEFIELD et al., 2002).

No caso do presente estudo, acreditamos que as maiores concentrações de calda podem estar relacionadas ao sistema de *Quorum sensing*, inibindo alguma atividade metabólica associada a virulência desta espécie de bactéria. Diante disso para uma eventual recomendação de aplicação de *C. paludis* em campo para controle de cigarrinha, seria indicado uma calda na concentração de $5,14 \times 10^6$ /mL.

6 CONCLUSÕES

Os experimentos conduzidos com as cepas de *Chromobacterium* demonstraram resultados promissores no controle da praga *D. maidis*, evidenciando a potencial eficácia desses micro-organismos no manejo biológico de cigarrinhas-do-milho. Durante o estudo, foram analisados três tipos de tratamentos para cada cepa: caldo fermentado completo (contendo bactérias e metabólitos), outro contendo apenas bactérias e, por fim, apenas metabólitos, buscando identificar a forma mais eficaz de controle.

Os resultados obtidos destacaram a potencialidade das diferentes cepas de *Chromobacterium* spp no controle da cigarrinha-do-milho, com variações significativas na eficácia dos tratamentos em relação ao controle. Observou-se que o isolado *C. paludis* 6200 apresentou uma eficiência superior em comparação aos demais, especialmente nos tratamentos contendo apenas metabólitos (M) e a combinação de bactérias e metabólitos (B+M).

A análise estatística revelou que o tratamento com apenas metabólitos proporcionou uma redução mais rápida da população de cigarrinhas, controlando 40% (figura 12) da praga em apenas dois dias, enquanto o tratamento com a combinação de bactérias e metabólitos levou quatro dias para alcançar resultados semelhantes.

Além disso, os resultados indicaram o tratamento com apenas metabólitos se destacou por seu efeito rápido, o que é extremamente relevante para minimizar os danos às lavouras de milho, especialmente nos estágios iniciais de desenvolvimento das plantas.

Para a cepa *C. sphagni* 6198, o tratamento B+M foi o mais eficaz ao longo do tempo, com uma taxa final de controle de 76,6% (Tabela 5 em Anexo). A cepa *C. alticaptis* (6201) apresentou comportamento similar, embora com uma taxa final de controle um pouco menor para o tratamento B+M (68,1%) que foi o tratamento que mais se destacou.

Em ambas as cepas, os tratamentos com metabólitos e bactérias isoladas não diferiram significativamente em termos estatísticos para MTS, mas demonstraram uma redução significativa em comparação ao controle.

As cepas *Chromobacterium subtsugae* 6199 e *C. amazonense* 6197 também apresentaram um bom controle da praga, mas sem diferenças estatísticas

significativas para o MTS entre os tratamentos “M+B”, “B” e “M” dentro de uma mesma cepa.

No entanto, todos os tratamentos diferiram estatisticamente do controle, destacando a eficácia das cepas no controle da praga.

Os ensaios de dose com a cepa 6200 revelaram que diferentes concentrações de metabólitos não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si para MTS, mesmo com variações na concentração de 100% para 1% do metabólito aplicado.

Esse resultado sugere a possibilidade de utilizar concentrações menores de metabólitos para um futuro produto comercial, sem comprometer a eficácia no controle da praga. As concentrações de $6,81 \times 10^7$ e $5,14 \times 10^6$ foram as que mais rapidamente controlaram as cigarrinhas, destacando-se como potenciais concentrações ideais para aplicação.

Vale a pena destacar que o tratamento com maior concentração $6,70 \times 10^9$ não se diferenciou dos demais tratamentos envolvendo metabólitos exclusivamente, com uma mortalidade mais baixa que os tratamentos com concentrações de $6,81 \times 10^7$ e $5,14 \times 10^6$. Diante disso, altas concentrações de *Chromobacterium* podem estar relacionadas a algum tipo de ativação para a bactéria expressar Quorum sensing.

Em conclusão, este estudo demonstrou que as cepas de *Chromobacterium* spp possuem um grande potencial como agentes de controle biológico de *Dalbulus maidis*, especialmente através de seus metabólitos. A cepa 6200, em particular, se destacou e foi selecionada para futuros estudos de dose-resposta, visando desenvolver um produto comercial eficaz e sustentável para o controle dessa praga.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, A. A. ***Chromobacterium violaceum***: caracterização cultural, bioquímica, molecular e detecção da produção de polihidroxialcanoato-PHA. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. p. 1–85. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/2024>. Acesso em: 24 jun. 2024.
- ANTUNES, L. C. M.; FERREIRA, R. B. R.; BUCKNER, M. M. C.; FINLAY, B. B. Quorum sensing in bacterial virulence. **Microbiology**, v. 156, n. 8, p. 2271–2282, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.038794-0>. Acesso em: 24 jun. 2024.
- BACKUS, E. A. Sensory systems and behaviours which mediate hemipteran plant-feeding: a taxonomic overview. **Journal of Insect Physiology**, v. 34, n. 3, p. 1–15, 1988. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022191088900455>. Acesso em: 24 jun. 2024.
- BERGOZINI, C. Um nuevo bacterio colorato, **Annuario Della Società dei Naturalisti in Modena Ser.2**, v.14, p. 149-158, 1881.
- BLACKBURN, M. B.; FARRAR, R. R.; SPARKS, M. E.; KUCHAR, D.; MITCHELL, A.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E. *Chromobacterium sphagni* sp. Nov., an insecticidal bacterium isolated from *sphagnum* bogs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 3417–3422, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002127>. Acesso em: 24 jun. 2024.
- BLACKBURN, M. B.; FARRAR, R. R.; SPARKS, M. E.; KUCHAR, D.; MOWERY, J. D.; MITCHELL, A.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E. *Chromobacterium paludis* Sp. Nov., a novel bacterium isolated from a chesapeake bay marsh. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 6142–6146, 2020. Disponível em: https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/70/12/6142_ijsem004509.pdf?expires=1718740237&id=id&accname=quest&checksum=5B572CF199EE2D7A39A46339015B68DC. Acesso em: 24 jun. 2024.
- BLACKBURN, M. B.; SPARKS, M. E.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E. The genome of the insecticidal *Chromobacterium subtsugae* PRAA4-1 and its comparison with that of *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. **Genomics Data**, v. 10, p. 1–3, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gdata.2016.08.013>. Acesso em: 24 jun. 2024.
- BRADFUTE, O. E. **Corn stunt spiroplasma and viruses associated with a maize disease epidemic in southern florida plant Disease**. Wooster, 1981. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1981Abstracts/PD_65_837.htm. Acesso em: 24 jun. 2024.

CALDAS, L. R. Photochemistry and photobiology in a virgin land. **Photochemistry and Photobiology**, v. 26, p. 1-2, 1977. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-1097.1977.tb07440.x>. Acesso em: 24 jun. 2024.

CALDAS, L. R.; LEITÃO, A. A. C.; SANTOS, S. M.; TYRRELL, R. M. Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CURRENT TOPICS IN RADIATION AND PHOTOBIOLOGY, 1978. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1978. p. 121-132.

CRUZ, I.; MENDES, S. M.; VIANA, P. A. **Importância econômica e manejo de insetos sugadores associados à parte aérea de plantas de milho Bt**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2012. (Circular Técnica, 175). p. 4-6. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/945323/1/circ175.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2024.

DOEBLEY, J. F.; ILTIS, H. H. Taxonomia de Zea (Gramineae). I. Uma classificação subgenérica com chave para táxons. **American Journal of Botany**, v. 67, n. 9, p. 982-993, 1980. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1980.tb07730.x>. Acesso em: 24 jun. 2024.

DURÁN, N.; FALJONI-ALARIO, A. Bacterial chemistry-I: studies of a potencial phototherapeutic substance from *Chromobacterium violaceum*, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 52, p. 297-302, 1980. Disponível em: <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=PASCAL8110312472> . Acesso em: 24 jun. 2024.

FELDMANN, N. A.; GONZATTO, F.; MÜHL, F. R.; RHODEN, A. C.; GABRIEL, V. J. Manejo da Cigarrinha do milho *Dalbulus maidis*. **Revista Inovação**, v. 2, p. 27–91, 2023. Disponível em: <https://revistas.uceff.edu.br/inovacao/article/view/241/240>. Acesso em: 24 jun. 2024.

FLUIDIC, A. S. **Criteria for the design of “fast”, “safe” asynchronous sequential fluidic circuits**. 1967. p. 1–32. Disponível em: <https://www.proquest.com/docview/302266424?%20Theses&fromopenview=true&parentSessionId=b8dWEykTfnPcupymx4TIJQ0nJKtTIdM2Bt4nRu7tqYg%3D&pg-origsite=gscholar&sourcetype=Dissertations%20&parentSessionId=Kn6orwp6d2QzOgzDgz8xXpCk%2Bq%2FrP904NZyeLCq1ehQ%3D>. Acesso em: 24 jun. 2024.

GOLEC, J. R.; HOGE, B.; WALGENBACH, J. F. Effect of biopesticides on different *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) life stages. **Crop Protection**, v. 128, p. 105015, Feb. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.105015>. Acesso em: 24 jun. 2024.

GUTIÉRREZ, Y.; RAMOS, G. S.; TOMÉ, H. V. V.; OLIVEIRA, E. E.; SALARO, A. L. Bti-based insecticide enhances the predatory abilities of the backswimmer *Buenoa tarsalis* (Hemiptera: Notonectidae). **Ecotoxicology**, v. 26, n. 8, p. 1147–1155, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-017-1840-1>. Acesso em: 24 jun. 2024.

HARRISON, R. G. Dispersal polymorphisms in insects. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 11, n. 1, p. 95–118, 1980. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.es.11.110180.000523>. Acesso em 24 jun. 2024.

HARRISON, A. M.; SOBY, S. D. Reclassification of *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 and its quorum biosensor mutant CV026 to *Chromobacterium subtsugae*. **AMB Express**, v. 10, n. 1, p. 1–7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01140-1>. Acesso em 24 jun. 2024

HEADY, S. E.; MADDEN, L. V.; NAULT, L. R. Oviposition behavior of *Dalbulus* leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 78, p. 723–727, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/aesa/78.6.723>. Acesso em: 24 jun. 2024.

KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. **Boletim Científico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo**, v. 31, p. 1–8, 1972. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/brag/a/WLN77hLWB5VhmSx8KtbwZGp/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 24 jun. 2024.

KOIVUNEN, M.; CHANBUSARAKUM, L.; FERNÁNDEZ, L.; ASOLKAR, R.; TAN, E.; WALLNER, D.; MARRONE, P. Future research and development in the use of microbial agents and nematodes for biological insect control. **Bulletin OILB srop**, v. 45, p. 257–260, 2009. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20113277850>. Acesso em: 24 jun. 2024.

MANEFIELD, M.; TURNER, S. L. Quorum sensing in context: out of molecular biology and into microbial ecology. **Microbiology**, v. 148, n. 12, p. 3762–3764, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00221287-148-12-3762>. Acesso em: 24 jun. 2024.

MARQUES.T. Programa genoma nacional finaliza seqüenciamento da bactéria *Chromobacterium violaceum*. **Revista FAPESP**, v. 71, p. 1–81, 2002. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/folheie-a-ed-71/> . Acesso em: 24 jun. 2024.

MARÍN, R. **Catalogo de los himenopteros calcidoideos de America al sur de Los Estados Unidos** Revista Peruana de Entomologia, 1987. Disponível em: <https://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/entomologia/v24/pdf/a01v24.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2024.

MARTIN, P. A. W.; GUNDERSEN-RINDAL, D.; BLACKBURN, M.; BUYER, J. *Chromobacterium subtsugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 993–999, 2007a. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/57/5/993.pdf?expires=1718740677&id=id&accname=guest&checksum=EF4F24D5B949F3C75F27DBF780A0F9F7>. Acesso em: 24 jun. 2024.

MARTIN, P.; SHROPSHIRE, A.; GUNDERSEN-RINDAL, D.; BLACKBURN, M. *Chromobacterium subtsugae* sp. nov. and use for control of insect pests. **US Patent Office**, v. 2, n. 19, p. 12, 2007b. Disponível em:

<https://patents.google.com/patent/US7244607B2/en%0Ahttp://www.google.com/patents?hl=en&lr=&vid=USPATAPP11704565&id=zgyjAAAAEBAJ&oi=fnd&dq=CHROMOBACTERIUM+SUBTSUGAE+SP.NOV.AND+USE+FOR+CONTROL+OF+INSECT+PESTS&printsec=abstract>. Acesso em: 24 jun. 2024.

MENEZES, C. B. A.; TONIN, M. F.; CORRÊA, D. B. A.; PARMA, M.; DE MELO, I. S.; ZUCCHI, T. D.; DESTÉFANO, S. A. L.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.

Chromobacterium amazonense sp. nov. isolated from water samples from the Rio Negro, Amazon, Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, n. 4, p. 1057–1063, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-015-0397-3>. Acesso em: 24 jun. 2024.

NAULT, L. R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. **Phytopathology**, v. 70, n. 7, p. 659 -662, 1980. Disponível em:

https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1980Abstracts/Phyto70_659.htm. Acesso em: 24 jun. 2024.

NAULT, L. Origins of leafhopper vectors of maize pathogens in Mesoamerica.

Proceedings of the International Maize Virus Diseases Colloquium and Workshop, p. 75–82, Jan. 1983. Disponível em: <http://ag.udel.edu/delpha/71113.pdf> . Acesso em: 24 jun. 2024.

NAULT, L. R., & MADDEN, L. V. Estratégias ecológicas de cigarrinhas *Dalbulus*.

Ecological Entomology, v. 10, n. 1, p. 57-63, 1985. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1985.tb00534.x>. Acesso em: 24 jun. 2024.

NAULT, L. R. Evolução de uma praga de insetos: milho e cigarrinha do milho, um estudo de caso. **Revista Maydica**, v. 35, n. 1, p. 165-175. 1990.

OLIVEIRA, E.; WAQUIL, J. M.; FERNANDES, F. T.; PAIVA, E.; RESENDE, R. O.; KITAJIMA, E. W. “Enfezamento Pálido” e “Enfezamento Vermelho” na cultura do milho no Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 45–47, 1998.

Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/43431/1/Enfezamento-palido.pdf>
Acesso em: 24 jun. 2024.

OLIVEIRA, E.; MAGALHÃES, P. C.; GOMIDE, R. L.; VASCONCELOS, C. A.; SOUZA, I. R. P.; OLIVEIRA, C. M.; CRUZ, I.; SCHAFFERT, R. E. Growth and nutrition of mollicute-infected maize. **Plant Disease**, v. 86, n. 9, p. 945–949, 2002.

Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS.2002.86.9.945>. Acesso em: 24 jun. 2024.

OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. D. O.; PECCI, M. D. L. P. G.; LAGUNA, I. G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Occurrence of viruses and stunting diseases and estimative of yield losses by mollicutes in corn in Paraná State, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 19–25, 2003. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/pab/a/YQWLGmyHy3Qk8nPGNLvdZJj/> . Acesso em: 24 jun. 2024.

OLIVEIRA, C. M.; FRIZZAS, M. R.; DE OLIVEIRA, E. Overwintering plants for *Dalbulus maidis* (DeLong and Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) adults during the maize off-season in central Brazil. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 40, n. 4, p. 105–111, 2020. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/341676368_Overwintering_plants_for_Dalbulus_maidis_DeLong_and_Wolcott_Hemiptera_Cicadellidae_adults_during_the_maize_off-season_in_central_Brazil. Acesso em: 24 Jun. 2024.

OLIVEIRA, C. M. de; FRIZZAS, M. R. Eight Decades of *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera, Cicadellidae) in Brazil: What We Know and What We Need to Know. **Neotropical Entomology**, v. 51, n. 1, p. 1–17, 2022. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s13744-021-00932-9> . Acesso em: 24 jun. 2024.

PEDREIRA, B. C.; DOMICIANO, L. F.; RODRIGUES, R. R. de A.; MORAES, S. R. G.; MAGALHÃES, C. A. de S.; MATOS, E. da S.; ZOLIN, C. A. **Integração lavoura-pecuária: novas tendências**. 2017. Lavras: Núcleo de Estudos em Fitopatologia. p. 128–160. Disponível em:

<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1081184/1/Cap9Novossistemasdeproducao2017.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2024.

PINTO, M. R. CIGARRINHA-DO-MILHO (*Dalbulus maidis*) e o complexo dos enfezamentos: características de transmissão, disseminação e controle. 2021.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Agrônoma) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 39 p. Disponível em:

<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/13756/TFG%20Murilo%20Pinto%20Final%2022-01-2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 24 jun. 2024.

PITLOVANCIV, A. K.; CARIS, M. É.; LUISMAR MARQUES PORTO, R. C. P.;

ANTÔNIO, R. V. Atividade antibiótica de extratos obtidos de culturas de *chromobacterium violaceum*. **Biotemas**, v. 19, n. 1, p. 1–93, 2006. Disponível em:

<https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/21239/19208> . Acesso em: 24 jun. 2024.

PONTE, R.; JENKINS, S. G. Fatal *Chromobacterium violaceum* infections associated with exposure to stagnant waters. **Analytical Biochemistry**, v. 11, n. 1, p. 1–5, 2018. Disponível em:

https://journals.lww.com/pidj/_layouts/15/oaks.journals/downloadpdf.aspx?an=00006454-199207000-00013. Acesso em: 24 jun. 2024.

RIBEIRO, L. do P.; CANALE, M. C. Cigarrinha-do-milho e o complexo de enfezamentos em Santa Catarina: panorama, patossistema e estratégias de manejo. **Agropecuária Catarinense**, v. 34, n. 2, p. 22–25, 2021. Disponível em:

<https://publicacoes.epagri.sc.gov.br/rac/article/view/1144>. Acesso em: 24 jun. 2024.

SABATO, E. O.; LANDAU, E. C.; BARROS, B. A.; OLIVEIRA, C. M. Differential transmission of phytoplasma and spiropasma to maize caused by variation in the environmental temperature in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 157, n. 1, p. 163–171, 2020. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-020-01997-9>. Acesso em: 24 jun. 2024.

SANTOS, A. B.; COSTA, P. S.; CARMO, A. O. do; FERNANDES, G. da R.; SCHOLTE, L. L. S.; RUIZ, J.; KALAPOTHAKIS, E.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Insights into the genome sequence of *Chromobacterium amazonense* isolated from a tropical freshwater Lake. **International Journal of Genomics**, v. 2018, p. 1–11, 2018. Disponível em:

<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/28396?show=full> . Acesso em: 24 jun. 2024.

SHANNAG, H. K.; CAPINERA, J. L. comparative effects of two novel betaproteobacteriabased insecticides on *myzus persicae* (hemiptera: aphididae) and *phenacoccus madeirensis* (Hemiptera: Pseudococcidae). **Florida Entomologist**, v. 101, n. 2, p. 212–218, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1653/024.101.0209> . Acesso em: 24 jun. 2024.

SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A. P. de; FEISTEL, J. C.; REZENDE, C. S. M. e. Automated titrations using a discontinuous programmed flow analyzer. **Analytical Chemistry**, v. 61, n. 18, p. 2109–2116, 1989. Disponível em:

<https://www.conhecer.org.br/enciclop/2012a/biologicas/mecanismos.pdf> . Acesso em: 24 jun. 2024.

VERO, S.; GARMENDIA, G.; ALLORI, E.; SANZ, J.M.; GONDA, M.; ALCONADA, T.; CAVELLO, I.; DIB, J.R.; DIAZ, M.A.; NALLY, C.; et al. Microbial biopesticides: diversity, scope, and mechanisms involved in plant disease control. **Diversity**, v. 15, n. 3, p. 457, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/d15030457>. Acesso em: 24 jun. 2024.

VILANOVA, E. de S. **Efeito do estágio de desenvolvimento da planta e densidade populacional do inseto vetor, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), sobre a transmissão e danos do fitoplasma do milho.** 2021. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.11606/D.11.2021.tde-26052021-105522>. Acesso em: 24 jun. 2024.

WAQUIL, J. M. Cigarrinha-do-milho: vetor de mollicutes e vírus. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2004. p. 1–7. (Circular Técnica, 41). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/489055/1/Circ41.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2024.

WAQUIL, J. M. Corn leafhoppers as vectors of maize pathogens in Brazil. **Diagnosing maize diseases in Latin America**. Ithaca: ISAAA ; Brasília: EMBRAPA, 1998. n. 9, p. 18–21. Disponível em:

<https://isaaa.org/resources/publications/briefs/09/download/isaaa-brief-09-1998.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2024.

WAQUIL, J.; OLIVEIRA, E.; PINTO, N.; FERNANDES, F.; CORRÊA, L. Efeito na produção e incidência de viroses em híbridos comerciais de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 460–463, 1996. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/478824/1/Efeitoproducao.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2024.

WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 319–346, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16212498/>. Acesso em: 24 jun. 2024.

WEE, Y. L. Evaluation of cyantraniliprole, spinetoram, and *chromobacterium subtsugae* extract in bait for killing and reducing oviposition of *rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 113, n. 3, p. 1356–1362, 2020. Disponível em : <https://academic.oup.com/jee/article/113/3/1356/5816331>. Acesso em: 24 jun. 2024.

WILKES, H. G. Maize and its wild relatives. **Science**, v. 177, n. 4054, p. 1071–1077, 1972. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.177.4054.1071>. Acesso em: 24 jun. 2024.

WISE, J. C.; VANWOERKOM, A. H.; WHEELER, C. E.; ISAACS, R. Control of Spotted Wing Drosophila in Blueberries, 2017. **Arthropod Management Tests**, v. 43, n. 1, p. 1–2, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/amt/tsy063>. Acesso em: 24 jun. 2024.

YOUNG, C. C.; ARUN, A. B.; LAI, W. A.; CHEN, W. M.; CHAO, J. H.; SHEN, F. T.; REKHA, P. D.; KÄMPFER, P. *Chromobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from spring water samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 877–880, 2008. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.65573-0>. Acesso em 24 jun. 2024.

ANEXOS

Tabela 5 - Mortalidade de *Dalbulus maidis* em porcentagem com valores exatos que foram obtidos da média dos ensaios realizados

Numeração	Tratamentos	Dose aplicada	% Mortes
T1	6200- Bac + Met	1,19E+09	72,2
T2	6201- Bac + Met	6,99E+09	68,1
T3	6197 - Bac + Met	0,00E+00	59,5
T4	6198 - Bac + Met	3,57E+08	76,6
T5	6199 - Bac + Met	2,38E+08	68,2
T6	6200 - Bac	3,20E+09	56,1
T7	6201 - Bac	1,16E+09	57,7
T8	6197 - Bac	0,00E+00	67,3
T9	6198 - Bac	3,87E+08	67,6
T10	6199 - Bac	1,50E+09	61,5
T11	6200- Met	-	65,4
T12	6201 - Met	-	65,4
T13	6197 - Met	-	67,5
T14	6198 - Met	-	65,0
T15	6199 - Met	-	74,3
T16	Controle	-	22,9

Tabela 6 - Valores da concentração exata aplicada em cada um dos tratamentos no bioensaio 1

Tratamento	Cepa	Concentração aplicada
T1	6200Filtrado	1,43E+09
T2	6201Filtrado	9,63E+09
T3	6198 Filtrado	6,65E+08
T4	6197 Filtrado	0,00E+00
T5	6199 Filtrado	4,55E+08
T6	6200	3,65E+09
T7	6201	1,26E+09
T8	6198	7,10E+08
T9	6197	0,00E+00
T10	6199	2,85E+09

Tabela 7 - Valores da concentração exata aplicada em cada um dos tratamentos no bioensaio 2

Tratamento	Cepa	Concentração aplicada
T1	6200 Filtrado	9,40E+08
T2	6201 Filtrado	4,35E+09
T3	6198 Filtrado	4,85E+07
T4	6197 Filtrado	0,00E+00
T5	6199 Filtrado	2,00E+07
T6	6200	2,75E+09
T7	6201	1,06E+09
T8	6198	6,30E+07
T9	6197	0,00E+00
T10	6199	1,43E+08

Tabela 8 - Porcentagem exata de sobrevivência e morte de cada um dos tratamentos para os bioensaio de dose

Numeração	Dose aplicada	% Mortes
T1	6,70E+09	76,9
T2	6,81E+07	75,2
T3	5,14E+06	78,7
T4	5,03E+05	77,0
T5	3,55E+04	74,5
T6	100% met	72,9
T7	25% met	65,8
T8	1% met	67,0
T9	-	29,1

Tabela 9 – Tempo médio de sobrevivência para os ensaios das diferentes cepas

Tratamento	Tempo médio de sobrevivência (MTS)	95% Conf. Lower	95% Conf. Upper
Controle	>8	>8	>8
6200 Bact + Met	5,97	5,35	6,59
6201 Bact + Met	5,74	5,05	6,43
6197 Bact + Met	6,48	5,77	7,18
6198 Bact + Met	5,64	5,07	6,22
6199 Bact + Met	6,63	6,11	7,15
6200Bact	6,28	5,67	6,89
6201Bact	6,69	6,13	7,25
6197 Bact	6,52	5,98	7,05
6198 Bact	6,29	5,76	6,82
6199 Bact	6,01	5,41	6,62
6200Met	5,06	4,42	5,71
6201Met	6,17	5,54	6,79
6197 Met	5,86	5,22	6,49
6198 Met	5,99	5,37	6,61
6199 Met	5,99	5,37	6,60

Tabela 10 - Valores da concentração aplicada em cada um dos tratamentos no bioensaio de dose 1

Tratamento	Concentração
T1	1,10E+10
T2	1,07E+08
T3	2,34E+06
T4	7,75E+05
T5	6,95E+04

Tabela 11 - Valores da concentração aplicada em cada um dos tratamentos no bioensaio de dose 2

Tratamento	Concentração
T1	8,80E+09
T2	9,50E+07
T3	1,28E+07
T4	7,05E+05
T5	6,85E+04

Tabela 12 - Valores da concentração aplicada em cada um dos tratamentos no bioensaio de dose 3

Tratamento	Concentração
T1	3,00E+08
T2	2,20E+06
T3	2,85E+05
T4	2,90E+04
T5	2,55E+03

Tabela 13 – Tempo médio de sobrevivência para os ensaios de doses

Tratamento	Tempo médio de sobrevivência (MTS)	95% Lower Conf.	95% Upper Conf.
Controle	>8	>8	>8
6,70E+09	5,90	5,44	6,36
6,81E+07	5,62	5,15	6,09
5,14E+06	5,73	5,33	6,14
5,03E+05	6,23	5,83	6,64
3,55E+04	5,80	5,34	6,25
100% M	6,46	6,04	6,89
25% M	6,55	6,13	6,98
1% M	6,73	6,34	7,13