

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

**INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Spodoptera frugiperda* E
FITOPATÓGENOS CAUSADOS POR ISOLADOS
BACTERIANOS OBTIDOS DE LAGARTAS INFECTADAS
COM MICRORGANISMOS DO SOLO**

Cinara Ramos Sales
Engenheira Agrônoma

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

**INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Spodoptera frugiperda* E
FITOPATÓGENO CAUSADOS POR ISOLADOS
BACTERIANOS OBTIDOS DE LAGARTAS INFECTADAS
COM MICRORGANISMOS DO SOLO**

Discente: Cinara Ramos Sales

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Coorientador: Dr. Renato Farinacio

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

2021

S163i Sales, Cinara Ramos
Inibição do crescimento de Spodoptera frugiperda e fitopatógenos causados por isolados bacterianos obtidos de lagartas infectadas com microrganismos do solo / Cinara Ramos Sales. -- Jaboticabal, 2021
56 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos
Coorientador: Renato Farinacio

1. Microbiologia agrícola. 2. Fitopatologia. 3. Micro-organismos. 4. Pragas agrícolas. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Spodoptera frugiperda* E FITOPATÓGENOS CAUSADOS POR ISOLADOS BACTERIANOS OBTIDOS DE LAGARTAS INFECTADAS COM MICRORGANISMOS DO SOLO

AUTORA: CINARA RAMOS SALES

ORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

COORIENTADOR: RENATO FARINACIO

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

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

Profa. Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. ELENI GOMES (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / UNESP/Câmpus de São José do Rio Preto

Jaboticabal, 23 de fevereiro de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Cinara Ramos Sales, nasceu no município de Serra do Ramalho-BA, em 15 de março de 1993, residiu nesse município até os 4 anos de idade, depois mudou com seus pais para cidade Barreiras – BA, onde em 2012 iniciou a graduação no curso de Engenharia Agrônômica da Universidade do estado da Bahia (UNEB), nesta foi bolsista de iniciação científica, fez parte da equipe do Laboratório de Entomologia agrícola onde desenvolveu o trabalho de conclusão de curso intitulado “Eficiência de inseticidas químicos no controle do bicudo (*Anthonomus grandis*) (Boheman, 1843) por contaminação tarsal e contato”. O estágio obrigatório foi realizado na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sendo o trabalho desenvolvido publicado na revista “Apidologie” intitulado “Climate change can affect the spatial association between stingless bees and *Mimosa scabrella* in the Brazilian Atlantic Forest”. Iniciou em 2019 o mestrado em Microbiologia Agropecuária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista (FCAV-Unesp), onde desenvolveu a presente dissertação.

EPÍGRAFE

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Domingos e Luzia (*in memorian*) e irmãos aos quais certamente jamais serei capaz retribuir todo o apoio, incentivo e ensinamentos transmitidos no decorrer de minha formação pessoal e acadêmica.

Ao meu namorado Afonso Penna, por todo amor, carinho, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos em que precisei, pela paciência, pela calma e apoio em tantos momentos difíceis desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida, por iluminar meus caminhos e que me permitiu mais esta conquista.

A Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, pela orientação no decorrer deste trabalho, apoio, ensinamentos e amizade. Sempre entusiasmada para o desenvolvimento de novas pesquisas e na busca da excelência de suas produções, sem se abalar pelas adversidades enfrentadas. Certamente a tenho como uma referência a ser seguida.

Ao Dr. Renato Farinacio, pela coorientação, por ser sempre muito atencioso amigo e disposto a colaborar, em nossas conversas continuamente surgiram excelentes conselhos e por toda a transmissão de seus conhecimentos durante toda realização do trabalho.

Ao técnico Dr. João Carlos Campanharo, por todo o apoio e colaboração, sem dúvidas um mentor nos aspectos práticos da microbiologia, necessários a execução deste trabalho.

A técnica Dra. Camila Cesário Fernandes, por todo o apoio dado em assuntos relacionados à área de biologia molecular.

Ao Prof. Dr. João Pizzauco por me receber em seu laboratório e possibilitar o desenvolvimento dos bioensaios de inibição fúngica.

Ao Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes e ao técnico André Maurício Múscari pelo fornecimento de posturas de *Spodoptera frugiperda*, sempre muito atenciosos.

A todos os membros do Laboratório de Bioquímica de Microrganismo e Plantas pela ajuda em diversas etapas deste trabalho, e principalmente, por toda a amizade e companheirismo no decorrer destes anos.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, câmpus Jaboticabal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES - Código de Financiamento 001).

Aos autores citados nesta dissertação, entre outros, os quais, através de suas publicações forneceram embasamento prático e teórico para elaboração, desenvolvimento e interpretação deste trabalho.

E a todos os demais que, direta ou indiretamente, colaboraram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

Página

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1.	Importância Econômica da Agricultura.....	3
2.2.	Perda de Produtividade por Ataques de Insetos-praga	3
2.3.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	4
2.4.	Formas de Controle de <i>Spodoptera frugiperda</i>	5
2.4.1.	Controle Químico	6
2.4.2.	Controle Biológico de <i>Spodoptera frugiperda</i>	7
2.4.3.	<i>Bacillus thuringiensis</i>	8
2.5.	Perda de Produtividade por Fungos Fitopatogênicos.....	8
2.5.1.	<i>Fusarium</i>	10
2.5.2.	<i>Colletotrichum</i>	9
2.5.3.	<i>Sclerotinia</i>	11
2.5.4.	<i>Didymella</i>	12
2.6.	Controle Químico e Biológico de Fungos Fitopatogênicos	13
2.7.	Bioprospecção de Microrganismos	14
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1.	Coleta do solo	15
3.2.	Infecção de <i>Spodoptera frugiperda</i> por entomopatógeno	16
3.3.	Isolamento bacteriano	16
3.4.	Bioensaios com <i>Spodoptera frugiperda</i>	17
3.5.	Bioensaio Quantitativo de Inibição com <i>Spodoptera frugiperda</i>	17

3.6.	Bioensaio de inibição fúngica.....	18
3.7.	Sequenciamento do gene rRNA 16S.....	19
3.8.	Curva de crescimento e atividade inseticida	19
3.9.	Formas de análise dos resultados	20
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1.	Infecção de <i>Spodoptera frugiperda</i> e isolamento bacteriano	20
4.2.	Seleção inicial de isolados para atividade inseticida e fungicida	22
4.3.	Quantificação da atividade inseticida dos isolados selecionados	24
4.4.	Sequenciamento do gene rRNA 16S.....	24
4.5.	Curva de crescimento e atividade inseticida	27
5.	CONCLUSÕES	29
6.	REFERÊNCIAS.....	30

INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Spodoptera frugiperda* E FITOPATÓGENOS CAUSADOS POR ISOLADOS BACTERIANOS OBTIDOS DE LAGARTAS INFECTADAS COM MICRORGANISMOS DO SOLO

RESUMO – As perdas de produtividade causadas por pragas e doenças em culturas de importância agrícola acarretam grandes prejuízos econômicos em todo o mundo. Apesar da eficiência do controle químico no manejo de pragas e doenças, estes podem apresentar riscos ao meio ambiente e a saúde humana, além de seu recorrente uso favorecer a evolução da resistência. Com isso, alternativas de controle de origem biológica tem se destacado no mercado de proteção de plantas, no entanto, com um número ainda limitado de opções, em especial para os bioinseticidas de origem bacteriana, que atualmente no Brasil tem sido realizado por meio de uma única espécie, o *Bacillus thuringiensis*. Assim, se objetivou prospectar a atividade inseticida e/ou fungicida de isolados bacterianos obtidos por meio de inseto-armadilha. Neste sentido, foram isoladas bactérias de lagartas mortas por meio do método de inseto-armadilha, e posteriormente, realizada a avaliação da atividade inseticida e fungicida dos isolados, identificação dos isolados ativos por meio do sequenciamento do gene rRNA 16S e caracterização da curva de crescimento da bactéria acompanhada de sua atividade ao longo de sete dias. Na prospecção foram obtidos 70 isolados bacterianos, dos quais 10 causaram inibição do crescimento de *S. frugiperda*, por meio do sequenciamento foi possível identificar que estes se tratavam das espécies *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* e *Serratia nematodiphila*, outros sete isolados foram antagonistas de fungos fitopatogênicos, identificados como *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter tabaci*. Dos isolados ativos contra *S. frugiperda*, cinco apresentaram inibição do crescimento de lagartas superior a 90%, sendo estes *E. mundtii*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. Dos ativos contra fungos fitopatogênicos se destacaram *S. marcescens* e *E. tabaci* que inibiram três dos quatro fungos avaliados. Para a continuidade dos estudos, entre os isolados que se apresentaram ativos contra *S. frugiperda*, foi selecionada *E. mundtii* (isolado 60) devido a sua elevada atividade e por estar classificada no nível 1 de biossegurança. Na curva de crescimento e atividade inseticida deste isolado, obteve-se taxa de inibição do crescimento superior a 90 % e U.F.C. e D.O. máxima após 12

e 6 horas de cultivo, respectivamente. Assim, a partir do estudo desenvolvido, uma série de isolados bacterianos ativos contra *S. frugiperda* ou fungos fitopatogênicos foram obtidos. Entre estes isolados se destacou *E. mundtii*, que causou drástica inibição do crescimento de lagartas e apresenta escassos relatos na literatura sobre este efeito, com isso, futuros estudos serão necessários para desvendar os mecanismos envolvidos.

Palavras-chave: Bioprospecção, Controle biológico, Microrganismos

GROWTH INHIBITION OF *Spodoptera frugiperda* AND PHYTOPATHOGENS CAUSED BY BACTERIAL ISOLATES OBTAINED FROM CATERPILLARS INFECTED WITH SOIL MICROORGANISMS

ABSTRACT – Productivity losses caused by pests and diseases in crops of agricultural importance cause great economic losses all over the world. Despite the efficiency of chemical control in the management of pests and diseases, they can pose risks to the environment and human health, in addition to their recurrent use favoring the evolution of resistance. With this, biological origin control alternatives have stood out in the plant protection market, however, with a still limited number of options, especially for bacterial bioinsecticides, which currently in Brazil have been carried out through a single species, *Bacillus thuringiensis*. Thus, the objective was to prospect the insecticidal and/or fungicidal activity of bacterial isolates obtained through insect-trap. In this sense, bacteria were isolated from dead caterpillars using the insect-trap method, and subsequently, the evaluation of the insecticidal and fungicidal activity of the isolates was carried out, identification of active isolates through sequencing of the 16S rRNA gene and characterization of the growth curve of the bacterium followed by its activity over seven days. In the prospection, 70 bacterial isolates were obtained, 10 of which caused inhibition of the growth of *S. frugiperda*, through sequencing it was possible to identify that these were the species *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* and *Serratia nematodiphila*, another seven isolates were antagonists of phytopathogenic fungi identified as *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter tabaci*. Of the active isolates against *S. frugiperda*, five showed inhibition of caterpillar growth greater than 90%, these being *E. mundtii*, *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. Of the actives against phytopathogenic fungi, *S. marcescens* and *E. tabaci* stood out, which inhibited three of the four evaluated fungi. For the continuity of the studies, among the isolates that were active against *S. frugiperda*, *E. mundtii* (isolate 60) was selected due to its high activity and for being classified in level 1 of biosafety. In the growth curve and insecticidal activity of this isolate, a growth inhibition rate higher than 90% and U.F.C. It's from. maximum after 12 and 6 hours of cultivation, respectively. Thus, from the study developed, a series of

bacterial isolates active against *S. frugiperda* or phytopathogenic fungi were obtained. Among these isolates, *E. mundtii* stood out, which caused a drastic inhibition of the growth of caterpillars and has few reports in the literature on this effect, therefore, further studies will be needed to unravel the mechanisms involved.

Keywords: Bioprospecting, Biological control, Microorganisms

1. Introdução

Nos últimos anos, dentre os diversos setores da economia brasileira, a agricultura tem se destacado pela geração de empregos e renda para o país. No entanto, o setor agrícola enfrenta recorrentes perdas devido ao ataque de pragas e doenças. Sendo os danos causados por insetos-praga um dos principais fatores que levam à redução da produção das culturas (Oliveira et al., 2014).

Embora o uso dos inseticidas químicos tenha demonstrado êxito no controle de pragas agrícolas, os mesmos estão relacionados a problemas como: contaminação de águas superficiais e subterrâneas, resíduos em alimentos, evolução da resistência em populações de patógenos e pragas, além de seus impactos indesejados sobre organismos não alvos (Amorim et al., 2011).

Diversos processos biológicos ocorrem no campo da fisiologia, da bioquímica e microbiologia, que potencialmente podem oferecer soluções biotecnológicas para o controle de pragas e doenças agrícolas (Pinotti e Santos, 2013). Neste contexto, encontram-se em uso comercial bioinseticidas de origem bacteriana, que são relatados como seguros para organismos não alvo e ao homem, que não deixam resíduo problemáticos no meio ambiente e a custos relativamente acessíveis (Chattopadhyay et al., 2017).

Dentre as bactérias utilizadas no controle de pragas, se destaca *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner, 1911 (Eubacteriales: Bacillaceae), que detém o domínio do mercado de bioinseticidas de origem bacteriana (Liang et al., 2015). Esta espécie também tem sido a principal fonte de genes inseticidas para o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas. No entanto, devido ao amplo e incorreto uso desta tecnologia, é cada vez mais comum à ocorrência de casos de evolução da resistência das pragas, o que diminui os benefícios das culturas Bt (Tabashnik e Carrière, 2017).

Com isso, a descoberta de novas espécies e cepas com atividade inseticida tem sido de grande interesse, em especial as que apresentem maior eficiência e toxicidade sobre os insetos-praga, e que simultaneamente não afetem organismos não alvos (Gomes, 2017). Neste sentido, a bioprospecção é uma das estratégias para

encontrar novos microrganismos e seus respectivos compostos ativos, que pode ser realizada em nichos ecológicos pouco ou nunca explorados (Imhoff et al., 2011).

Dentre esses ambientes, as associações de microrganismos com plantas tem despertado interesses, sendo possível explorar os microrganismos endofíticos como ferramentas de biocontrole de fitopatógenos nos diferentes agroecossistemas (Campanhola e Bettioli, 2003; Silva et al., 2004) Os microrganismos endofíticos compreendem, principalmente, fungos e bactérias (Petrini, 1991).

Outra opção para a prospecção são os microrganismos simbiotes de insetos, que se destacam por serem potencialmente novas fontes a serem estudadas em aplicações biotecnológicas, isso graças à diversidade da microbiota e pressão de seleção que ocorre nestas interações (Crawford e Clardy, 2011). Embora muitas espécies bacterianas habitem corpos de insetos e estabeleçam diferentes níveis de relações mutualísticas, apenas um limitado número delas se comporta como patógenos destes organismos (Ruiu, 2015). Atribui-se ainda aos simbiotes de insetos relatos de atividade antifúngica, como exemplo, algumas bactérias simbiotes de formigas apresentam atividade fungicida contra *Escovopsis* sp. Esse ecossistema ainda pouco explorado é considerado uma rica fonte para a busca de moléculas naturais (Ortega et al., 2019).

Diante da preocupação com a contaminação ambiental e casos de evolução da resistência de pragas e doenças, objetivou-se prospectar e caracterizar novos isolados bacterianos com atividade inseticida e fungicida obtidos de lagartas mortas após serem submetidas a metodologia do inseto-armadilha.

2. Revisão de literatura

2.1. Importância Econômica da Agricultura

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores agrícolas mundiais, o que torna a agricultura de grande importância no desenvolvimento da economia (Pignati et al., 2017), gerando emprego e renda para o país (Barros et al., 2009).

Em 2019, a soma de bens e serviços gerados no agronegócio atingiu R\$ 1,55 trilhões, o que representou 21,4% do PIB brasileiro (Cepea, 2020). As commodities agrícolas têm sido o principal foco da produção e das exportações, atualmente, o Brasil é o quarto maior exportador mundial de produtos agropecuários, sendo um dos maiores produtores e exportadores de alimentos como milho, café, soja, cana-de-açúcar, suco de laranja, carnes bovina, suína e de aves (Usda, 2020).

O milho é uma das culturas de maior destaque, graças ao alto valor nutricional de seus grãos é utilizado como alimento humano, além de grande demanda para a produção de forragem para ração animal e na produção de combustível (Abebe e Feyisa, 2017). Essa gama de aplicações fez com que o milho se tornasse a principal espécie utilizada na produção de grãos, no Brasil sua produtividade aumentou em torno de 50% em um período de 34 anos (Albrecht e Missio, 2013).

A cultura do milho é cultivada sob múltiplos sistemas, variando da agricultura familiar e produção orgânica até sistemas integrados de cultivo em países latino-americanos. Ainda que sejam muitos os insetos que podem prejudicar o desenvolvimento das plantações de milho, a grande preocupação é a lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda*, que destaca-se como uma das principais pragas nestas da cultura (Marucci et al., 2019).

2.2. Perda de Produtividade por Ataques de Insetos-praga

Insetos-praga são competidores diretos dos humanos pelos recursos obtidos a partir da agricultura, estes são beneficiados pela prática da monocultura em extensas áreas (Oerke e Dehne, 2004). Os prejuízos causados pelos insetos-praga podem

ocorrer tanto no campo (pré-colheita) como durante o armazenamento (pós-colheita) (Oerke, 2006).

A estimativa exata das perdas de produtividade agrícola causada pelo ataque de pragas são limitadas, pois simultaneamente aos danos causados por esses organismos, as plantas estão sujeitas a uma série de outros fatores que interferem na produtividade, como condições ambientais adversas, às variedades cultivadas, às condições socioeconômicas dos produtores e também o nível tecnológico empregado (Oliveira et al., 2014).

A lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda*, é uma espécie polífaga pertencente à ordem lepidóptera, está causa danos expressivos em muitas culturas de importância econômica, principalmente o milho (Barros et al., 2010b).

2.3. *Spodoptera frugiperda*

S. frugiperda é uma espécie polífaga que ataca muitas culturas economicamente importantes (Sarmiento et al., 2002). Sua elevada capacidade de reprodução, polifagia e hábito migratório permitem sua rápida disseminação ao longo da faixa de distribuição de suas culturas hospedeiras (Giolo et al., 2002)

No continente americano, este inseto é considerado um sério problema fitossanitário (Kergoat et al., 2012). No Brasil, é a principal praga da cultura do milho, causando severos prejuízos para a economia do país. Diante dessa situação, diferentes aspectos de sua bioecologia e controle têm sido estudados (Cruz, 2002).

Nas estações de cultivo quentes e úmidas sua sobrevivência é favorecida, o que implica no aumento populacional, já temperaturas abaixo de aproximadamente 10°C prejudicam drasticamente seu desenvolvimento (Stokstad, 2017). Os adultos são noturnos (Cabi, 2017) e normalmente as fêmeas depositam a maioria de seus ovos durante os primeiros quatro a cinco dias de vida, mas em alguns casos a oviposição pode ocorrer por até três semanas (Prasanna et al., 2018). O número de ovos por fêmea durante seu ciclo varia de 1.342 a 1.844 quando as larvas são alimentadas com milheto ou milho e folhas de soja, respectivamente, e 1.839 ovos quando alimentadas com algodão (Barros et al., 2010a).

A vida adulta deste inseto tem duração média de cerca de 10 dias, mas pode variar de aproximadamente 7 a 21 dias (Capinera, 2000). Devido à duração do ciclo de vida, 2 a 10 gerações podem ser concluídas em cada ciclo de cultivo, dependendo do clima (Assefa e Ayalew, 2019). É holometábolo, possuindo assim quatro estágios para completar seu ciclo de vida, passando por ovo, larva, pupa até se tornar adulto (Figura 1) e repetir novamente o ciclo.

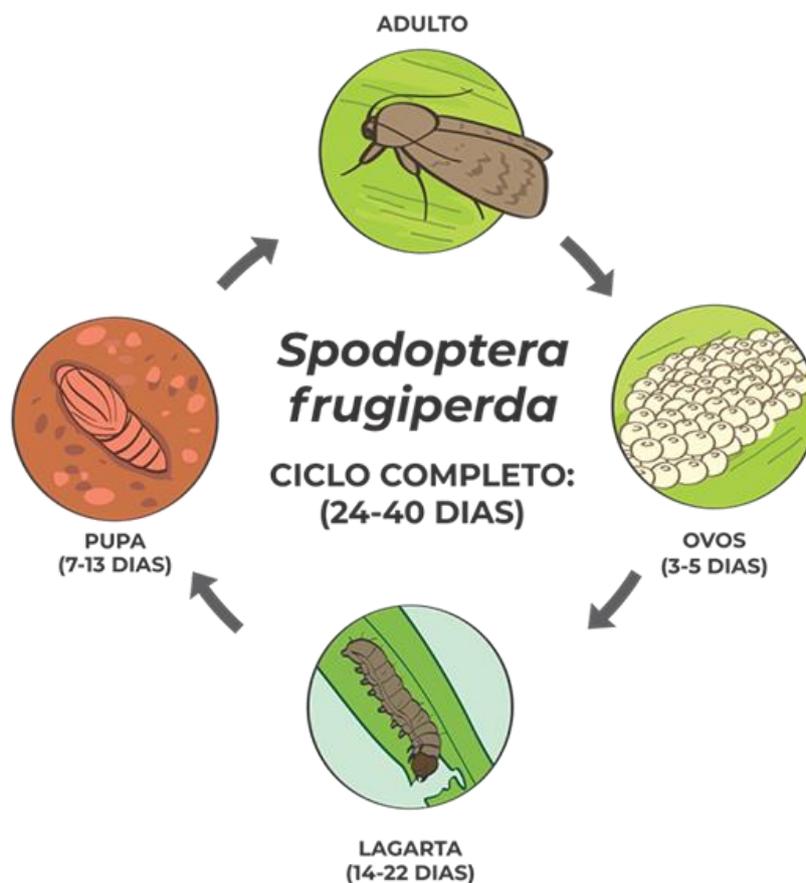


Figura 1. Ciclo de vida da lagarta-do-cartucho, com a duração de cada estágio do ciclo. Fonte: (Promip, 2021).

2.4. Formas de Controle de *Spodoptera frugiperda*

Diante do severo ataque de pragas, para manter a produção o setor agrícola faz intenso uso de sementes transgênicas e insumos químicos, como os fertilizantes

e agrotóxicos. A vasta área agricultável do Brasil tornou o país o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (Carneiro et al., 2018).

Com isso, os métodos de controle de pragas têm se tornado uma preocupação para a sociedade. Associado a isso, os crescentes aumentos nos custos do controle químico, a perda de eficiência de alguns desses produtos devido à evolução de resistência das pragas e os problemas ambientais decorrentes dessas práticas, indicam a necessidade do desenvolvimento de alternativas de controle. O que torna necessária a busca por sistemas de produção agrícolas que contemplem a sustentabilidade ambiental além de promover a biodiversidade no agrossistema, entre estas soluções o uso de agentes biológicos tem se tornado uma solução eficaz e viável (Simonato, 2018).

2.4.1. Controle Químico

O advento da entomologia agropecuária no Brasil se caracterizou pela forte influência dos agrotóxicos. Neste sentido, a aplicação de agroquímicos foi adotada e tem sido amplamente aceita pelos produtores brasileiros (Parra, 2014). No manejo de pragas agrícolas o uso de inseticidas merece destaque, pois sua eficácia influencia de forma direta a produtividade da cultura (Rodrigues, 2012).

Com tudo, o modelo tradicional de cultivo agrícola causa diversos problemas ambientais, dentre eles destaca-se o uso excessivo de químicos, que pode causar a contaminação dos solos e mananciais, além de favorecer o desenvolvimento da resistência em pragas e fitopatógenos, além de seus impactos indesejados sobre organismos não alvos, estes efeitos cada vez mais preocupam a sociedade em geral (Amorim et al., 2011).

O controle de *S. frugiperda* é baseado, principalmente, no uso de inseticidas químicos. Devido ao ataque da praga poder ocorrer durante todo o ano na cultura do milho, o que aumenta a frequência da aplicação de inseticidas, tem ocorrido o favorecimento da evolução da resistência aos principais grupos de inseticidas, tornando frequentes os relatos de evolução da resistência da praga e por consequência a ineficiência em seu controle com os inseticidas utilizados (Diez-Rodríguez e Omoto, 2001; Yu et al., 2003).

2.4.2. Controle Biológico de *Spodoptera frugiperda*

O controle biológico trata-se de um fenômeno natural que se baseia na regulação do número de espécies com inimigos naturais, que constituem os agentes da mortalidade biótica. Dessa forma, os organismos têm inimigos naturais atacando todas suas fases da vida (Abreu et al., 2015). O conhecimento e aplicação do controle biológico é indispensável no Programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP), pois o mesmo combina uma variedade de formas de controle, desde práticas culturais ao controle químico, com essa integração e rotação das formas de controle, busca-se evitar ou retardar a evolução da resistência das pragas, proporcionando ganhos reais na produtividade (Simonato et al., 2014).

O controle biológico é considerado uma das mais importantes medidas alternativas de controle, uma ferramenta poderosa que proporciona proteção ambientalmente segura e sustentável para as plantas. O sucesso do controle biológico é dependente do conhecimento, da adaptação e do estabelecimento dos agentes biológicos aplicados na lavoura (Pilkington et al., 2010). Os custos para produção dos bioprodutos tiveram quedas expressivas nos últimos anos, isso foi possível graças ao processo de produção que passou a ser em larga escala e utilizando meios líquidos para o cultivo de bactérias, fungos e nematoides (Mahmoud, 2017).

Embora o controle biológico ainda não substitua totalmente os inseticidas químicos, uma variedade de parasitóides, predadores e patógenos atacam severamente os estágios larvais e adultos da *S. frugiperda* (Assefa e Ayalew, 2019). A busca por biopesticidas para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas são crescentes nos últimos tempos (Bettioli, 2011).

Os microrganismos usados no controle biológico, como os nematoides entomopatogênicos, bactérias, fungos e vírus são vantajosos devido à sua especificidade, alta capacidade de multiplicação e dispersão no ambiente, redução da contaminação ambiental e toxicidade para humanos e organismos não alvos, além da possibilidade de serem empregados em associação com alguns inseticidas.

Sua produção pode ser realizada em meios artificiais e em grandes quantidades (Kaiser, 2016). Dentre os agentes microbianos, as bactérias são utilizadas tanto na produção de bioinseticidas como são também fonte de genes para

o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas. Das bactérias utilizadas no controle de pragas, se destaca *B. thuringiensis*, que detém o domínio do mercado de bioinseticidas de origem bacteriana (Liang et al., 2015).

2.4.3. *Bacillus thuringiensis*

A bactéria *B. thuringiensis* é gram-positiva, morfologicamente representada na forma de bastonete, possui a capacidade de produção de inclusões proteicas que ocorre no momento da esporulação e são usadas no controle de insetos-praga (Polanczyk, 2004). A toxicidade de *B. thuringiensis* deve-se a presença de inclusões parasporais, constituídos pelas proteínas *Cry*, *Vip* e *Cyt* (Bravo et al., 2007).

Várias culturas no Brasil fazem uso da tecnologia Bt, que são plantas modificadas geneticamente também conhecidas como plantas transgênicas, dentre estas, destaca-se o milho Bt, que representa cerca de 80% da área cultivada no país (Mendes et al., 2018). Em plantas Bt, as proteínas inseticidas são encontradas nos diversos tecidos, deste modo, lagartas localizadas nas várias partes da planta estão sujeitas a sua ação. Este fato é uma das grandes vantagens da tecnologia, pois consegue controlar as lagartas que encontram-se dentro do cartucho da planta, local este que enfrenta dificuldade para ser atingido no controle via pulverização (Mendes et al., 2018).

Apesar de todos os benefícios que as plantas transgênicas apresentam, seu uso intensivo gera consequências, como é o caso da seleção de insetos resistentes (Frizzas e Oliveira, 2006). Assim torna-se urgente a identificação de novos isolados ativos, os quais possam ser utilizados como fonte de novas moléculas inseticidas e estas implementadas em programas de manejo integrado de pragas, o que dificultaria a evolução da resistência.

2.5. Perda de Produtividade por Fungos Fitopatogênicos

No ambiente edáfico, dentre os organismos associados às doenças de plantas, tem destaque os fungos, as bactérias e os nematoides. Dentre esses, os fungos são os maiores responsáveis por doenças no sistema radicular. Além disso, esses

microrganismos podem produzir escleródios ou esporos, que conseguem resistir às condições ambientais adversas e manter-se viáveis mesmo na ausência de plantas hospedeiras (Dullahide et al., 1994; Bueno et al., 2007). Essas estruturas de resistência estão tanto associadas com resíduos vegetais, como podem ser encontrados livres no solo, características que fazem com que seja tão difícil a erradicação desses fitopatógenos do solo (Bodah, 2017).

Os fungos fitopatogênicos que habitam o solo são organismos que passam grande parte do seu ciclo de vida infectando órgãos subterrâneos ou caules de plantas. Possuem a capacidade de sobreviver por um longo período no solo sem que haja a presença de seus hospedeiros e sua disseminação e sobrevivência acontece no solo (Hillocks e Waller, 1997).

As doenças causadas por fungos do solo são conhecidas por uma variedade de sintomas que se manifestam nas plantas, incluindo podridões de sementes, tombamento de plântulas, podridões de raízes, murchas vasculares e podridões moles. Dentre os gêneros de fúngico, os que mais são encontrados no solo são *Aspergillus*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizopus*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Trichoderma* e *Verticillium* (Michereff et al., 2005; Amorim et al., 2016).

As medidas de controle dessas doenças são realizadas de forma biológica, cultural, genética e principalmente pelo uso de químicos. A ausência de medidas de controle nas lavouras pode causar danos nas safras, e com isso gerar impactos socioeconômicos negativos (Lopes e Michereff, 2018). Assim, diante da importância econômica dos fungos fitopatogênicos e da necessidade de alternativas de controle menos agressivas ambientalmente, foram selecionados quatro gêneros de fitopatógenos, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Sclerotinia* e *Didymella*, para serem submetidos a testes de antagonismo e com isso possibilitar a identificação de novas fontes de biocontrole.

2.5.1. *Colletotrichum*

Colletotrichum é um dos gêneros mais relevantes de fungos fitopatogênicos, responsável por muitas doenças em várias culturas no mundo todo (Sutton, 1992;

Cannon et al., 2000; Cai et al., 2009; Udayanga et al., 2013). Os fungos deste gênero foram inclusos na lista dos dez mais importantes do mundo, baseada na percepção de importância científica e econômica (Dean et al., 2012).

Esse gênero compreende uma série de fungos patogênicos de plantas que causam enormes perdas de safra, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Com tudo, algumas espécies infectam lavouras cultivadas em regiões temperadas. Este gênero é formado por cerca de 600 espécies distintas de fungos, infectando aproximadamente 3.200 espécies de plantas, tanto as mono quanto as dicotiledôneas (Bhat et al., 2018). As perdas de produtividade agrícola provocadas pelos danos causados por *Colletotrichum* spp. estão relacionadas com importantes reduções de safras de alimentos básicos cultivadas em países em desenvolvimento (Dean et al., 2012). Sobretudo, eles se destacam como patógenos na pós-colheita de frutas e vegetais, além disso, são diagnosticados como causadores de doenças em folhas, caules, tubérculos e mudas na lavoura (Damm et al., 2012a, 2012b; Udayanga et al., 2013).

2.5.2. *Fusarium*

O gênero *Fusarium* é formado por inúmeras espécies fitopatogênicas já descritas, os fungos que constituem este gênero são microrganismos com vasta representatividade e presentes nos mais diversos ambientes, podendo assim viver como saprófitos no solo, água e plantas (Sidrim e Rocha, 2010).

O micélio do *Fusarium* desenvolve-se rapidamente, podendo ter aspecto aveludado a levemente cotonoso, opaco ou ligeiramente brilhante, em sua face inferior pode ser incolor, marrom, vermelho, roxo escuro ou marrom (Hoog et al., 2014). O seu desenvolvimento ocorre entre 25 e 30°C, no entanto, alguns isolados não são termotolerantes (O'Donnell et al., 2010). O meio de cultura mais usado para crescer e determinar as espécies é o Batata Dextrose Ágar (BDA) (Fisher, 1982).

O mecanismo de infecção ocorre por meio da produção de hifas pelo patógeno, essas estruturas penetram através da parede epidérmica da raiz (Mendgen et al., 1996) o que possibilita o desenvolvimento do micélio por dentro das células através

do córtex radicular, alcançando os vasos do xilema, usando-o como passagem para colonização do patógeno, por meio de microconídios (Cooper e Bishop, 1983).

Os sintomas na planta geralmente são caracterizados pelo murchamento, semelhante ao observado no estresse hídrico, que ocorre devido ao bloqueio dos vasos (Beckman, 1987), também são apontados como sintomas manchas e queima das folhas, podridão das raízes, caules, frutas, grãos e sementes (Nelson, 1990). Da mesma forma como a maioria dos fitopatógenos, a dispersão ocorre sobretudo pela ação da chuva, ventos e animais (Fisher, 1982).

2.5.3. *Sclerotinia*

Os membros desse gênero pertencem ao filo Ascomycota, classe Leotiomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae. Mais de 250 espécies de *Sclerotinia* são conhecidas no mundo, os fungos deste gênero infectam mais de 500 espécies de plantas, em especial a espécie *Sclerotinia sclerotiorum* é relatada em todos os continentes, exceto na Antártida (Saharan e Mehta, 2008; Bensch, 2019).

As características mais marcantes das espécies do gênero *Sclerotinia* são o crescimento de micélio algodonoso de coloração branca que ocorre na planta hospedeira e o desenvolvimento de massas compactas de hifas conhecidos como escleródios (Baturó-Ciesniewska et al., 2017; Willbur et al., 2019).

Os escleródios no início do desenvolvimento são brancos, mas tornam-se enegrecidos e sólidos seu formato varia de achatados, alongados e podendo também ser esféricos, seu tamanho varia entre 2 a 10 milímetros de diâmetro. Essas estruturas podem se formar internamente na medula do caule das plantas hospedeiras, não sendo possível perceber sua presença externamente, mas também podem ser formados na parte externa do caule onde ficam visíveis na planta (Saharan e Mehta, 2008).

S. sclerotiorum é o agente causal da doença conhecida como mofo-branco, relatado como um dos fitopatógenos mais importantes no mundo, está distribuído por todas as regiões de produção agrícola. Essa espécie é um fungo polífago que possui mais de 400 espécies de plantas hospedeiras, destacam-se a batata (*Solanum*

tuberosum), canola (*Brassica napus*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e girassol (*Helianthus annuus*) (Leite, 2005).

Das espécies do gênero *Sclerotinia*, as mais encontradas no Brasil são: *Sclerotinia minor* nas culturas de amendoim (*Arachis hypogaea*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e feijão (*Phaseolus vulgaris*), *S. sclerotiorum* nas culturas de alho (*Allium sativum*), feijão (*P. vulgaris*), soja (*Glycine max*) e tomate (*S. lycopersicum*) e *Sclerotinia trifoliorum* nas culturas de alfafa (*Medicago sativa*) e feijão (*P. vulgaris*) (Mendes et al., 1998; Amorim et al., 2016).

2.5.4. *Didymella*

Espécies do gênero *Didymella* são fitopatógenos que afetam sobretudo as lavouras de cereais em países de clima temperado, seus esporos são transportados pelo ar e o gênero engloba ainda espécies que são um alérgeno humano em potencial (Sadyś e West, 2017).

Didymella sp. é um agente causal de doenças como: queima da folha de ascochyta (*Didymella exitialis*), crestamento da ascochyta do grão-de-bico (*Didymella rabiei*), crestamento da ervilha (*Didymella pinodes*), crestamento das framboesas vermelhas (*Didymella applanata*), e ferrugem do crisântemo (*Didymella chrysanthemi*) (Burchill e Beever, 1975; Trapero-Casas et al., 1996; Fox, 2005; Salam et al., 2011; Nicolaisen et al., 2014). Culturas de cereais, como trigo (*Triticum sativum*), cevada (*Hordeum vulgare*), aveia (*Avena sativa*) e centeio (*Secale cereale*), são principalmente afetadas por *D. exitialis* e *Didymella phleina* (Cromey et al., 1994; Stefansson e Hallsson, 2011; AHDB, 2015).

O cancro das hastes ou podridão de micosferela, como é conhecida a doenças ocasionada pelo fungo *Didymella bryoniae*, é uma das mais relevantes doenças da melancieira (Santos et al., 2011). Esta doença foi verificada, pela primeira vez no Brasil, na cidade de Campinas - SP, em 1954, afetando lavoura de melão do grupo Cantaloupe (Tsutsumi, 1995) é de grande importância em curcubitáceas, em especial para o melão, pepino e melancia. Nas regiões onde o clima é úmido, a produção do melão pode ser limitada, mesmo em condições de plasticultura, a doença tem provocado elevados prejuízos nas regiões sul e sudeste do Brasil (Kimati et al., 1997).

A evolução da *Didymella* é favorecida por alta umidade no solo, podendo atacar a melancia em todas as fases de desenvolvimento, pode ser identificada no início por conta de sintomas característicos como rachaduras no colo da planta e por exsudato de coloração marrom escuro (Santos et al., 2011).

2.6. Controle Químico e Biológico de Fungos Fitopatogênicos

O crescente hábito por uma alimentação mais saudável e proveniente de sistemas produtivos mais sustentáveis tem se destacado, com isso, estão surgindo nichos no mercado nacional e internacional de clientes mais exigentes e que demandam cada vez mais qualidade dos alimentos consumidos (Gomes et al., 2008).

Dentre os motivos que levaram a esse aumento na demanda de insumos ambientalmente sustentáveis, o uso exagerado de produtos químicos sintéticos é um dos principais responsáveis (Gonçalves Jr, 2013). No entanto, quando se fala em alimentação global, o uso de produtos químicos na agricultura ainda é de grande importância para manter o nível de produção (Prashar e Shah, 2016).

O controle químico de patógenos é indispensável e tem sido um dos principais fatores para o aumento da produtividade e da qualidade na lavoura, porém seu inadequado uso e de forma não discriminatório tem colocado em risco a saúde tanto humana quanto animal, além de contaminar o meio ambiente (Fiori et al., 2000). O contínuo uso de pesticidas sintéticos leva a seleção de cepas de fitopatógenos resistentes, o que causa seu ressurgimento (Birech et al., 2006; Halimatunsadiah et al., 2016). Na busca para solucionar estes problemas, alguns métodos alternativos de controle têm sido adotados (Lengai e Muthomi, 2018).

O controle biológico é uma das alternativas mais apontadas entre os pesquisadores, esse método de controle visa à introdução de um agente biológico para o controle natural no ambiente produtivo (Morandi e Bettiol, 2009). Dentro os agentes de controle biológico, os microrganismos são uma opção para o controle de fitopatógenos, o qual pode ser alcançado por meio do antagonismo entre os patógenos e o microrganismo, tanto nos órgãos de propagação, no solo ou através da manipulação da área cultivada (Santos, 2008).

Nessa perspectiva, o controle biológico apresenta elevada importância, viabilizando a substituição parcial dos produtos químicos. Esses agentes vêm sendo reconhecidos e inseridos na agricultura, e tem se tornado cada vez mais importante na produção.

2.7. Bioprospecção de Microrganismos

“A bioprospecção tem sua definição como sendo a busca por compostos orgânicos em microrganismos, plantas e animais que sejam úteis. Normalmente, neste processo, os pesquisadores podem dedicar suas buscas para ambientes peculiares, onde a biota presente tenha passado por uma adaptação extrema, como desertos, fontes termais, florestas, águas ou solos contaminados ou com características particulares como alcalinidade ou acidez, entre outros” (Spartaco, 2014).

A prospecção de moléculas em fontes naturais tem resultado em grandes sucessos biotecnológicos já implementados na agricultura (Dayan et al., 2009; Cantrell et al., 2012). A dificuldade em encontrar novas moléculas bioativas tem direcionado a busca de microrganismos com potencial uso biotecnológico para habitats ainda pouco ou nunca explorado (Crawford e Clardy, 2011; Beemelmans et al., 2016). Distribuídos no meio ambiente, os microrganismos criaram uma diversidade de interações com insetos (Feldhaar, 2011). Entre os microrganismos de destaque nesta relação encontram-se os simbiontes de insetos, por ser uma potencial nova fonte a ser explorada em aplicações biotecnológicas, isso é favorecido pela sua diversidade e pressão de seleção que ocorre nestas condições (Douglas, 2007; Crawford e Clardy, 2011).

A biodiversidade amazônica revela um grande potencial para possíveis descobertas de novos inseticidas naturais, que possam auxiliar no combate das pragas agrícolas e vetores que transmitem diversas doenças tropicais, fazendo uso de produtos menos agressivos ao ambientalmente (Spartaco, 2014).

Outra fonte que tem despertado grande interesse são os microrganismos endofíticos, estes estão sendo empregados como ferramentas de biocontrole para uso nos diferentes agroecossistemas (Campanhola e Bettiol, 2003; Silva et al., 2004). Os

microrganismos endofíticos compreendem, principalmente, fungos e bactérias (Petrini, 1991), suas capacidades de biocontrole podem advir de vários mecanismos, como a produção de substâncias deletérias aos fitopatógenos ou competindo por espaço e nutrientes, indiretamente, pela produção de substâncias promotoras de crescimento (Varma et al., 1999) ou induzindo resistência sistêmica no hospedeiro (Van Loon et al., 1998).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta do solo

As amostras de solo foram coletadas de seis locais com diferentes coberturas de vegetações (Figura 2) da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), sendo: pastagem, milho, soja, horta, cana-de-açúcar e floresta. De cada local foram coletadas cinco amostras simples extraídas com auxílio de trado a profundidade de 0-10 cm. As respectivas amostras simples foram reunidas e homogeneizadas para compor a amostra composta de cada local (Kaya e Stock, 1997).

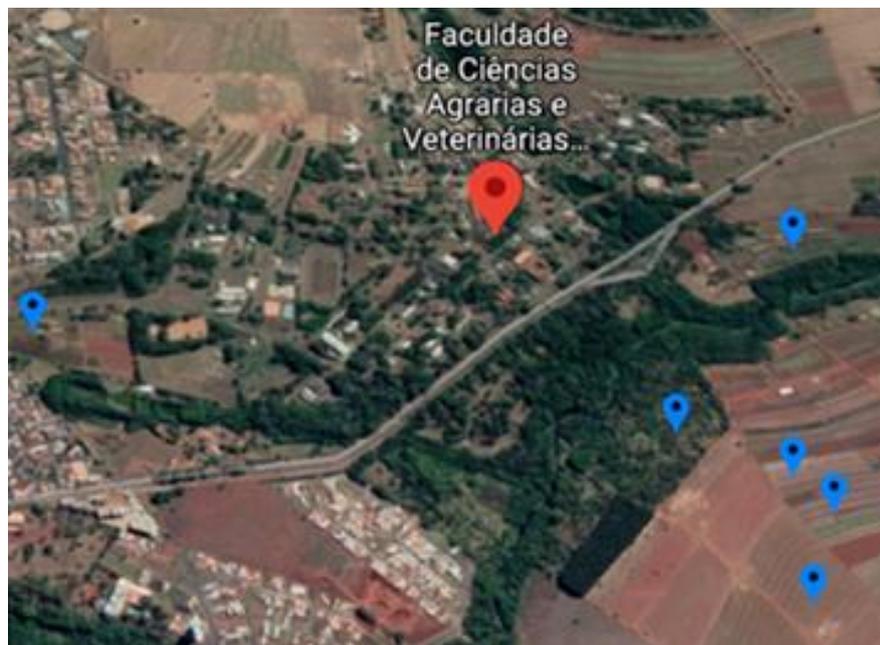


Figura 2. Localização geográfica dos sítios de coleta na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jabotical/SP, Brasil. Região correspondente a FEPE (Imagens: Adaptada do Google Earth).

O solo homogeneizado foi armazenado em sacos plásticos identificados com o tipo de cobertura vegetal e com a localização do ponto de coleta. Quando necessário, o solo foi umedecido com água destilada para manutenção da umidade e microbiota.

3.2. Infecção de *Spodoptera frugiperda* por entomopatígeno

Para a obtenção de isolados bacterianos entomopatogênicos, lagartas de *S. frugiperda* (posturas obtidas do Laboratório de Ecologia Aplicada – FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP) foram criadas em dieta artificial (Greene et al., 1976) até atingir o 5º instar, quando foram então submetidas à estratégia do inseto-armadilha (Bedding e Akhurst, 1975). Para o processo de infecção, transferiu-se solo de cada um dos seis tipos de cobertura de vegetação para quatro caixas Magenta® GA-7, 150 g/caixa, posteriormente, cada caixa recebeu cinco lagartas de 5º instar, onde foram mantidas e tiveram sua sobrevivência monitorada por sete dias. As lagartas encontradas mortas foram submetidas ao processo de isolamento bacteriano.

3.3. Isolamento bacteriano

As lagartas mortas de *S. frugiperda* foram desinfectadas superficialmente por meio das imersões em hipoclorito de sódio 1% por três minutos, em álcool 70% por um minuto, seguido de três enxagues com água estéril. Em seguida, em microtubos de 1,5 mL do tipo Eppendorf, foram maceradas com bastão de vidro em 1 mL de NaCl 0,85% estéril. Este homogeneizado foi então utilizado no isolamento bacteriano, que ocorreu por meio de sucessivas diluições 1:10 em NaCl 0,85% e plaqueamento de 100 µL em placas de petri contendo meio Luria Bertani (LB) (Sambrook J et al., 1989) sólido, posteriormente, as placas foram incubadas a 30°C até a visualização das colônias. Estas foram caracterizadas pelo aspecto morfológico: cor, tamanho, bordas entre outras características, posteriormente, foram coletadas, multiplicadas em meio LB líquido, transferidas para microcubos de 2 mL contendo glicerol na proporção de 20% e armazenadas em ultra freezers -80°C até serem utilizadas como inoculo para os cultivos a serem avaliados nos bioensaios.

3.4. Bioensaios com *Spodoptera frugiperda*

Para a avaliação da atividade inseticida dos isolados, estes foram previamente cultivados em meio LB a 30°C, 150 r.p.m por 40h. No bioensaio foi utilizada a dieta artificial desenvolvida para *S. frugiperda* (Greene et al., 1976). Em placas de poliestireno de 128 poços (Cell Wells, Corning Glass Works) (Figura 3) contendo aproximadamente 1 mL de dieta por poço, foram aplicados 60 µL do cultivo bacteriano sobre a superfície da dieta de cada poço, que possui área de 2 cm². Posteriormente, as bandejas foram acondicionadas em fluxo laminar até a secagem do cultivo aplicado, em seguida uma lagarta neonata de *S. frugiperda* foi adicionada em cada poço da placa. As parcelas, representadas por 16 poços, foram então seladas com adesivo transparente e acondicionadas a 27 °C, com fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro. Decorrido seis dias, no ensaio inicial de seleção de isolados foi verificada a mortalidade e aspecto visual de desenvolvimento das lagartas. Posteriormente, os isolados selecionados nesta etapa inicial, foram submetidos à um segundo bioensaio para avaliar quantitativamente o efeito inibitório no crescimento das lagartas. Para a validação dos ensaios foi utilizado como testemunha o meio LB estéril (controle negativo).

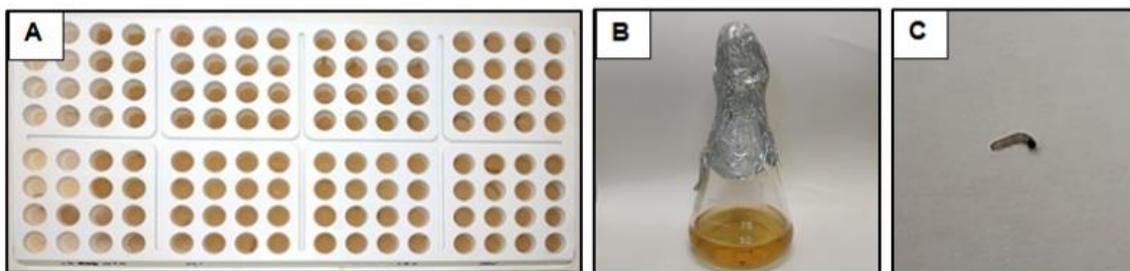


Figura 3. Etapas da realização do bioensaio. A - Bandejas com dieta artificial pronta para receber o cultivo bacteriano; B - Isolado bacteriano cultivado por 40 horas; C – Neonata de *S. frugiperda* utilizada no bioensaio.

3.5. Bioensaio Quantitativo de Inibição com *Spodoptera frugiperda*

Para a avaliação quantitativa de inibição dos isolados selecionados a partir do bioensaio preliminar (item 2.4), esses isolados foram novamente cultivados e

submetidos ao bioensaio conforme metodologia do (item 2.4), no entanto, utilizou três repetições e ao final de seis dias foi verificado o aspecto visual de desenvolvimento das lagartas seguida da pesagem individual das parcelas de cada tratamento. Para a validação dos ensaios foi utilizado como testemunha o meio LB estéril (controle negativo).

3.6. Bioensaio de inibição fúngica

Na avaliação da atividade fungicida dos isolados bacterianos, utilizaram-se os fitopatógenos dos gêneros *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Sclerotinia* sp., cedidos pela empresa “JCO Fertilizantes”, Barreiras-BA, e *Didymella* sp. cedido pelo Laboratório de Melhoramento Genético de Hortaliças da (FCAV). Estes foram cultivados em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA), a 27°C.

Um disco de meio de cultura de oito milímetros de diâmetro contendo o micélio do fitopatógeno (Figura 4) foi transferido para o centro da placa de petri contendo meio BDA. Nas bordas desta mesma placa em cinco pontos equidistantes entre eles e do centro da placa, sob a superfície do meio, foram adicionadas alíquotas de 10 µL de cinco isolados bacterianos por placa. O tratamento controle consistiu da adição somente do disco de meio de cultura contendo o fitopatógeno. O momento de avaliação do halo de inibição, representado pelo espaço entre a extremidade do crescimento micélio do patógeno e a colônia da bactéria antagonista, foi estabelecido como o período de tempo necessário para que o micélio do patógeno, sem a presença do isolado bacteriano, se desenvolvesse sobre todo o meio de cultura (Bell et al., 1982). As placas foram incubadas em B.O.D. a 27 °C, 12 horas de fotoperíodo.

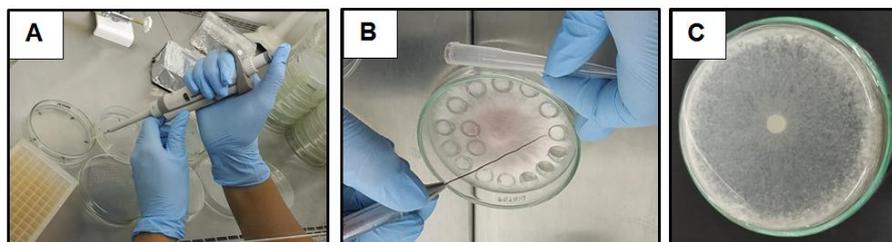


Figura 4. Preparação do bioensaio de inibição fúngica. A - Disposição das gotas dos isolados nas extremidades das placas; B - Coleta do disco do meio de cultura contendo micélios do fitopatógeno; C - Placa controle contendo apenas o fungo.

3.7. Sequenciamento do gene rRNA 16S

Os isolados que causaram mortalidade e/ou subdesenvolvimento das lagartas ou inibição do crescimento dos fungos, foram submetidos à identificação de gênero/espécie por meio do sequenciamento do gene rRNA 16S. Foi realizada a extração do DNA total, utilizando o kit InstaGene™ Matrix, a qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. Posteriormente foi feita à amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene 16S rRNA, fD1 e rD1 (Weisburg et al., 1991), os produtos amplificados foram então purificados com o Wizard® Genomic DNA Purification Kit e sequenciados utilizando o kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing, no sequenciador capilar modelo ABI 3130 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As sequências obtidas foram analisadas e montadas com o software PhredPhrap CONSED (www.phrap.org) e em seguida submetidas a consulta de similaridade de nucleotídeos no banco de dados de 16S do GenBank, utilizando a ferramenta BLAST local - “Basic Local Alignment Search Tools”. Sequências com similaridade > 99% foram consideradas para definir as espécies candidatas.

3.8. Curva de crescimento e atividade inseticida

Para determinar o tempo de cultivo bacteriano que causasse a máxima mortalidade e/ou inibição do crescimento de lagartas, diferentes períodos foram avaliados. Para isso, um pré-inóculo bacteriano foi cultivado em frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio LB, incubado a 30 °C e 150 r.p.m, por 18 horas. Após o período de incubação do pré-inóculo, alíquotas foram transferidas para três frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio LB até atingir a D.O. $0,05 \pm 0,003$. Com 0, 6, 12, 18 e 24 horas de cultivo, e após esse período uma vez ao dia, até o sétimo dia, foram coletadas alíquotas para as seguintes determinações: mensuração da absorbância a 600 nm (D.O. 600), determinação do número de unidades formadoras de colônia por mililitro (U.F.C./mL) e verificação da atividade inseticida por meio de bioensaio conforme descrito no item 2.5.

3.9. Formas de análise dos resultados

A seleção inicial de isolados foi realizada com uma repetição, a quantificação da atividade inseticida dos isolados selecionados com duas e a curva de crescimento com quatro (cada repetição constituída de 16 lagartas). A determinação da D.O. e U.F.C. do cultivo bacteriano foram realizadas em triplicata. Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado e os resultados analisados pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4. Resultados e Discussão

4.1. Infecção de *Spodoptera frugiperda* e isolamento bacteriano

A partir do método do inseto-armadilha obtiveram-se 27 lagartas mortas (Tabela 1), sendo que o maior número de lagartas mortas foi obtido a partir do solo localizado sob cobertura de vegetação de floresta, do qual consequentemente também se obteve o maior número de colônias.

No momento da coleta das lagartas mortas (Figura 5), estas apresentaram variação de coloração, desde escuras a tons mais claros e consistência variável, porém o aspecto mole era predominante.

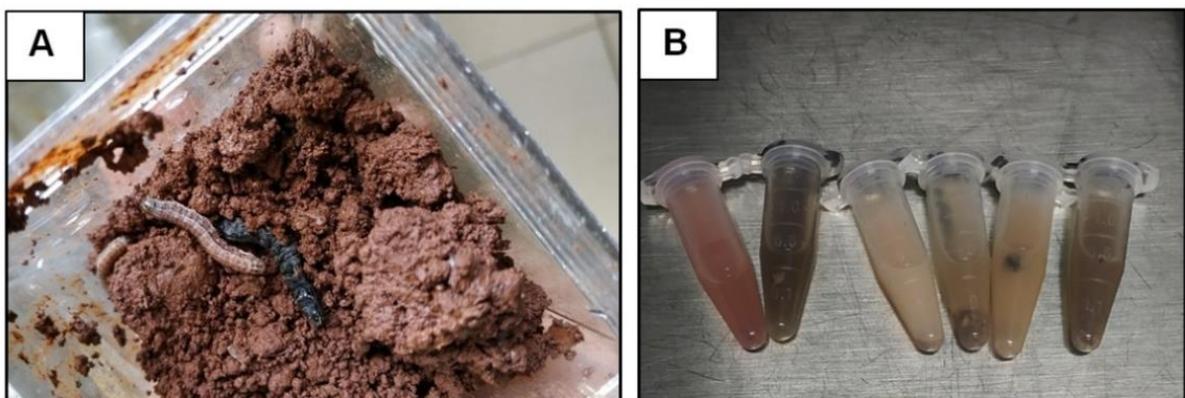


Figura 5. Coleta das lagartas mortas. A - momento da coleta de uma lagarta completamente enegrecida e de aspecto mole ao lado de lagartas ainda com aspecto saudável; B - Macerado das lagartas mortas demonstrando a variação de coloração das mesmas.

Com o isolamento das lagartas mortas, foram obtidos 70 isolados bacterianos (Tabela 1) que apresentaram diferentes aspectos morfológicos como: coloração variando entre brancas, amareladas ou vermelhas, tamanhos de pequenas, médias, grandes a expansivas (quando proliferavam por toda a placa) e borda irregular ou arredonda.

Tabela 1. Quantidade de lagartas encontradas mortas e de isolados obtidos de cada local.

Local	Lagartas mortas	Isolados
Floresta	7	21
Milho	4	12
Soja	3	5
Horta	4	7
Cana	5	16
Pastagem	4	9
Total	27	70

O maior percentual de lagartas mortas encontradas é 25,9 %, provenientes do solo de floresta, seguido por 18,52 % em solo de cana e 14,81 % para milho, pastagem e horta. Ao solo sob cobertura vegetal de floresta são atribuídos as maiores porcentagens de isolados obtidos, 30%, seguido por 22, 86 % do solo sob cobertura de cana e 17,14 % para o milho, para os demais solos os percentuais foram inferiores a 13 %.

Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos que apontam a influência dos diferentes sistemas de cultivo e adubação sobre a fauna edáfica (Baretta et al., 2006; Alves et al., 2008), pois as diferentes coberturas vegetais bem como as práticas culturais adotadas atuam de forma direta sobre a microbiota do solo (Gatiboni et al., 2009).

Essa maior porcentagem de isolados obtidos a partir das armadilhas montadas com solo de floresta é associado à conservação de resíduos orgânicos sobre solo (Antoniolli et al., 2006), portanto, ambientes com recorrentes ações do homem propiciam condições menos favoráveis para a diversidade microbiana.

4.2. Seleção inicial de isolados para atividade inseticida e fungicida

Na triagem da atividade inseticida, dos 70 isolados avaliados, 10 isolados (Tabela 2) visualmente causaram a inibição do crescimento das lagartas (Figura 6 A e B), com a redução do crescimento, conseqüentemente menores danos serão causados ao cultivo agrícola. Estes isolados selecionados foram posteriormente submetidos a um ensaio quantitativo de inibição. Com relação à taxa de sobrevivência de lagartas, em todos os tratamentos foram elevadas, não permitindo a seleção de isolados baseado no critério mortalidade.

Na avaliação de inibição fúngica de *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Sclerotinia* sp. e *Didymella* sp., dos 70 isolados obtidos, sete apresentaram resultados positivos de antagonismo (Figura 6 C e D e Tabela 2). Estes sete isolados juntamente com os selecionados a partir do ensaio quantitativo de inibição de *S. frugiperda* foram submetidos à identificação por sequenciamento do gene rRNA 16S.

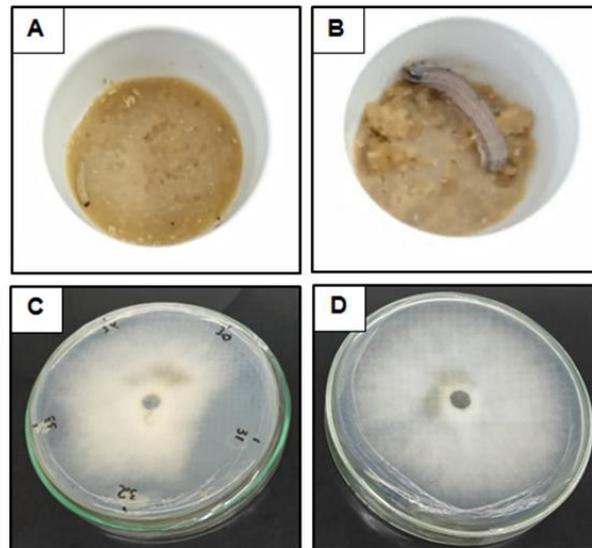


Figura 6. Efeito visual da ação inseticida e fungicida de isolados selecionados. Efeito inseticida: A - Efeito inibitório no crescimento de lagartas causado por isolado bacteriano; B - Controle negativo (meio LB). Efeito fungicida: C - Efeito inibitório no crescimento fúngico causado por isolado bacteriano; D - placa controle do crescimento fúngico.

Dentre os isolados ativos contra fungo, quatro se destacaram por apresentar halo de inibição acima de cinco milímetros, (Figura 6 D e Tabela 2). Ressalta-se também que houve variação no espectro de atividade, visto que ocorreram isolados

que causaram desde a inibição de apenas um único fitopatógeno, até isolados que promoveram a inibição simultânea de três fitopatógenos, também se observa que isolados com atividade inseticida não apresentaram simultaneamente ação antifúngica.

Estes comportamentos observados nos isolados ativos podem estar ligados as condições ambientais dos locais que os microrganismos habitavam, por exemplos, os simbiontes de insetos, segundo (Crawford e Clardy, 2011), desenvolveram e se adaptaram a condições extremas, essas modificações podem influenciar seu comportamento diante de outros microrganismos, causando a inibição do crescimento de lagartas ou do desenvolvimento de fitopatógenos.

As bactérias desenvolveram mecanismos para inibir outros organismos, que as permite proliferar e se desenvolver. Neste mecanismo podem estar envolvidos a produção de substâncias com diferentes níveis de atividade antifúngica e de espectro ação específico ou amplo (Raaijmakers e Mazzola, 2012).

Tabela 2. Isolados bacterianos selecionados por apresentarem efeito inseticida e/ou fungicida em etapa de seleção inicial de atividade.

Isolados	Praga / fungos alvos				
	<i>S. frugiperda</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Sclerotinia</i> sp.	<i>Didymella</i> sp.
JBC 09	+	-	-	-	-
JBC 10	-	+	++	-	-
JBC 20	-	-	-	++	-
JBC 22	-	+	+	-	+
JBC 25	+	-	-	-	-
JBC 30	+	-	-	-	-
JBC 33	+	-	-	-	-
JBC 35	+	-	-	-	-
JBC 36	-	-	-	++	-
JBC 42	+	-	-	-	-
JBC 47	+	-	-	-	-
JBC 55	-	+	-	-	+
JBC 57	+	-	-	-	-
JBC 60	+	-	-	-	-
JBC 61	+	-	-	-	-
JBC 65	-	+	+	-	+
JBC 76	-	+	++	-	+

Praga: (-) nenhuma atividade; (+) efeito inibitório no crescimento. Fitopatógenos: (-) nenhuma atividade; (+) zonas de atividade com diâmetro de 5 mm ou menos; ++ = zonas de atividade maiores que 5 mm de diâmetro.

4.3. Quantificação da atividade inseticida dos isolados selecionados

Com os isolados selecionados inicialmente (Tabela 2) foi realizado um segundo bioensaio para quantificar o efeito inibitório no crescimento das lagartas (Figura 7). Todos os isolados diferiram significativamente do controle negativo (meio LB), sendo que cinco desses isolados promoveram elevadas taxas de inibição do crescimento, (inibição relativa superiores a 90%). Quanto à mortalidade, apesar de observadas diferenças significativas, em todos os tratamentos estas se encontraram abaixo de 20 %, não sendo relevante pois até 10% de mortalidade no controle é aceitável.

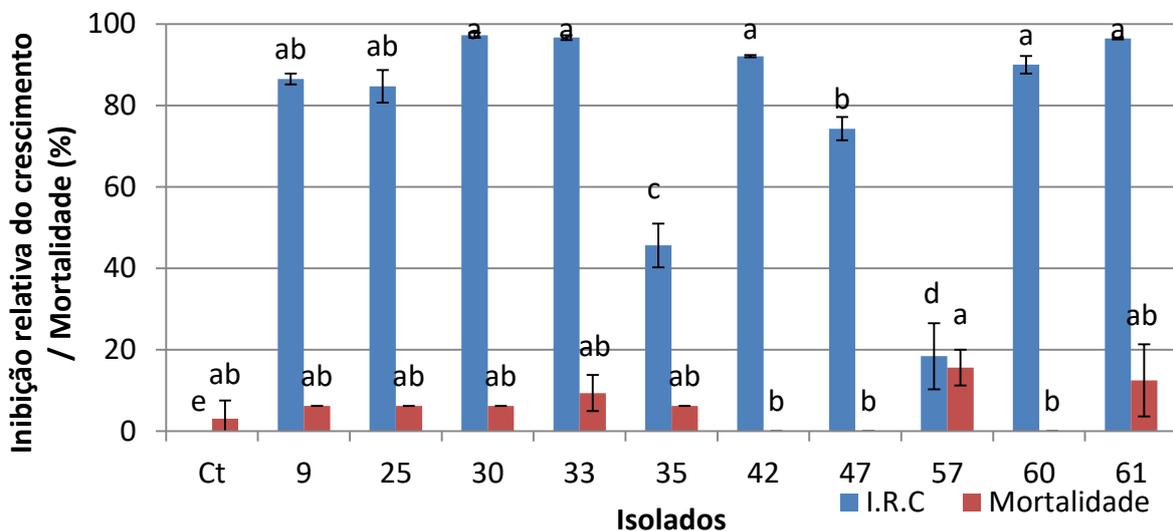


Figura 7. Mortalidade e inibição relativa do crescimento (I.R.C) de lagartas de *S. frugiperda* causado por isolados bacterianos previamente selecionados.

4.4. Sequenciamento do gene rRNA 16S

A partir do sequenciamento dos isolados ativos, identificou-se quatro espécies para atividade inseticidas, destes, três pertencentes ao gênero *Enterococcus* sp., já com efeito fungicida, foram obtidas três espécies (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação dos isolados ativos a partir da similaridade de sequência do gene 16S *rRNA* com a base 16S ribossomal RNA do NCBI.

Atividade	Isolado	Espécie	n° NCBI	% de similaridade
Lagarta	JBC 09	<i>Enterococcus mundtii</i>	NR_024906.1	99,93%
Lagarta	JBC 25	<i>Enterococcus mundtii</i>	NR_024906.1	99,67%
Lagarta	JBC 30	<i>Enterococcus gallinarum</i>	NR_104559.2	99,73%
Lagarta	JBC 33	<i>Enterococcus gallinarum</i>	NR_104559.2	99,73%
Lagarta	JBC 35	<i>Enterococcus gallinarum</i>	NR_104559.2	99,05%
Lagarta	JBC 42	<i>Enterococcus mundtii</i>	NR_024906.1	100,00%
Lagarta	JBC 47	<i>Enterococcus gallinarum</i>	NR_104559.2	99,73%
Lagarta	JBC 57	<i>Serratia nematodiphila</i>	NR_044385.1	100,00%
Lagarta	JBC 60	<i>Enterococcus mundtii</i>	NR_024906.1	99,87%
Lagarta	JBC 61	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	NR_104560.1	99,80%
Fungo	JBC 10	<i>Serratia marcescens</i>	NR_114043.1	99,83%
Fungo	JBC 20	<i>Bacillus cereus</i>	NR_115714.1	100,00%
Fungo	JBC 22	<i>Enterobacter tabaci</i>	NR_146667.2	99,84%
Fungo	JBC 36	<i>Bacillus cereus</i>	NR_115714.1	100,00%
Fungo	JBC 55	<i>Serratia marcescens</i>	NR_114043.1	99,45%
Fungo	JBC 65	<i>Serratia marcescens</i>	NR_036886.1	99,80%
Fungo	JBC 76	<i>Serratia marcescens</i>	NR_036886.1	99,80%

Com relação aos organismos identificados, as espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* sp. encontram-se amplamente disseminadas no meio ambiente, podendo ser encontrados no trato intestinal de humanos e animais, e até mesmo em produtos lácteos (Giraffa, 2003; Ogier e Serror, 2008). Integrante deste gênero e do grupo das bactérias lácticas, *E. mundtii*, é um organismo anaeróbio facultativo gram-positivo, para a qual um menor número de estudos tem sido dedicados. Em relação as espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, estas com frequência são enquadradas como agentes causadores de inúmeras infecções sistêmicas em humanos (Arias e Murray, 2012).

E. mundtii, identificável no intestino de insetos saudáveis, independentemente de suas dietas ou de seu estágios de desenvolvimento (Shao et al., 2017), é, de acordo com o procedimento de marcação de isótopos estáveis, o organismo que mais atua na microbiota intestinal (Shao et al., 2014), o que destaca a importância dessa

espécie como simbiótica (Shao et al., 2017). *E. mundtii* foi com mais de 99% de similaridade aos isolados 09, 25, 42 e 60, todos contra *S. frugiperda*.

Quatro isolados foram identificados como pertencentes à espécie *E. gallinarum*, sendo eles os isolados 30, 33, 35 e 47, com similaridade acima de 99%. Um único isolado ativo foi similar com *E. casseliflavus*, isolado 61, e todos os isolados dessas espécies foram ativos contra *S. frugiperda*. *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* frequentemente são resistentes a antibióticos, o que vem preocupando especialistas e cada vez mais são relatadas em surtos hospitalares (Tan et al., 2010; Jia et al., 2014; Monticelli et al., 2018; Zhao et al., 2018).

O isolado 57 também com atividade contra *S. frugiperda*, foi identificado como *S. nematodiphila* com 100% de similaridade. Isolado do intestino de nematoide, no processo de isolamento os autores constataram que o ciclo de vida dessa bactéria é patogênico-simbiótico (Kwak et al., 2015).

Os isolados 20 e 36 foram identificados como *B. cereus* com 100% de similaridade, ambos foram ativos contra o fitopatógeno *Sclerotinia sp.*. Os esporos desta espécie são frequentemente resistentes à pasteurização e à radiação gama, o que pode vir a favorecer a contaminação de alimentos, especialmente os industriais (Rönner et al., 1990; Andersson et al., 1998). Além de causar intoxicações alimentares, é responsável por várias infecções sistêmicas e locais em pacientes imunocomprometidos (Granum e Lund, 1997).

Os isolados 10, 55, 65 e 76 também apresentaram atividade antifúngica e foram identificados como *S. marcescens* com similaridade acima de 99%. Este é relatado tanto como patógeno humano oportunista em hospitais como bactéria promotora de crescimento vegetal em plantações (Abreo e Altier, 2019). Dentre as espécies que compõem esse gênero, *S. marcescens* é a mais frequentemente associada às infecções humanas (Iguchi et al., 2014).

O isolado 22 apresentou atividade antifúngica e foi identificado como *E. tabaci*. Essa bactéria foi relatada em 2015 como uma nova espécie, designada de *E. tabaci* YIM Hb-3 T, isolada do caule de tabaco. Porém no processo de taxonomia do gênero *Enterobacter*, Wu e Zong (2020) comprovaram que a *E. tabaci* YIM Hb-3 T é, na verdade, a própria *Enterobacter mori* LMG 25706 T descoberta por (Zhu et al., 2011). A espécie *E. mori* é habitualmente conhecida como sendo patogênica de

plantas, causadora da murcha bacteriana da amoreira, e recentemente foi relado um isolado clínico (Hartl et al., 2019).

Em virtude de apresentar risco de patogenicidade a humanos, animais e plantas, parte dos isolados foi considerada inadequada para continuidade dos ensaios. De forma que, se selecionou a espécie de *E. mundtii* para a continuidade dos experimentos, e em específico o isolado 60, que além de apresentar um dos melhores resultados para a espécie, foi também o tratamento com inibição mais uniforme de parcelas. Além do exposto, *E. mundtii* tem sido associado ao leite cru, com relatos que comprovam seu uso na prevenção da mastite em gado leiteiro (Espeche et al., 2009). A espécie é produtora de enterocinas, como a Bacteriocina ST15, que são muito ativas contra bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter* (De Kwaadsteniet et al., 2005; Ferreira et al., 2007; Settanni et al., 2008).

4.5. Curva de crescimento e atividade inseticida

Observa-se na curva de crescimento (Figura 4), desenvolvida com o isolado 60, que houve elevado incremento da D.O. no período inicial, atingindo seu ponto máximo com apenas 6 horas de cultivo. Quanto a U.F.C./mL, houve comportamento semelhante à o da D.O. com ápice atingido com 12 horas de cultivo e $3,17 \times 10^7$ U.F.C./mL, posteriormente, ambos decresceram de forma similar. Não houve mortalidade no controle negativo (meio LB) e as lagartas apresentaram aspecto de crescimento normal para a espécie. Com relação aos tratamentos envolvendo o isolado 60, as lagartas apresentaram taxa de inibição do crescimento entre 83,69 e 90% para todos os períodos de cultivo avaliados. Ensaio como este são importantes para verificar qual tempo mínimo necessário para a máxima atividade inseticida, bem como qual sua carga bacteriana e D.O. naquele momento.

A curva de crescimento e seu posterior efeito inseticida nos bioensaios podem apresentar variação entre os diferentes gêneros e espécies, *Burkholderia cepacia*, utilizada em ensaios contra larvas de *Drosophila*, apresentou com dois dias de cultivo máxima taxa de mortalidade, após esse período, gradativamente sua eficiência foi reduzida, com perda total de seu efeito de mortalidade com quatro dias de cultivo,

comportamento semelhante foi observado na D.O., que apresentou aos dois dias de cultivo seu valor máximo e após esse período se observou sua redução (Hsu et al., 2014).

Resultados como estes ressaltam a importância da caracterização da curva de crescimento associada ao nível de atividade de cada novo isolado bacteriano, o que possibilita a otimização dos recursos empregados em sua produção para o máximo efeito.

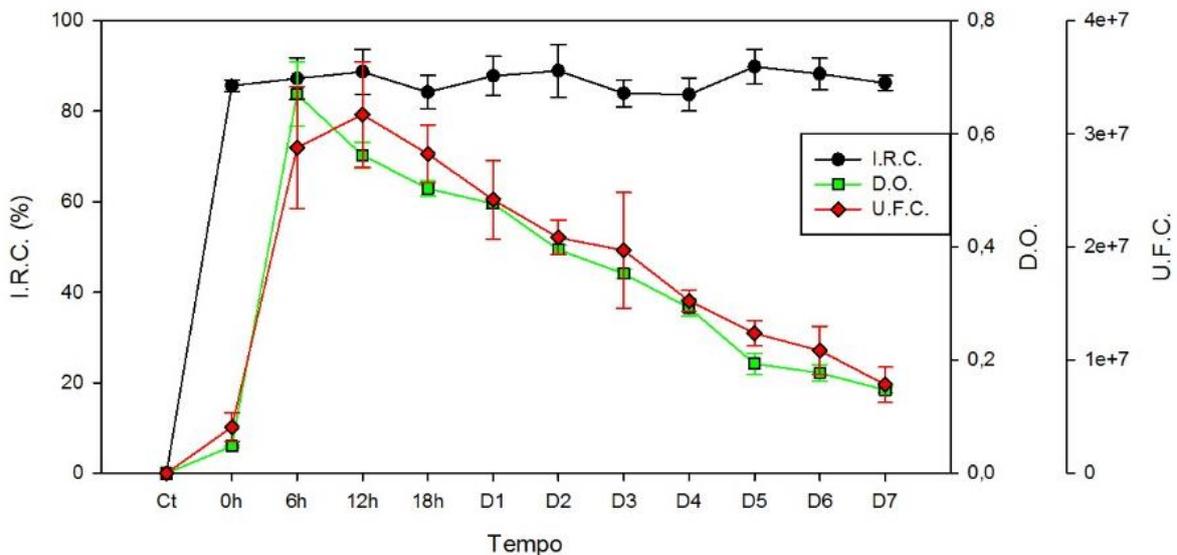


Figura 8. Caracterização da curva de crescimento do isolado 60 pela determinação da densidade óptica D.O. e unidades formadoras de colônia por mililitro (U.F.C./mL), cultivado por até 168 horas, e respectivo efeito inibitório do crescimento de lagartas neonatas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial tratada com o isolado; Ct - Meio LB, (controle negativo). Barras de erro representam o desvio padrão da média.

E. mundtii foi associada de forma direta com a doença 'flacherie' que ocorre em larvas de bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), o que sustenta seu papel biológico como patógeno de alguns insetos (Cappellozza et al., 2011). A espécie também foi correlacionada a uma leve patogenicidade contra larvas de *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) que foram expostas a aplicações tópicas de suspensões bacterianas (Torres-Barragan et al., 2011). Além destes autores, Ruiu (2015) obteve patogenicidade leve, mas significativa, de *E. mundtii* OT15 contra *Lymantria dipar*, *Malacosoma neustria* e *Musca domestica*.

Os dados obtidos neste estudo demonstram o potencial de uso de *E. mundtii* para o desenvolvimento de um produto de origem biológica, no entanto, vários estudos ainda serão necessários para elucidar os mecanismos de ação envolvidos entre outras características, para com isso determinar sua viabilidade no controle de pragas agrícolas.

5. CONCLUSÕES

Com a metodologia adotada foram prospectados 70 isolados, desses, dez foram ativos contra *S. frugiperda* e sete foram fungos fitopatogênicos.

O isolado 60 identificado como *E. mundtii* se destacou por seu efeito inseticida, este proporcionou inibição do crescimento acima de 90%. Com escassos relatos sobre o uso desta espécie para esta finalidade, futuros estudos serão desenvolvidos buscando desvendar seus mecanismos e potencial para o desenvolvimento de um novo bioinseticida.

REFERÊNCIAS

- Abebe Z, Feyisa H. Effects of Nitrogen Rates and Time of Application on Yield of Maize: Rainfall Variability Influenced Time of N Application. *Int J Agron*. 2017;2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1545280>
- Abreo E, Altier N. Pangenome of *Serratia marcescens* strains from nosocomial and environmental origins reveals different populations and the links between them. *Sci Rep*. 2019;9:1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37118-0>
- Abreu JAS de, Rovida AFDS, Conte h. Biological Control of Insects Parasitoids Agricultural Crops in Brazil : **Literature Review**. 2015;22:22–5
- AHDB. **The Encyclopedia of Cereal Diseases**; 2015 [cited [s.d.]]. Available from: <http://cereals.ahdb.org.uk/media/185607/g41-the-encyclopaedia-of-cereal-diseases-2015-branding-.pdf>.
- Albrecht LP, Missio RF. **Manejo de Cultivos Transgênicos**. 2013
- Almeida HMS. Impacto econômico da resistência de pragas à tecnologia Bt no Brasil : um estudo de caso para milho em Rio Verde (GO). 2018
- Alves MV, Santos JCP, Gois DT de, Alberton JV, Baretta D. Macrofauna do solo influenciada pelo uso de fertilizantes químicos e dejetos de suínos no oeste do estado de Santa Catarina. **Rev Bras Ciência do Solo**. 2008;32:589–98
- Amorim L, Rezende JAM, Bergamin AF, Camagor LEA. Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo: 2016. p. 810.
- Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A. Manual de fitopatologia. Princípios e Conceitos. 2011
- Andersson A, Granum PE, Rønner U. The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *Int J Food Microbiol*. 1998;39:93–9. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00121-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00121-9)
- Antoniolli ZI, Conceição PC, Böck V, Port O, Silva DM da, Silva RF da. Método alternativo para estudar a fauna do solo. **Ciência Florest**. 2006;16:407–17
- Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: Beyond vancomycin resistance. **Nat Rev Microbiol**. 2012;10:266–78. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2761>
- Assefa F, Ayalew D. Status and control measures of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) infestations in maize fields in Ethiopia: **A review**. **Cogent Food Agric**. 2019;5. <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1641902>
- Baretta D, Santos JCP, Bertol I, Alves MV, Manfoi AF, Baretta CRDM. Efeito do cultivo do solo sobre a diversidade da fauna edáfica no planalto sul catarinense. **Rev Ciências Agroveterinárias**. 2006;5:108–17

- Barros EM, Torres JB, Bueno AF. Oviposição, Desenvolvimento E Reprodução De *Spodoptera Frugiperda*. **Neotrop Entomol**. 2010a;39:996–1001
- Barros EM, Torres JB, Ruberson JR, Oliveira MD. Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. **Entomol Exp Appl**. 2010b;137:237–45. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2010.01058.x>
- Barros GS de C, Silva HF, Spolador, Bacchi MRP. Supply and Demand Shocks and the Growth of the Brazilian Agriculture. 2009:35–50
- Baturo-Ciesniewska A, Groves CL, Albrecht KA, Grau CR, Willis DK, Smith DL. Molecular identification of *Sclerotinia trifoliorum* and *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from the United States and Poland. **Plant Dis**. 2017;101:192–9. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0896-RE>
- Beckman CH. The nature of wilt diseases of plants. **APS press**. 1987
- Bedding RA, Akhurst RJ. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. **Nematologica**. 1975;21:109–16
- Beemelmans C, Guo H, Rischer M, Poulsen M. Natural products from microbes associated with insects. **Beilstein J Org Chem**. 2016;12:314–27
- Bell DK, Wells HD, Markham CR. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**. 1982;72:379–82
- Bensch K. **Mycobank**; 2019. Available from: <http://www.mycobank.org/BioloMICSDetails.aspx?Rec=24988>.
- Bettiol W. **Biopesticide Use and Research in Brazil**. 2011:2009–12. <https://doi.org/10.1564/22dec10>
- Bhat NN, Mahiya-Farooq, Padder BA, Shah MD, Dar MS, Nabi A, Bano A, Rasool RS, Sana-Surma. Microsatellite mining in the genus *Colletotrichum*. **Gene Reports**. 2018;13:84–93. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2018.09.001>
- Birech R, Freyer B, Macharia J. Towards reducing synthetic pesticide imports in favour of locally available botanicals in Kenya. **Conf Int Agric Res Dev Tropentag**. 2006:11–3
- Bodah TE. Root Rot Diseases in Plants: A Review of Common Causal Agents and Management Strategies. **Agric Res Technol Open Access J**. 2017;5. <https://doi.org/10.19080/artoaj.2017.05.555661>
- Bravo A, Gill SS, Sobero M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. 2007;49:423–35. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>
- Bueno CJ, Ambrósio MM de Q, Souza NL de. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa**

Phytopathol. 2007;33:47–55. <https://doi.org/10.1590/s0100-54052007000100007>

Burchill RT, Beever DJ. Seasonal fluctuations in ascospore concentrations of *Didymella applanata* in relation to raspberry spur blight incidence. 1975:299–304

Cabi. Compêndio de espécies invasoras de *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho); 2017 [cited [s.d.]]. Available from: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/29810>.

Cai L, Hyde KD, Taylor P, Weir BS, Waller JM, Abang MM, Zhang JZ, Yang YL, Phoulivong S, Liu ZY, Prihastuti H, Shivas RG, Mckenzie E, Johnston PR. A polyphasic approach for studying colletotrichum. **Fungal Divers.** 2009;39:183–204

Campanhola C, Bettiol W. Métodos alternativos de controle fitossanitário. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2003.; 2003

Cannon P, Bridge P, Monte E. Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In: Prusky D, Freeman S, Dickman MB. (eds), *Colletotrichum: Host specificity, pathology, and host pathogen interaction*: 1–20. **APS Press**, St. Paul, Minnesota, USA. 2000

Cantrell CL, Dayan FE, Duke SO. Natural products as sources for new pesticides. **J Nat Prod.** 2012;75:1231–42

Capinera. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **IFAS Extension**, Univ Florida. 2000:1–6

Cappelozza S, Saviane A, Tettamanti G, Squadrin M, Vendramin E, Paolucci P, Franzetti E, Squartini A. Identification of *Enterococcus mundtii* as a pathogenic agent involved in the “flacherie” disease in *Bombyx mori* L. larvae reared on artificial diet. **J Invertebr Pathol.** 2011;106:386–93. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.12.007>

Carneiro FF, Augusto LG da S, Rigotto RM, Friedrich K, Búrigo AC. **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** 2018

Cepea. **Panorama do Agro;** 2020 [cited [s.d.]]. Available from: https://www.cnabrazil.org.br/cna/panorama-do-agro#_ftnref1.

Chattopadhyay P, Banerjee G, Mukherjee S. Recent trends of modern bacterial insecticides for pest control practice in integrated crop management system. **3 Biotech.** 2017;7:1–11. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0717-6>

Cooper RM, Bishop CD. An ultrastructural study of vascular colonization three vascular wilt diseases I . Colonization of susceptible cultivars. **Physiol Plant Pathol.** 1983;23:323–43

Corden JM, Millington WM. *Didymella* ascospores in derby. **Grana.** 1994;33:104–7. <https://doi.org/10.1080/00173139409427841>

Crawford JM, Clardy J. Bacterial symbionts and natural products. **Chem Commun.** 2011;47:7559–66. <https://doi.org/10.1039/c1cc11574j>

Cromey MG, Butler RC, MacE MA, Cole ALJ. Effects of the fungicides azoxystrobin and tebuconazole on *Didymella exitialis*, leaf senescence and grain yield in wheat. **Crop Prot.** 2004;23:1019–30. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2004.03.002>

Cromey MG, Ganey S, Braithwaite M, Boddington HJ. *Didymella exitialis* on wheat in new zealand. **New Zeal J Crop Hortic Sci.** 1994;22:139–44. <https://doi.org/10.1080/01140671.1994.9513817>

Cruz I. **Manejo de pragas da cultura de milho.** 2002

Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Crous PW. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Stud Mycol.** 2012a;73:37–113. <https://doi.org/10.3114/sim0010>

Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Johnston PR, Weir BS, Tan YP, Shivas RG, Crous PW. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Stud Mycol.** 2012b;73:1–36. <https://doi.org/10.3114/sim0002>

Dayan FE, Cantrell CL, Duke SO. Natural products in crop protection. **Bioorg Med Chem.** 2009;17:4022–34

Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Mol Plant Pathol.** 2012;13:414–30. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>

Diez-Rodríguez GI, Omoto C. Herança da Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) a *Lambda-Cialotrina*. **Proteção de plantas.** 2001;30:311–6

Douglas AE. Symbiotic microorganisms: untapped resources for insect pest control. **TRENDS Biotechnol.** 2007;25:338–42

Dullahide SR, Stirling GR, Nikulin A, Stirling AM. The role of nematodes, fungi, bacteria, and abiotic factors in the etiology of apple replant problems in the granite belt of queensland. **Aust J Exp Agric.** 1994;34:1177–82. <https://doi.org/10.1071/EA9941177>

Espeche MC, Otero MC, Sesma F, Nader-Macias MEF. Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. **Vet Microbiol.** 2009;135:346–57. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.078>

Feldhaar H. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. **Ecol Entomol.** 2011;36:533–43

Ferreira AE, Canal N, Morales D, Fuentesfria DB, Corção G. Characterization of enterocins produced by *Enterococcus mundtii* isolated from humans feces. **Brazilian Arch Biol Technol.** 2007;50:249–58. <https://doi.org/10.1590/S1516->

89132007000200010

Fiori ACG, Schwan-Estrada KRF, Stangarlin JR, Vida JB, Scapim CA, Cruz MES, Pascholati SF. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **J Phytopathol**. 2000;148:483–7

Fisher NL. Carnation Leaves as a Substrate and for Preserving Cultures of *Fusarium* species. **Phytopathology**. 1982;72:151. <https://doi.org/10.1094/phyto-77-151>

Fiuza L, Schünemann R, Pinto L, Zanettini H. **Two new Brazilian isolates of *Bacillus thuringiensis* toxic to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2012;72:363–9

Fox R. **Doenças bacterianas e fúngicas de plantas de jardim** **Microbiol**. 2005:60–3

Frankland A, Gregory P. Implicações alérgicas e agrícolas das concentrações de ascósporos transportados pelo ar de um fungo, *Didymella exitialis*. **J Chem Inf Model**. 1973;53:1689–99

Frizzas MR, Oliveira CM de. Insect-resistant transgenic plants and non-target organisms: predators, parasitoids and pollinators. 2006;18:63–82

Gatiboni LC, Coimbra JLM, do Prado Wildner L, Denardin RBN. Modificações na fauna edáfica durante a decomposição da palhada de centeio e aveia preta, em sistema plantio direto. **Biotemas**. 2009;22:45–53

Giolo FP, Grützmacher AD, Garcia MS, Busato GR. BIOLOGY PARAMETERS OF *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEP.: NOCTUIDAE) ORIGINATING FROM DIFFERENT PLACES AND HOST. **Curr Agric Sci Technol**. 2002;8:219–24. <https://doi.org/10.18539/cast.v8i3.472>

Giraffa G. Functionality of enterococci in dairy products. **Int J Food Microbiol**. 2003;88:215–22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00183-1)

Gomes JM. AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA LINHAGEM BACTERIANA 358.1 SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). 2017:1–62

Gomes MAF, Souza MD, Boeira RC, Toledo LG. Nutrientes vegetais no meio ambiente: ciclos bioquímicos, fertilizantes e corretivos. **Embrapa Meio Ambient Doc 66**. 2008:62

Gonçalves Jr AC. Descontaminação e monitoramento de águas e solos na região amazônica utilizando materiais adsorventes alternativos, visando remoção de metais pesados tóxicos e pesticidas. **Inclusao Soc**. 2013;6

Granum PE, Lund T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiol Lett**. 1997;157:223–8. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00438-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00438-2)

Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium. **J Econ Entomol.** 1976;69:487–8. <https://doi.org/10.1093/jee/69.4.487>

Halimatunsadiah AB, Norida M, Omar D, Kamarulzaman NH. Application of pesticide in pest management: The case of lowland vegetable growers. **Int Food Res J.** 2016;23:85–94

Hartl R, Kerschner H, Gattringer R, Lepuschitz S, Allerberger F, Sorschag S, Ruppitsch W, Apfalter P. Whole-Genome Analysis of a Human *Enterobacter mori* Isolate Carrying a bla IMI-2 Carbapenemase in Austria. **Microb Drug Resist.** 2019;25:94–6. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0098>

Hillocks RJ, Waller JM. Soilborne diseases and their importance in tropical agriculture. In: Hillocks, R.J. & Waller, J.M. (Eds.) *Soilborne Diseases of Tropical Crops.* **Wallingfor.** 1997

Hoog GS, Gene H, Figueras MJ. **Atlas of Clinical Fungi** 2nd Edition. 2014:1126 p. <https://doi.org/10.1007/s101230100009>

Hsu CH, Nguyen AD, Chen YW, Wang SL. Tyrosinase inhibitors and insecticidal materials produced by *Burkholderia cepacia* using squid pen as the sole carbon and nitrogen source. **Res Chem Intermed.** 2014;40:2249–58. <https://doi.org/10.1007/s11164-014-1602-0>

Iguchi A, Nagaya Y, Pradel E, Ooka T, Ogura Y, Katsura K, Kurokawa K, Oshima K, Hattori M, Parkhill J, Sebaihia M, Coulthurst SJ, Gotoh N, Thomson NR, Ewbank JJ, Hayashi T. Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen. **Genome Biol Evol.** 2014;6:2096–110. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu160>

Imhoff JF, Labes A, Wiese J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. **Biotechnol Adv.** 2011;29:468–82. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.03.001>

Jackson F, Didymella K, Wilken-Jensen, S, Gravesen (Eds.), *Atlas of Molds in Europe*, **ASK Publishing**, Baarn. 1984:30

Jia W, Li G, Wang W. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species: A hospital-based study in China. **Int J Environ Res Public Health.** 2014;11:3424–42. <https://doi.org/10.3390/ijerph110303424>

Kaiser IS. **Manejo de *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae) com entomopatógenos** (58f., Dissertação (Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal), Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre). 2016

Kaya HK, Stock SP. Manual of techniques in insect pathology. **Techniques.** San Diego: Academic Press: 1997

Kergoat GJ, Prowell DP, Le Ru BP, Mitchell A, Dumas P, Clamens AL, Condamine FL,

Silvain JF. Disentangling dispersal, vicariance and adaptive radiation patterns: A case study using armyworms in the pest genus *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Mol Phylogenet Evol.** 2012;65:855–70. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.08.006>

Khan TN, Timmerman-Vaughan GM, Rubiales D, Warkentin TD, Siddique KHM, Erskine W, Barbetti MJ. *Didymella pinodes* and its management in field pea: Challenges and opportunities. **F Crop Res.** 2013;148:61–77. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.04.003>

Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo L, Rezende J. Manual de Fitopatologia. v. 2. Piracicaba: Ceres, p.331-332. 1997

De Kwaadsteniet M, Todorov SD, Knoetze H, Dicks LMT. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Int J Food Microbiol.** 2005;105:433–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.021>

Kwak Y, Khan AR, Shin JH. Genome sequence of *Serratia nematodiphila* DSM 21420T, a symbiotic bacterium from entomopathogenic nematode. **J Biotechnol.** 2015;193:1–2. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.11.002>

Leite RMVBDC. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. **Comun Técnico**, no 76 - Embrapa. 2005:1–3

Lengai GMW, Muthomi JW. Biopesticides and Their Role in Sustainable Agricultural Production. **J Biosci Med.** 2018;06:7–41. <https://doi.org/10.4236/jbm.2018.66002>

Liang TW, Chen CH, Wang SL. Production of insecticidal materials from *Pseudomonas tamsuii*. **Res Chem Intermed.** 2015;41:7965–71. <https://doi.org/10.1007/s11164-014-1869-1>

Van Loon LC, Bakker P, Pieterse CMJ. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annu Rev Phytopathol.** 1998;36:453–83

Lopes UP, Michereff SJ. **Fundamentos e desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos.** 2018

Machado V, Fiuza LM. Manejo da resistência: Na era das plantas transgênicas. **Oecologia Aust.** 2011;15:291–302. <https://doi.org/10.4257/oeco.2011.1502.07>

Mahmoud MF. Biology and Use of Entomopathogenic Nematodes in Insect Pests Biocontrol , a **Veneric View.** 2017. <https://doi.org/10.1515/cerce-2016-0039>

Marucci R, SM M, IL S. Milho. **Springer.** 2019;8:55

Mendes MAS, Silva VL da, Dianese JC, Ferreira M, Santos CEN dos, Gomes Neto E, Urben AF, Castro C. **Fungos em plantas no Brasil.** 1998

Mendes SM, Marucci RC, Waquil JM. Manejo de Pragas nos Sistemas de Produção de Milho no Brasil: Inovações Tecnológicas no Manejo de Lagartas em Lavouras de

Milho Convencional e Bt. 2018.

Mendgen K, Hahn M, Deising H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. **Annu Rev Phytopathol.** 1996;34:367–86. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.367>

Michereff SJ, Andrade DE, Menezes M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais.** UFRPE, Imp. 2005

Monticelli J, Knezevich A, Luzzati R, Di S. Clinical management of non- faecium non-faecalis vancomycin- resistant enterococci infection . Focus on *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* / *flavescens*. 2018;24. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.01.001>

Morandi MAB, Bettiol W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. Embrapa Meio Ambient em **livro científico.** 2009

Nelson PE. **Taxonomy of fungi in the genus Fusarium with emphasis on Fusarium oxysporum. Fusarium wilt of banana.** 1990

Nicolaisen M, Justesen AF, Knorr K, Wang J, Pinnschmidt HO. Fungal communities in wheat grain show significant co-existence patterns among species. **Fungal Ecol.** 2014;11:145–53. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.06.002>

O'Connor DJ, Sadyś M, Skjøth CA, Healy DA, Kennedy R, Sodeau JR. Atmospheric concentrations of Alternaria, Cladosporium, Ganoderma and Didymella spores monitored in Cork (Ireland) and Worcester (England) during the summer of 2010. **Aerobiologia** (Bologna). 2014;30:397–411. <https://doi.org/10.1007/s10453-014-9337-3>

O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Sarver BAJ, Balajee SA, Schroers H-J, Summerbell RC, Robert VARG, Crous PW, Zhang N. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. **J Clin Microbiol.** 2010;48:3708–18

Oerke EC. Crop losses to pests. **J Agric Sci.** 2006;144:31–43. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>

Oerke EC, Dehne HW. Safeguarding production - Losses in major crops and the role of crop protection. **Crop Prot.** 2004;23:275–85. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.001>

Ogier JC, Serror P. Safety assessment of dairy microorganisms: The Enterococcus genus. **Int J Food Microbiol.** 2008;126:291–301. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.017>

Oh SY, Fong JJ, Park MS, Chang L, Lim YW. Identifying airborne fungi in Seoul, Korea using metagenomics. **J Microbiol.** 2014;52:465–72. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3550-1>

Oliveira CM, Auad AM, Mendes SM, Frizzas MR. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Prot.** 2014;56:50–4. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.10.022>

Ortega HE, Ferreira LLG, Melo WGP, Oliveira ALL, Alvarenga RFR, Lopes NP, Bugni TS, Andricopulo AD, Pupo MT. Antifungal compounds from *Streptomyces* associated with attine ants also inhibit *Leishmania donovani*. **PLoS Negl Trop Dis.** 2019;13:1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007643>

Parra JRP. Biological Control in Brazil: An overview. **Sci Agric.** 2014

Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves. Microbial ecology of leaves. **Springer;** 1991. p. 179–97.

Pignati WA, e Lima FAN de S, de Lara SS, Correa MLM, Barbosa JR, Leão LHDC, Pignatti MG. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: Uma ferramenta para a vigilância em saúde. **Cienc e Saude Coletiva.** 2017;22:3281–93. <https://doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>

Pilkington LJ, Messelink G, Lenteren JC Van, Le K. “ Protected Biological Control ” – Biological pest management in the greenhouse industry. **Biol Control.** 2010;52:216–20. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.022>

Pinotti MMZ, Santos JCP. From the ancient times of the agriculture to the biological control in plants: a little of the history. **Ciência Rural.** 2013;43:1797–803. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782013001000011>

Polanczyk RA. **ESTUDOS DE *Bacillus thuringiensis* Berliner VISANDO AO CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda* (J . E . Smith).** 2004

Prasanna B, Huesing JE, Eddy R, Peschke VM. Fall Armyworm in Africa: a Guide for Integrated Pest Management. **Mex CDMX CIMMYT.** 2018;First Edit:45–62

Prashar P, Shah S. Impact of fertilizers and pesticides on soil microflora in agriculture. Sustainable agriculture reviews. **Springer;** 2016. p. 331–61.

Promip. **Manejo integrado de pragas;** 2021 [cited 2021 jan. 11]. Available from: <https://promip.agr.br/de-olho-lagarta-cartucho/>.

Raaijmakers JM, Mazzola M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. **Annu Rev Phytopathol.** 2012;50:403–24. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172908>

Rodrigues AR dos S. **Caracterização da Resistência de Joaninhas Predadoras ao *Lambdacialotrina*.** 2012

Rönner U, Husmark U, Henriksson A. Adhesion of bacillus spores in relation to hydrophobicity. **J Appl Bacteriol.** 1990;69:550–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

2672.1990.tb01547.x

Ruiu L. Insect pathogenic bacteria in integrated pest management. **Insects**. 2015;6:352–67. <https://doi.org/10.3390/insects6020352>

Sadyś M, West JS. Intra-diurnal and daily changes in *Didymella* ascospore concentrations in the air of an urban site. **Fungal Ecol**. 2017;27:87–95. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.03.002>

Saharan GS, Mehta N. Sclerotinia disease of crop plants: Biology, ecology and disease management. **Hisar: Spr**. 2008

Salam MU, Galloway J, Diggle AJ, MacLeod WJ, Maling T. Predicting regional-scale spread of ascospores of *Didymella pinodes* causing ascochyta blight disease on field pea. **Australas Plant Pathol**. 2011;40:640–7. <https://doi.org/10.1007/s13313-011-0064-8>

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. book.pdfMolecular cloning: a laboratory manual. **Cold sprin**. 1989

Santos GR dos, Leão EU, Castro HG de, Nascimento IR do, Sarmento R de A, Brum RBCS. Crestamento gomoso do caule da melancia: Etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **J Biotechnol Biodivers**. 2011;2:52–8. <https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v2n2.rodriguessantos>

Santos HA dos. **Trichoderma spp. como promotores de crescimento em plantas e como antagonistas a Fusarium oxysporum**. 2008

Sarmento RDA, Aguiar, Raimundo Wagner De Souza A, Aguiar RDASDS, Vieira SMJ, Oliveira HG De, Holtz AM. Revisão da Biologia, Ocorrência e Controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em Milho no Brasil. **Biosci J**. 2002;18:41–8

Settanni L, Valmorri S, Suzzi G, Corsetti A. The role of environmental factors and medium composition on bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) production by *Enterococcus mundtii* strains. **Food Microbiol**. 2008;25:722–8. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.01.011>

Shao Y, Arias-Cordero E, Guo H, Bartram S, Boland W. In vivo Pyro-SIP assessing active gut microbiota of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. **PLoS One**. 2014;9:1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085948>

Shao Y, Chen B, Sun C, Ishida K, Hertweck C, Boland W. Symbiont-Derived Antimicrobials Contribute to the Control of the Lepidopteran Gut Microbiota. **Cell Chem Biol**. 2017;24:66–75. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.11.015>

Sidrim JJC, Rocha MFG. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro, RJ. 2010

Silva HSA, da Silva Romeiro R, Macagnan D, de Almeida Halfeld-Vieira B, Pereira MCB, Mounter A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants:

non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biol Control**. 2004;29:288–95

Simonato J. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INIMIGOS NATURAIS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Helicoverpa armigera* (HÜBNER, 1805) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**. 2018. 96 f. Tese (Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados. Orientada por: Dr. Harley Nonato de Oliveira.

Simonato J, Grigolli JFJ, Oliveira HN de. **Controle Biológico de Insetos-Praga na Soja**. 2014

Spartaco A. F.; Silva C. G. N.; Acácio M. de F. M. **Bioprospecção e biotecnologia**. 2014:45–80

Stefansson TS, Hallsson JH. Analysis of the species diversity of leaf pathogens in Icelandic Barley fields. **Icelandic Agric Sci**. 2011;24:13–22

Stokstad E. New crop pest takes Africa at lightning speed. **Science** (80-). 2017;356:473–4. <https://doi.org/10.1126/science.356.6337.473>

Sutton B. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey JA, Jeger MJ. (eds), *Colletotrichum: biology, pathology and control*: 1–26. **CAB International**, Wallingford, UK. 1992

Tabashnik BE, Carrière Y. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nat Biotechnol**. 2017;35:926–35. <https://doi.org/10.1038/nbt.3974>

Tan CK, Lai CC, Wang JY, Lin SH, Liao CH, Huang YT, Wang CY, Lin HI, Hsueh PR. Bacteremia caused by non-faecalis and non-faecium enterococcus species at a Medical center in Taiwan, 2000 to 2008. **J Infect**. 2010;61:34–43. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.04.007>

Torres-Barragan A, Suazo A, Buhler WG, Cardoza YJ. Studies on the entomopathogenicity and bacterial associates of the nematode *Oscheius carolinensis*. **Biol Control**. 2011;59:123–9. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.05.020>

Trapero-Casas A, Navas-Cortés JA, Jiménez-Díaz RM. Airborne ascospores of *Didymella rabiei* as a major primary inoculum for *Ascochyta* blight epidemics in chickpea crops in southern Spain. **Eur J Plant Pathol**. 1996;102:237–45. <https://doi.org/10.1007/BF01877962>

Tsutsumi C. **Triagem de populações de melão (*Cucumis melo* L.) para resistência à *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm**. Botucatu:UNESP-FCA.79f. (Dissertação de Mestrado). 1995

Udayanga D, Manamgoda DS, Liu X, Chukeatirote E, Hyde KD. **What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits?** **Fungal Divers**. 2013;61:165–79. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0257-2>

Usda. **United States Department of Agriculture**. Production, Supply and Distribution Online; 2020 [cited [s.d.]]. Available from: www.fas.usda.gov/psdonline.

Valicente FH. **Controle biológico de pragas com entomopatógenos**. 2009

Varma A, Verma S, Sahay N, Bütehorn B, Franken P. Piriformospora indica, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Appl Environ Microbiol**. 1999;65:2741–4

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J Bacteriol**. 1991;173:697–703

Willbur J, McCaghey M, Kabbage M, Smith DL. An overview of the Sclerotinia sclerotiorum pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. **Trop Plant Pathol**. 2019;44:3–11. <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0250-0>

Wu W, Zong Z. Genome analysis-based reclassification of Enterobacter tabaci Duan et al. 2016 as a later heterotypic synonym of Enterobacter mori Zhu et al. 2011. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2020;70:1055–8. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003871>

Yu SJ, Nguyen SN, Abo-Elghar GE. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, Spodoptera frugiperda (J.E. Smith). **Pestic Biochem Physiol**. 2003;77:1–11. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(03\)00079-8](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(03)00079-8)

Zhao B, Ye MS, Zheng R. Enterococcus gallinarum meningitis: A case report and literature review. **BMC Infect Dis**. 2018;18:2–5. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3151-4>

Zhu B, Zhang GQ, Lou MM, Tian WX, Li B, Zhou XP, Wang GF, Liu H, Xie GL, Jin GL. Genome Sequence of the Enterobacter mori type strain, LMG 25706, a pathogenic bacterium of Morus alba L. **J Bacteriol**. 2011;193:3670–1. <https://doi.org/10.1128/JB.05200-11>