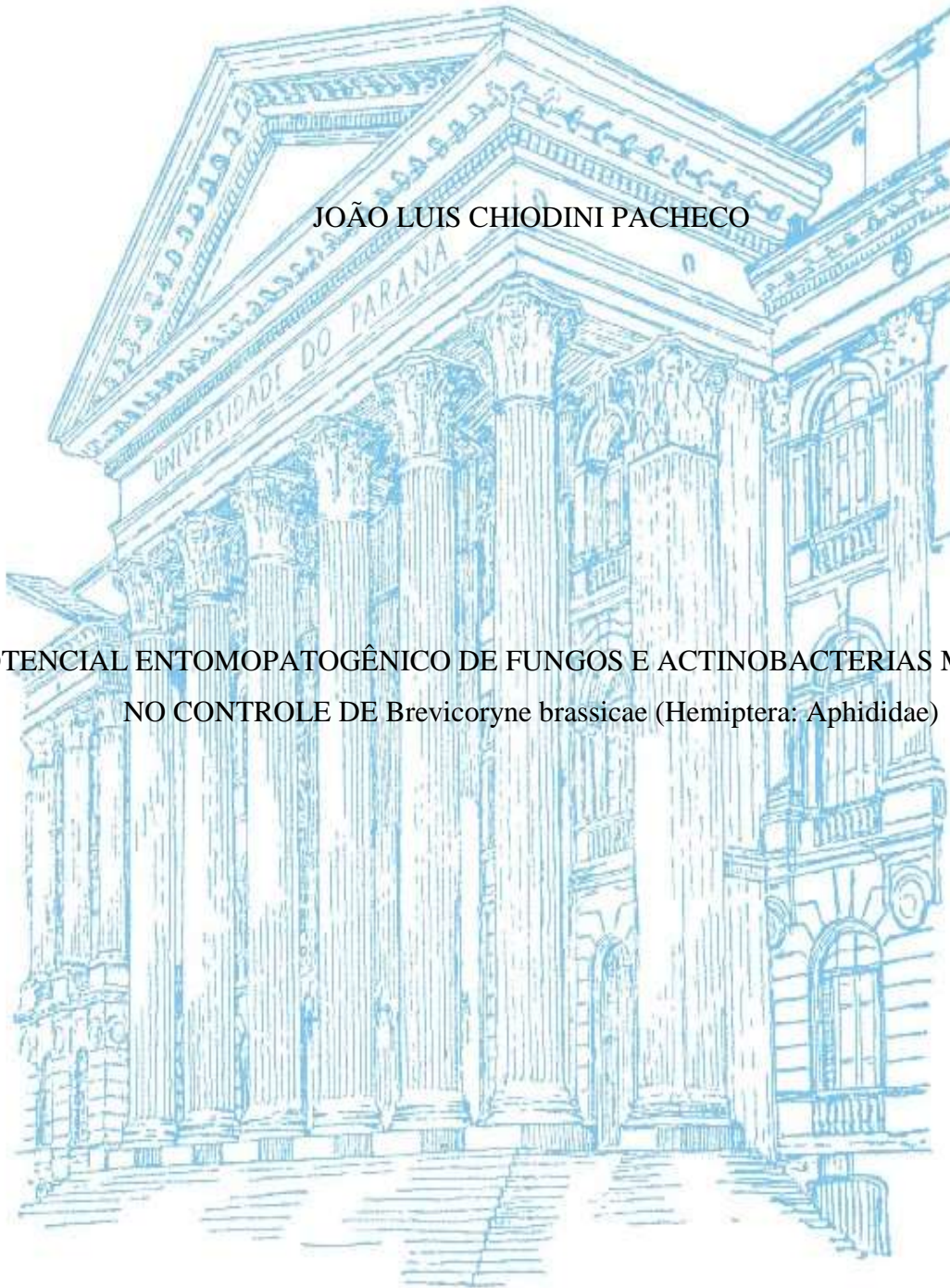


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO LUIS CHIODINI PACHECO

POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO DE FUNGOS E ACTINOBACTERIAS MARINHAS
NO CONTROLE DE *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae)



CURITIBA
2015

JOÃO LUÍS CHIODINI PACHECO

POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO DE FUNGOS E ACTINOBACTERIAS MARINHAS
NO CONTROLE DE *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de Concentração em Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Ida Chapaval Pimentel

Co-orientadora: Mariana Porsani

CURITIBA

2015



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“AVALIAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS E FUNGOS COM
POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO PARA CONTROLE DE
Brevicoryne brassicae (HEMIPTERA:APHIDIDAE)”**

Por

JOÃO LUÍS CHIODINI PACHECO

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**


Prof.^a Dr.^a Ida Chapaval Pimentel (presidente)


Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Cassilha Zawadneak


Dr. Alex Sandro Poltronieri

Curitiba, 23 de fevereiro de 2015.

Aos meus pais.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Ivanir e Valdir, por possibilitarem que seguisse o enfoque acadêmico, ademais dos obstáculos que passaram. À minha irmã, Joice, que sempre apoiou minhas ideias.

À professora Ida Chapaval Pimentel pela aceitação como orientado, mesmo eu carecendo de muito além de apressado pela área.

À professora Maria Aparecida Cassilha Zawadneak pelas informações e disponibilização de espaço aos experimentos.

À Mariana Vieira Porsani, por suprir o conhecimento e técnicas que me faltavam.

Ao Alex Sandro Poltronieri por sua presença e experiência compartilhada.

Agradeço à CAPES e ProExt MEC SESU pelo apoio financeiro.

À equipe do LabMicro e do Laboratório Prof^o Ângelo Moreira da Costa Lima, pelo espaço e ajuda quando necessário.

Agradeço à minha noiva, Sheila, por estar comigo desde o início, pelo apoio e ajuda, principalmente pela presença durante este período.

Aos meus amigos, aqueles que bateram em meu ombro ou apenas sorriram a distância, pela consideração e afirmação de sucesso.

Muito obrigado a todos.

RESUMO

O cultivo de couve-manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*) é acometido de infestações de diversas pragas, entre elas o pulgão da couve *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera, Aphididae). O controle biológico é uma forma de contornar a proliferação destas sem utilizar agentes químicos agressivos. A redução destes diminui sua deposição sobre as plantas, contaminação de vias pluviais e consumo pela população. Fungos e actinobactérias são agentes microbianos utilizados por sua conhecida atividade entomopatogênica. Dentre estes, os retirados de sedimento marinho podem ser promissores no controle biológico, principalmente devido à adaptação às condições extremas deste ambiente. Neste sentido, foram avaliados cinco isolados fúngicos (*Aspergillus versicolor*, *A. sydowii*, *Penicillium dipodomycicola*, e *Trichoderma harzianum*), e cinco bacterianos (*Streptomyces variabilis*, *S. seoulensis*, *S. cavourensis*, *S. parvus* e *S. bacillaris*) em relação à letalidade contra *B. brassicae*. Os mais virulentos em cada categoria foram *A. versicolor* (100% de mortalidade em 48h) e *S. variabilis* (100% de mortalidade em 96h). Em seguida foi estipulada a Concentração Letal Média (CL₅₀) para cada isolado ($16,43 \times 10^3$ conídios.mL⁻¹ e $0,20 \times 10^7$ células.mL⁻¹, respectivamente). A concentração sub-letal (CL₂₅) foi mensurada ($0,32 \times 10^3$ conídios.mL⁻¹ e $0,12 \times 10^6$ células.mL⁻¹, respectivamente) e utilizada a fim de avaliar seus efeitos sobre os parâmetros de crescimento populacional de *B. brassicae*. Ambos não apresentaram efeito direto sobre a taxa líquida de reprodução, a duração média de uma geração, a taxa intrínseca de crescimento populacional, na razão finita de aumento populacional nem no tempo que a população leva para duplicar em número. *A. versicolor* também foi comparado a dois produtos comerciais, Methamax[®] e Bovemax[®], apresentando mortalidade total similar a estes inseticidas. A aplicação de solução de *S. variabilis* alterou o comportamento alimentar de *B. brassicae*, resultando em uma redução de 75% das excretas. *A. versicolor* e *S. variabilis* mostram-se organismos promissores como agentes de biocontrole.

Palavras-chave: Controle biológico, bioprospecção, concentração letal média, entomopatógeno.

ABSTRACT

The kale crop (*Brassica oleracea* var. *Acephala*) is affected by infestations of various pests, including the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera, Aphididae). Biological control is a way to reduce the proliferation of these without using harsh chemicals. Reducing these decreases their deposition on plants, contamination of storm tracks and consumption by the population. Fungi and actinomycetes are microbial agents used for their known entomopathogenic properties. Among these, isolates from marine sediment can be promising for biological control, mainly due to adaptation to extreme conditions of this environment. In this sense, we evaluated five fungal isolates (*Aspergillus versicolor*, *A. sydowii*, *Penicillium dipodomycicola* and *Trichoderma harzianum*) and five bacterial (*Streptomyces variabilis*, *S. seoulensis*, *S. cavourensis*, *S.* and *S. parvus bacillaris*) in relation to mortality against *B. brassicae*. The more virulent in each category were *A. versicolor* (100% mortality in 48 hours) and *S. variabilis* (100% mortality at 96h). Then it was stipulated the Mean Lethal Concentration (LC₅₀) for each isolate ($16,43 \times 10^3$ conidia.mL⁻¹ and $0,20 \times 10^7$ cells.mL⁻¹, respectively). The sub-lethal concentration (LC₂₅) was measured ($0,32 \times 10^3$ conidia.ml⁻¹ and $0,12 \times 10^6$ cell.mL⁻¹, respectively) and used in order to evaluate its effects on the parameters of population growth of *B. brassicae*. Both do not present a direct effect on the net reproductive rate, the average length of a generation, intrinsic rate of population growth, finite rate of population growth or the time the population takes to double in size. *A. versicolor* was also compared to two commercial products, Methamax® and Bovemax®, with total mortality similar to them. The application of *S. variabilis* solution changed the feeding behavior of *B. brassicae*, resulting in a reduction of 75 % of the excreta. *A. versicolor* and *S. variabilis* are shown promising organisms as this aphid control agents.

Keywords: Biological control, bioprospecting, median lethal concentration, entomopathogen

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
SUMÁRIO	8
1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 A CULTURA DA COUVE.....	13
2.2 <i>Brevicoryne brassicae</i>	13
2.3 MÉTODOS DE CONTROLE QUÍMICOS E BIOLÓGICOS.....	14
2.4 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS	15
2.5 BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS	17
2.5 MICRORGANISMOS MARINHOS	19
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 1	33
IDENTIFICAÇÃO E POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICOS DE FUNGOS ISOLADOS EM AMBIENTES MARINHOS	33
RESUMO	33
CHAPTER 1	34
IDENTIFICATION AND ENTOMOPATHOGENIC POTENTIAL OF FUNGI ISOLATED FROM MARINE ENVIRONMENTS	34
ABSTRACT	34
1 INTRODUÇÃO.....	35
2 MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.1 CRIAÇÃO DE <i>Brevicoryne brassicae</i>	37
2.2 MICRO-ORGANISMOS E MEIO DE CULTURA	37
2.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS	38
2.4 SELEÇÃO DO FUNGO COM MAIOR POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO	38
2.5 AVALIAÇÃO DO ISOLADO FÚNGICO MAIS PROMISSOR COM BIOINSETICIDAS COMERCIAIS	41
2.6 CARACTERIZAÇÃO TOXICOLÓGICA DO ISOLADO FÚNGICO MAIS PROMISSOR.....	41
2.7 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS LETAL E SUBLETAL DO FUNGO MAIS PROMISSOR.....	42
2.8 ANÁLISE DOS DADOS	44
3 RESULTADOS	45
3.1 IDENTIFICAÇÕES DOS MICRO-ORGANISMOS.....	45
3.2 SELEÇÃO DO FUNGO COM MAIOR POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO	51
3.3 AVALIAÇÃO DO ISOLADO FÚNGICO MAIS PROMISSOR COM BIOINSETICIDAS COMERCIAIS	52
3.4 CARACTERIZAÇÃO TOXICOLÓGICA DO ISOLADO FÚNGICO MAIS PROMISSOR.....	54
3.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS LETAL E SUBLETAL DO FUNGO MAIS PROMISSOR.....	55
4 DISCUSSÃO	57
REFERÊNCIAS	61
CAPÍTULO 2	74

IDENTIFICAÇÃO E POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICOS DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS EM AMBIENTES MARINHOS	74
RESUMO	74
CHAPTER 2	75
ABSTRACT	75
1 INTRODUÇÃO	76
2 MATERIAIS E MÉTODOS	78
2.1 CRIAÇÃO DE <i>Brevicoryne brassicae</i>	78
2.2 ACTINOBACTÉRIA E MEIOS DE CULTURA	78
2.3 SELEÇÃO DA ACTINOBACTÉRIA COM MAIOR POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO.....	79
2.4 ESTIMATIVA DA LINHA DE CONCENTRAÇÃO RESPOSTA	80
2.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS LETAL E SUBLETAL	81
2.6 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR.....	83
2.7 ANÁLISE DOS DADOS	84
3 RESULTADOS	85
3.1 SELEÇÃO DA ACTINOBACTÉRIA COM MAIOR POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO.....	85
3.2 ESTIMATIVA DA LINHA DE CONCENTRAÇÃO RESPOSTA	86
3.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS.....	87
3.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR.....	88
4 DISCUSSÃO	90
REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO GERAL

A couve-manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*) é uma das principais hortaliças cultivadas no mundo, uma importante fonte de renda para agricultores no Brasil (NOVO *et al.*, 2010). Um dos maiores problemas na cultura de brássicas é a alta incidência de pragas em todas as fases da cultura. As plantas de couve são acometidas por diversas pragas, sendo a praga-chave o pulgão-da-couve *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae). Este afídeo é responsável por danos diretos e indiretos, prejudicando o desenvolvimento da couve, que tem seu valor comercial diminuído (MA *et al.*, 2010). Primariamente, a alimentação causa o esmaecimento e amarelamento (OPFER & MCGRATH, 2013). Há também produção *honeydew* que favorece o desenvolvimento de fungos sobre as folhas, diminuindo a taxa de fotossíntese da planta (ASI *et al.*, 2009). Kumar e Chapman (1984) relatam que o pulgão também causa danos secundários pela inoculação de vírus presentes em sua saliva e há a estimativa que haja uma perda de até 80% dos cultivos de brássicas somente pela ação de *B. brassicae* (Razaq *et al.*, 2011). No Brasil o controle desta praga é feito com pulverizações sistemáticas com inseticidas químicos.

No Brasil são utilizados inseticidas de amplo espectro de ação no controle de *B. brassicae*. Entre os inseticidas liberados para controle do afídeo estão neonicotinoides, piretroides, organofosforados (MAPA, 2014). Mesmo com as altas taxas de mortalidade que atingem artrópodes fitófagos, como este afídeo, o uso de pesticidas de amplo espectro também elimina seus predadores e parasitoides diretos (BACCI *et al.*, 2009) e tem colocado a couve entre os produtos agrícolas com maior residual de pesticidas (ANVISA, 2011). O acúmulo de pesticidas devido ao uso exagerado elimina os indivíduos suscetíveis, selecionando os resistentes, tornando difícil o controle da praga tanto em campo quanto em estufas (PAVELA, 2013). Andrews *et al.* (2004) identificaram em *B. brassicae* a presença do gene *ace1*, responsável pela insensibilidade à acetilcolinesterase, e à inseticidas organofosforados e a base de carbamato. A situação pode ser mais grave devido a contaminação ambiental e humana (AHMAD & ASLAM, 2005; AHMAD & AKHATAR, 2013).

Para contornar os problemas enfrentados pelo uso de pesticidas há o controle biológico, baseado no emprego de predadores, parasitoides e microrganismos, que em sua forma natural, é responsável pelo controle de 95% das pragas no planeta (MELO, 2002). Uma forma de manejo de pragas, aprimorada do controle biológico clássico é utilizando de agentes microbianos. Baker

(1991) lista uma série de estudos que utilizam microrganismos para o controle de fitopatógenos, demonstrando que seu uso pode ser estendido a organismos mais complexos, como insetos, e de propõe a transferência de genes às plantas para que estas desenvolvam formas inerentes de combate às pragas, como síntese de metabólidos com ação fagodeterrente. Melo (2012) dá foco ao uso de entomopatógenos, principalmente fungos, que são responsáveis por cerca de 80% das doenças que acometem os insetos, principais pragas agrícolas.

Fungos e actinobactérias são microrganismos amplamente estudados pelo seu potencial no controle de pragas. Ambos formam micélio, com notada capacidade de infecção por contato e produção de metabólicos secundários biologicamente ativos (LU *et al.* 2009). Entre os fungos, Melo (2012) menciona os Filos Ascomycota e Zigomycota como contendo espécies com capacidade de controle de infestações pela produção de micotoxinas. Dentre os fungos mais utilizados no controle de insetos há 12 espécies que têm sido empregadas como ingredientes ativos em micopesticidas (FARIA & WRAIGHT, 2007), com *Beuveria bassiana* (ex: Bovemac[®]) e *Metarhizium anisopliae* (ex: Methamax[®]), como os principais, além de *Lecanicillium spp.*, *Isaria fumosorosea* e *Beuveria brongniartii* (FILHO *et al.* 2009).

Dentre as actinobactérias, os gêneros *Streptomyces* e *Streptoverticillum* apresentam o maior potencial de controle sobre insetos (BREM *et al.*, 2001) e vem sendo exploradas, principalmente para controle biológico de pragas, como bactérias, fungos e insetos (DOUMBOU, 2001). O gênero *Streptomyces* concentra as actinobactérias mais representativas nos estudos de controle biológico pela produção de metabólicos secundários, correspondendo a 60% dos inseticidas dos últimos anos (EL-KHAWAGA & MEGAHED, 2012) além de produzir uma série de inibidores de sintetizadores de quitina, como polioxinas, que são efetivas como agentes antifúngicos e podem ter ação inseticida. Uma das bactérias de maior reconhecimento no controle de pragas estão *Bacillus thuringiensis*, *Saccharopolyspora spinosa* (de onde é extraído o composto spinosad) e os gêneros *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum* e *Sporosarcina* (DIAS, 2002). Estes microrganismos são comumente de origem terrestre ou extraídos diretamente do cadáver de insetos infectados, entretanto, organismos de ambientes extremos podem ser proeminentes no controle de pragas por apresentarem condições fisiológicas distintas (DUNCAN *et al.*, 2014; (Li *et al.*, 2014; XIONG *et al.*, 2004).

Microrganismos marinhos diferem em características fisiológica com os de solo devido ao seu local de crescimento (KIJOA & SAWANGWONG, 2004; RAMESH & MATHIVANAN,

2009) e possuem elevado potencial para desenvolvimento de novos produtos de interesse biotecnológico (DUNCAN *et al.*, 2014; (Li *et al.*, 2014; XIONG *et al.*, 2004). O ambiente marinho comporta 70% da superfície terrestre (FELING *et al.*, 2003; JENSEN *et al.*, 2007; HUGLES *et al.*, 2008). (DIONISI *et al.*, 2012), seu estudo ainda não é aprofundado se comparado com ambientes terrestres. A região costeira é caracterizada por altas salinidade, umidade, radiação UV, temperatura, ação mecânica das marés e escassez de nutrientes (ORTEGA-MORALES *et al.* 2010, PORSANI *et al.*, 2013). Estas condições podem promover a produção de enzimas e toxinas que possibilitam a sobrevivência destes microrganismos nesse ambiente hostil (ORTEGA-MORALES *et al.*, 2010), que podem ser explorados para diversos usos, inclusive controle biológico (Li *et al.*, 2014; XIONG *et al.*, 2004).

Neste contexto, o presente trabalho visou identificar actinobactérias e fungos, isolados de sedimento marinho da região entre-marés da Ilha-do-Mel (Paraná) com potencial para controle biológico do pulgão-da-couve *Brevicoryne brassicae*, selecionar o mais promissor dentre as duas categorias, estipular sua dose média letal (CL₅₀) e analisar a relação de uma dose subletal com os parâmetros de crescimento populacional do afídeo. O fungo mais promissor ainda foi comparado com os bioinseticidas comerciais Bovemax[®] e Methamax[®]. A exposição à actinobactéria foi analisada a fim de relacionar à inibição do comportamento alimentar de *B. brassicae*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DA COUVE

A couve-manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) pertence à família Brassicaceae, uma das principais do ponto de vista econômico, contando com espécies de destaque, como a canola (*Brassica napus* var. *canola*), o rabanete (*Raphanus sativus*) e a rúcula (*Eruca vesicaria*) (SOUZA & LORENZI, 2008). Conforme Judd *et al.* (2009), a família também pode ser chamada de Cruciferae, referência ao arranjo das pétalas em forma de cruz, e é a maior dentre as 15 famílias que compõem a ordem Brassicales. A família também é caracterizada por todos seus integrantes produzirem glucosinolatos, compostos sulfurosos que em contato com células únicas à família, as células de mirosina, liberam óleos de mostarda quentes e picantes (JUDD *et al.*, 2009). Ao que dispõe Balkaya e Yanmaz (2005), a couve-manteiga é uma das mais antigas variedades dentre as brássicas, tendo sua origem no leste do Mediterrâneo, com histórico de cultivo datando de 2000 A.C., sendo levada para várias regiões do mundo para cultivo de alimentos.

A couve até hoje representa uma grande parcela da produção de hortaliças em território nacional (SANTOS *et al.* 2011), 93.551 toneladas somente em 2006 (SEBRAE, 2006), além das plantadas em países frios para alimentar herbívoros no inverno (LOWE, 1968).

2.2 *Brevicoryne brassicae*

O cultivo de brássicas é comumente atacado por pragas que destroem campos e reduzem seu valor de mercado, havendo foco especialmente no pulgão-da-couve, *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera, Aphididae). Segundo Razaq *et al.* (2011), este pulgão chega a causar perda de até 80% dos cultivos de brássicas.

Brevicoryne brassicae, segundo Kumar e Chapman (1984), é uma espécie cosmopolita presente em grande número em couves, vetor de vírus e responsável por esmaecimento das plantas. Seus danos diretos são dados pela sucção do floema, causando deficiência nutricional, injeção de toxinas e má formação das folhas (PONTOPPIDAN *et al.*, 2003; GRIFFIN & WILLIAMSON,

2012; OPFER & MCGRATH, 2013). Danos indiretos ocorrem pela redução da fotossíntese devido ao recobrimento de *honeydew*, substância com alta concentração de açúcares excretada pelos pulgões, e transmissão de mais de 10 vírus, como o Vírus do anel negro da couve e Mosaico da couve flor, rabanete e nabo (FERERES & MORENO, 2009, ELLIS *et al.*, 1998, BARTON & IVES, 2014).

Além disso, o pulgão possui alta capacidade reprodutiva, de dispersão e grande densidade populacional, e normalmente seu controle é feito através de agentes químicos (BACCI *et al.* 2009). Cividanes (2002) afirma que este pulgão é amplamente distribuído em regiões temperadas e subtropicais, sendo 101 espécies de plantas hospedeiras comprovadas, e há uma crescente presença desta praga em território nacional, devido à proliferação do cultivo de brássicas.

2.3 MÉTODOS DE CONTROLE QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

O controle de pragas como o pulgão é feito basicamente pelo uso de inseticidas químicos, cerca de 95% dos produtos utilizados (MAPA, 2015). No Brasil estão disponíveis cerca de quinze produtos comerciais com base em dez ingredientes ativos (Acefato, Clorpirifós, Deltametrina, Imidacloprido, Malationa, Metomil, Mevinfós, Pirimicarbe, Protiofós e Tiacloprido), a maioria com ação neurotóxica, pela superestimulação das terminações nervosas ou inibição de sinapses (MELO, 2012). Mas alta capacidade reprodutiva destes insetos aliada à aplicação intensa de pesticidas favorece o aparecimento de indivíduos resistentes a estes agentes (ARAUJO JR, MARQUES & OLIVEIRA, 2009) colocando a couve entre os oito produtos agrícolas com maior residual de pesticida (ANVISA, 2011).

O uso de pesticidas tem favorecido a fixação de populações com genes de resistência, como o ace1 (PAVELA, 2013; ANDREWS *et al.*, 2004). Akbar e Akbar (2012) mencionam que o acúmulo de pesticidas no solo normalmente atinge o lençol freático, se espalhando em locais ao redor da área de aplicação, contaminando outras plantas, animais e humanos. A contaminação por pesticidas é associada com inúmeras consequências, como danos ao sistema nervoso e aumento na chance de surgimento de cânceres (MARONI & FAIT, 1993). Uma forma de minimizar os impactos decorrentes do uso de inseticidas químicos é o emprego do controle biológico.

O controle biológico de pragas é feito pelo uso de predadores, parasitoides e microrganismos, destacando-se fungos, bactérias e vírus (DOUMBOU, 2001). Seu uso no controle de populações de organismos indesejados teve início em 1960, seguido de 20 anos de aumento exponencial nas pesquisas sobre o assunto, um mercado correspondente a 15 milhões de dólares somente nos Estados Unidos no ano de 2000 (PAULITZ & BÉLANGER, 2001). Um programa de controle de *Echium plantagineum* na Austrália, compreendido entre 1972 e 2004 teve um benefício de 52 milhões de dólares em relação ao custo de implantação, sendo um exemplo de sucesso do controle biológico sobre controle químico quanto aos valores envolvidos (MCFADYEN, 2008).

O controle de *B. brassica* pode ser feito com espécimes da ordem Coleoptera e da família Coccinellidae, *Coleomegilla maculata*, *Hippodamia convergens*, *Cycloneda sanguinea* e Dipteros da família Syrphidae (VÖLKL *et al.*, 2007, LIU & SPARKS JR., 2011) além de Hymenopteros parasitoides como *Diaeretiella rapae* e *Lysiphlebus testaceipes* (ZHANG & HASSAN 2003, STARÝ, SAMPAIO & BUENO, 2007).

Melo (2012) menciona fungos entomopatogênicos como os maiores responsáveis pelo controle direto de insetos no campo e que a presença de entomopatógenos se destaca em condições naturais, sendo responsáveis por quase a totalidade das doenças que acometem insetos herbívoros (ARAUJO JR, MARQUES & OLIVEIRA, 2009). Doumbou (2001) relata que actinobactérias são as bactérias com maior potencial de controle, com muitas espécies produtoras de metabólitos secundários com atividades antibióticas e inseticidas (DOUMBOU, 2001).

2.4 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Fungos entomopatogênicos, principalmente dos Filos Ascomycota e Zigomycota são os maiores responsáveis pelo controle de infestações de insetos, com notada eficiência contra afídeos (MELO, 2012). Ferron (1978) menciona sobre o uso destes organismos para o controle de pragas a vários anos, descrevendo conhecidas formas de infecção e ação em insetos, como contato direto. Scorsetti *et al.* (2007) mencionam o crescente estudo a respeito do uso de fungos no controle de afídeos, focando no método de infecção dos pulgões por estes microrganismos, que se dá pela cutícula do animal, processo mais eficiente do que o realizado por outros patógenos, uma vez que

os pulgões possuem aparelho bucal especializado em sucção e não ingerem pedaços da superfície da planta, onde estariam localizados outros agentes.

Estipula-se que fungos são responsáveis por 80% das enfermidades de artrópodes (ALVES, 1998) e possuem ampla seletividade a outros inimigos naturais (CARDOSO *et al.* 2007). Podem ser utilizados em programas de controle específicos, ou associados a programas de manejo integrado de pragas (GOETTEL *et al.* 2010).

Os fungos comumente utilizados em bioinseticidas são *Beuveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* vendidos no Brasil diversos produtos, como Bovemax[®], Ballvéria[®], Boveril[®], Metiê[®] e Methamax[®] e além destes, *Lecanicillium spp.*, *Isaria fumosorosea* e *Beuveria brongniartii* também abrangem parte do mercado nacional (FILHO *et al.* 2009), sendo normalmente aplicados *in vivo*, em suspensões de esporos e dependem de condições ambientais ótimas para melhor desempenho dos produtos.

Diversos fatores estão ligados à capacidade do fungo em infectar um hospedeiro. Fatores ambientais são extremamente importantes, principalmente quanto à umidade, que deve ser alta para a germinação do fungo (GOETTEL *et al.*, 2010). A temperatura, no entanto é o fator limitante para fungos entomopatogênicos. Os Hyphomycetes, possuem faixa ótima de temperatura entre 20 e 30°C, enquanto Entomophthorales ficam entre 15 e 25°C, e ainda há de se considerar, que raios ultravioletas limitam a persistência e infectividade de muitos fungos (ALVES, 1998; GOETTEL *et al.*, 2010).

O modo de infecção dos fungos entomopatogênicos apresenta varias fases, primeiro havendo a deposição dos esporos sobre o inseto, seguida da adesão à cutícula, preparando para a fase de germinação (ALVES, 1998; SAHID *et al.*, 2012). Havendo a proliferação do micélio sobre o inseto, ocorre então a penetração, onde as hifas entram no animal por orifícios naturais, ferimentos ou atravessando o exoesqueleto por degradação enzimática (ALVES, 1998; SAHID *et al.*, 2012). Segue a colonização do interior do inseto, que normalmente morre pela ação de toxinas liberadas pelo fungo (ALVES, 1998). Por fim, há liberação de hifas pelos demais orifícios do inseto e regiões frágeis da cutícula, havendo proliferação do micélio por todo corpo do animal (ALVES, 1998; SAHID *et al.*, 2012). Neste ponto, em condições favoráveis de temperatura e umidade, há a liberação de esporos, que se dispersão no ambiente, reiniciando o ciclo de infecção em outros indivíduos (ALVES, 1998; SAHID *et al.*, 2012).

Dentre os gêneros de fungos, alguns são conhecidos pela produção de micotoxinas, comumente neurotóxicas (MELO, 2012), como *Penicillium*, sendo um dos gêneros mais comuns no solo e que normalmente não apresenta nocividade evidente aos humanos (LAMSAL *et al.*, 2013). Fungos marinhos apresentam diferenciações fisiológicas que podem promover a produção de enzimas e toxinas para possibilitar sua sobrevivência nesse ambiente hostil, e estas substâncias podem apresentar grande potencial quando empregadas no controle de pragas (ORTEGA-MORALES *et al.*, 2010).

Os fungos utilizados neste trabalho foram *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus sydowii*, *Penicillium dipodomyicola*, e *Trichoderma harzianum*. *A. versicolor* é reportado por causar doenças em humanos (GALIMBERTI *et al.*, 1998; HODGSON *et al.*, 1998, EFSA, 2013) e produzir metabolitos com potencial para aplicação em processos industriais e propriedades inseticidas (COLE & ROLINSON, 1972). *A. sydowii* está associado a doenças humanas (GEHLOT *et al.*, 2010) e seus metabolitos podem ser empregados como biocatalizadores e na degradação de pesticidas (HASAN, 1999; ORTEGA *et al.*, 2010) e possui efeito letal sobre insetos, indicando suas propriedades entomopatogênicas (PEREIRA *et al.*, 2009; WEISS *et al.*, 2014).

P. dipomyicola produz uma variada diversidade de metabolitos (FRISVAD *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2014), sendo importante pela produção de patulina, uma micotoxina, encontrada em suco de maçã devido ao uso de frutas contaminadas, que é carcinogênica, mutagênica e teratogênica (BECCI, 1981; SCHUMACHER *et al.*, 2005; CIEGLER, 1976). *T. harzianum* é considerado o mais eficaz agente de biocontrole entre os *Trichoderma* (KEXIANG *et al.*, 2002), possuindo ação nematicida (SHARON *et al.*, 2001; POURJAM *et al.*, 2015) e inseticida (JASSIM *et al.*, 1990; SHAKERI & FOSTER, 2007; FERNANDES *et al.*, 2010, ABDUL-WAHID & ELBANNA, 2012).

2.5 BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS

Actinobactérias são um grande grupo de bactérias gram-positivas, com alto teor de guanina e citosina em seu genoma, basicamente encontradas no solo, que crescem em uma rede de filamentos ramificados, chamado micélio, muito similar ao formado por fungos (MADIGAN,

MARTINKO & PARKER, 2004). Segundo Raju *et al.* (2010), actinobactérias são encontradas em uma vasta variedade morfológicas, como cocóide (*Micrococcus*) ou cocobacilo (por exemplo, *Arthrobacter*), há fragmentação de hifas, como em *Nocardia* spp., e ainda podem possuir micélio ramificado (por exemplo, *Streptomyces* spp.). Estes microrganismos também apresentam propriedades fisiológicas e metabólicas características, como a produção de enzimas extracelulares e a formação de uma ampla variedade de metabólitos secundários.

Doumbou *et al.* (2001) mencionam que diversas cepas de actinobactérias já foram reconhecidos por sua atividade contra patógenos e herbívoros e, portanto, apresentam potencial para controle biológico, sendo o principal gênero estudado *Streptomyces* sp., responsável pela síntese de 60% dos inseticidas produzidos por estes organismos (EL-KHAWAGA & MEGAHED, 2012). Um exemplo é inseticida Spinosad derivado de extratos de *Saccharopolyspora spinosa* que é altamente reativo por contato e ingestão, ligando-se e aos receptores nicotínicos do sistema nervoso de insetos e superestimulando-os. Dentre as actinobactérias, os gêneros *Streptomyces* e *Streptoverticillum* apresentam o maior potencial de controle sobre insetos (BREM *et al.*, 2001) e vem sendo amplamente exploradas, principalmente para controle biológico de pragas, como bactérias, fungos e insetos (DOUMBOU, 2001). Outras bactérias com reconhecimento no controle de pragas estão *Bacillus thuringiensis* e os gêneros *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum* e *Sporosarcina* (DIAS, 2002).

Células bacterianas são ingeridas pelos insetos, por mastigação de folhas ou sucção de seiva onde estão os microrganismos, e uma vez que atinjam seu trato digestivo, encontram condições adversas ao seu crescimento, passando a liberar metabólitos adaptativos ou de estresse fisiológico (BRAVO, GILL & SOBERÓN, 2007). Muitas vezes estas substâncias possuem toxicidade elevada sobre insetos, como é o caso do *B. thuringiensis*, que produz proteínas inseticidas na forma de cristais paraesporais (BRAVO, GILL & SOBERÓN, 2007).

As actinobactérias em foco são *Streptomyces variabilis*, *Streptomyces seoulensis*, *Streptomyces cavourensis*, *Streptomyces parvus* e *Streptomyces bacillaris*, identificadas por Porsani *et al.* (2013) e avaliadas como potenciais agentes de controle biológico por apresentarem inibição no crescimento de bactérias patogênicas. *S. variabilis* apresenta síntese de metabólitos de ação farmacológica, principalmente antitumorais (LI *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2012). *S. seoulensis*, conforme Qing-fei *et al.* (2009), apresentou ação tóxica sobre o nematoide *Meloidogyne arenaria*, um patógeno de amendoim (*Arachis hypogaea*), além de ser reconhecido pela produção de

superóxido dismutases, que regulam a proporção de superóxidos nas células (CHOUDHURY *et al.*, 1999).

Sua *et al.* (2013) menciona que *S. cavourensis* apresenta síntese de dois compostos com potencial antitumoral e toxicidade genérica contra células cancerígenas, já So Youn *et al.* (2012) trata sobre o controle de antracnose com metabólitos desta mesma espécie de actinobactéria, dentre eles quitinases, enzimas degradadoras de quitina que podem ser usadas como fungicidas e inseticidas. Praveen, Srivastava e Tripathi (2011) relatam a extração de uma enzima colesterol oxidase de *S. bacillaris*, que pode apresentar efeito inseticida pela degradação do colesterol, ou pela diminuição no armazenamento de tecido adiposo no inseto. *S. bacillaris* é reconhecido na literatura pela síntese de ácido gama-aminobutírico (GABA), um composto inibidor do sistema nervoso central em mamíferos, utilizado na produção de medicamentos contra ansiedade, relaxantes e contra convulsões (HUDEC *et al.*, 2014).

2.5 MICRORGANISMOS MARINHOS

A bioprospecção de fungos e bactérias de sedimento marinho apresenta uma possibilidade de contornar os problemas ambientais enfrentados na área agrícola, como alta salinidade, temperatura, radiação UV, baixos níveis de nutrientes e competição com outros microrganismos (Porsani *et al.*, 2013).

A maioria das actinobactérias utilizadas no controle de pragas é isolada do solo ou plantas (QIN *et al.*, 2011) e os fungos de cadáveres de insetos ou do solo (ALVES, 1998). No entanto, Liu *et al.* (2008), descrevem um isolado de *Streptomyces* extraído de sedimento marinho que apresentou atividade inseticida contra *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Esta região, por apresentar características extremas, como ciclo de marés, temperatura, radiação UV (KAKANI *et al.*, 2003), salinidade (CABOTA *et al.*, 2014) e deposição de nutrientes levou ao desenvolvimento de microrganismos com fisiologia particular, principalmente quanto aos metabólitos secundários produzidos (PORSANI *et al.*, 2013). A adaptação a estas condições não somente dispõe estes microrganismos à produção de metabólitos únicos, como possibilita tolerar o ambiente de área agrícola, oferecendo uma vantagem sobre outros agentes de controle biológico. (PORSANI *et al.*, 2013; ZAIN *et al.*, 2014)

REFERÊNCIAS

ABDUL-WAHID, O. A.; ELBANNA, S. M. Evaluation of the insecticidal activity of *Fusarium solani* and *Trichoderma harzianum* against cockroaches; *Periplaneta americana*. **African Journal of Microbiology Research**. v. 6, n. 5, p. 1024-1032, 2012.

AHAMAD, M.; AKHATAR, S. Development of insecticide resistance in field populations of *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae) in Pakistan. **Journal Economic Entomology**. v. 106, n. 2, p. 954 -958, 2013.

AHAMAD, M.; ASLAM, M. Resistance of Cabbage Aphid, *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus) to Endosulfan, Organophosphates and Synthetic Pyrethroids. **Pakistan Journal of Zoology**. v. 37, n. 4, p. 293 – 295, 2005.

AKBAR, T. A.; AKBAR, R. A. Pesticide Health Risk Mapping and Sensitivity Analysis of Parameters in Groundwater Vulnerability Assessment. **Clean – Soil, Air, Water**. v.41, n.11, p. 1073-1079, 2013

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano**, 2º edição, FEALQ, 1663p. 1998.

ANDREWS, M. C.; CALLAGHAN, A.; FIELD, L. M.; WILLIAMSON; M. S.; MOORES, G. D. Identification of mutations conferring insecticideinsensitive AChE in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* Glover. **Insect Molecular Biology**. v. 13, n. 5, 555–561, 2004.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos**, 2011. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>

Consultado em: 05/02/2015

ARAUJO JR, J. M.; MARQUES, E. J.; OLIVEIRA, J. V.; Potencial de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* e do Óleo de Nim no controle do pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**. v. 34, p. 520-525, 2009

ASI, M. R.; BASHIR, M. H.; MIRZA, J. H.; AFZAL, M.; IMRAN, S. In vitro efficacy of entomopathogenic fungi against cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* L. **Pakistan Entomology**. v. 31, n. 1, p. 43-47, 2009.

AZUMA, M. V. P. **Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da região entremarés da Ilha-do-Mel, PR, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

BACCI, L.; PICANÇO, M. C.; GUSMÃO, M. R.; CRESPO, A. L. B.; PEREIRA, E. J. G. Seletividade de Inseticidas a *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae) e ao Predador *Doru luteipes* (Scudder) (Dermaptera: Forficulidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, n.4, p. 707-713, 2001.

BACCI, L.; PICANÇO, M. C.; ROSADO, J. F.; SILVA, G. A.; CRESPO, A. L. B.; PEREIRA, E. J. G.; MARTINS, J. C. Conservation of natural enemies in brassica crops: comparative selectivity of insecticides in the management of *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 44, p. 103-113, 2009.

BACKER, R. Diversity in biological control. **Plant Pathology and Weed Science**. v. 10, p. 85-94, 1991.

BALKAYA, A.; YANMAZ, R. Promising kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) populations from Black Sea region, Turkey. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**. v. 33, p. 1-7, 2005.

BARTON, B. T.; IVES, A. T. Direct and indirect effects of warming on aphids, their predators, and ant mutualists. **Ecology**. v. 95, n.6, p. 1479–1484, 2014.

BECCI, P.J. et al. Long-term carcinogenicity and toxicity studies of patulin in the rat. **Journal of Applied Toxicology**. v.1, p.256-263, 1981.

BONFIELD, J; BEAL, K; JORDAN, M; CHEN, Y; STADEN, R. **The Staden Package Manual**, Cambridge, UK, 2006.

BRAVOA, A.; GILLB, S. S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**. v. 49, p. 423–435, 2007.

CABOTA, C.; SIBOLETA, J. V.; BARCELÓB, J.; POSCHENRIEDER, C. Lessons from crop plants struggling with salinity. **Plant Science**. n. 226, p. 2-13, 2014.

CARDOSO, E. R.; FREITAS, S. de; NUNES, H. T.; PESSOA, L. G. A. Seletividade de *Lecanicillium lecanii* e *Metarhizium anisopliae* para larvas de primeiro ínstar de *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera: Chrysopidae) em laboratório. **Acta Scientiarum (UEM)**. v. 29, p. 563-568, 2007.

CHOUDHURY, S. B.; LEE, J.; DAVIDSON, G.; YIM, Y.; BOSE, K.; SHARMA, M. L.; KANG, S.; CABELLO, D, E.; MARONEY, M. L. Examination of the Nickel Site Structure and Reaction Mechanism in *Streptomyces seoulensis* Superoxide Dismutase. **Biochemistry**. v.38, p. 3744-3752, 1999.

CIEGLER, A. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. Applied and Environmental. **Microbiology**. v.31, n.5, p.664-667, 1976.

COLE, M.; ROLINSON, G. N.; Microbial metabolites with insecticidal properties. **Applied Microbiology**. v. 24, n. 4, p. 660-662, 1972

DHALIWAL, G. S.; JINDAL, V.; DHAWAN, A.K. Insect Pest Problems and Crop Losses: Changing Trends. **Indian Journal of Ecology**. v. 37, n.1, p.1-7, 2010.

DIAS, J. M. C. S.; Producao e utilizacao de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**.v.27, p. 59-76, 1992.

DIONISI, H. M.; LOZADA, M.; OLIVEIRA, N. L. Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 44, p. 49-60, 2012.

DOUMBOU, C. L.; SALOVE, M. K. H.; CRAWFORD, D. L.; BEAULIEU, C. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. **Phytoprotection**. v. 82, n. 3, p. 85-102, 2001.

DUNCAN, K.; HALTLI, B.; GILL, K. A.; KERR, R. G. Bioprospecting from Marine Sediments of New Brunswick, Canada: Exploring the Relationship between Total Bacterial Diversity and Actinobacteria Diversity. **Marine Drugs**. v. 12, p. 899-925, 2014.

EL-KHAWAGA, M. A.; MEGAHED, M. M. M. **Egyptian journal of biological sciences**. v.4, n.1, p. 53-67, 2012.

ELLIS, M. B. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. CAB International Mycological Institute, Kew, UK. 507pp, 1976.

EFSA – European Food Safety Authority. **Annual Report 2013**. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/corporate/doc/ar13.pdf>. Consultado em: 05/02/2015.

FARIA, M.R. de; WRIGHT, S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**. v. 43, p. 237-256, 2007.

FELING, R. H.; BUCHAN, G. O.; MINCER, T. J.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. **Angewandte Chemie International Edition**. v. 42, p. 355–357, 2003.

FERERES, A.; MORENO, A. Behavioural aspects influencing plant vírus transmission by homopteran insects. **Virus Research**. v. 141, p. 158 -168, 2009.

FERNANDES, E. G.; DURÃES, L. D. S.; BORGES, M. A. Z.; VALÉRIO, H. M. Isolamento e seleção de fungos para controle de larvas de terceiro instar de *Musca domestica*. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**. v. 77, n. 2, p. 317 – 322, 2010.

FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Annual Review of Entomology**. v.23, p. 409-42, 1978.

FILHO, M. M.; FARIA, M.; Wraight, S. P.; SILVA, K. F. A. S. MicoInseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas?. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 76, n. 4, p. 769-779, 2009.

FRISVAD, J. C.; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T. O.; SAMSON, R. A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Studies in Mycology**. v. 49, p. 201-241, 2004.

GALIMBERTI, R., A. KOWALCZUK, I. H. PARRA, M. G. RAMOS, AND V. FLORES. Cutaneous *Aspergillosis*: a report of six cases. **British Journal of Dermatology**. v. 139, p. 522-526, 1998.

GEHLOT, P.; PUROHIT, D. K.; SINGH, S. K. Molecular diagnostics of human pathogenic *Aspergillus* species. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 10, p. 207 - 211, 2011.

GOETTEL, M. S.; EILENBERG, J. GLARE, T. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations, p. 387-431. In: GILBERT, L. I.; GILL, S. S. **Insect Control: Biological and Synthetic Agents**. Elsevier B. V., Londres, 2010.

GRIFFIN, R. P.; WILLIAMSON, J. **Cabbage, Broccoli & Other Cole Crop Insect Pests**. HGIC 2203, Home & Garden Information Center. Clemson Cooperative Extension. Clemson University, Clemson, SC, 2012.

HASAN, H. A. H. Fungal utilization of organophosphate pesticides and their degradation by *Aspergillus flavus* and *A. sydowii* in soil. **Folia Microbiologica**. v. 44, p. 77 – 84, 1999.

HODGSON, M. J.; MOREY, P.; LEUNG, W. Y.; MORROW, L.; MILLER, D.; JARVIS, B. B.; ROBBINS, H.; HALSEY, J. F.; STOREY, E. Building-associated pulmonary disease from exposure to *Stachybotrys chartarum* and *Aspergillus versicolor*. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**. v.40, p. 241-249, 1998.

HUDEC, J.; KOBIDA, L.; CANIGOVÁ, M.; LACKO-BARTOSIVÁ, M.; LOZEK, O.; CHLEBO, P.; MRÁZOVÁ, J.; DUCSAYA, L.; BYSTRICKÁE, J. Production of γ -aminobutyric acid by microorganisms from different food sources. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 2014.

HUGHES, C. C.; PRIETO-DAVO, A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. The marinopyrroles, antibiotics of an unprecedented structure class from a marine *Streptomyces* sp. **Organic Letters**. v. 10, p. 629–631, 2008.

HUGHES, R. D. Population Dynamics of the Cabbage Aphid, *Brevicoryne brassicae* (L.). **Journal of Animal Ecology**. v. 32, n. 3, p. 393-424, 1963.

JASSIM, H.; FOSTER, H. A.; FAIRHURST, C. P. Biological control fo Dutch elm disease: Larvicidal activity of *Trichoderma harzianum*, *T. polysporum* and *Scylalidium lignicola* in *Scolytus scolytus* and *S. multistriatus* reared in artificial culture. **Annals of Applied Biology**. v. 117, p. 187-196, 1990.

JENSEN, P.R.; WILLIAMS, P.G.; DONG-CHAN, O.; ZEIGLER, L.; FENICAL, W. Species-Specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, p. 1146–1152, 2007.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J.; **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

KEXIANG, G.; XIAOGUANG, L.; YONGHONG, L.; TIANBO, Z.; SHULIANG, W. Potential of *Trichoderma harzianum* and *T. atroviridae* to control *Botryosphaeria herengeriana* f. sp. *piricola*, the cause o apple ring rot. **Journal of Phytopathology**. v. 150, p. 271-276, 2002

KAKANI, V.G.; REDDY, K.R.; ZHAO, D.; SAILAJA, K. Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. **Agricultural and Forest Meteorology**. n. 120, p. 191-218, 2003.

KIJJOA, A.; SAWANGWONG, P. Drugs and cosmetics from the sea. **Marine Drugs**. v. 2, n. 6, p. 73-82, 2004.

KUBO, I. Insect control agents from tropical plants. **Recent advances in phytochemistry: phytochemical potential of tropical plants**. New York, v. 27, p. 133-151, 1993.

KUMAR, K; CHAPMAN, R. B. Toxicity of insecticides to cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* L. **New Zeland Journal of Experimental Agriculture**. v. 12, p. 55-58, 1984.

LAMSAL, K,; KIM, S. W.; NAEMIMI, S.; ADHIKARI, M.; YADAJ, D. R.; KIM, C.; LEE, G. B.; LEE, Y. S. Three New Records of *Penicillium* Species Isolated from Insect Specimens in Korea. **Mycobiology**. v.41, n. 2, p. 116-119, 2013.

LI, P.; YAN, P. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* and cancer cells by marine actinomycete strains. **Journal of Ocean University of China**. v. 13, n. 6, p. 985-994, 2014.

LI, H.; JIANG, J.; LIU, Z.; LIN, S.; XIA, G.; XIA, X.; DING, B.; HE, L.; LU, Y.; SHE, Z. Peniphenones A–D from them mangrove fungus *Penicillium dipodomyicola* HN4-3A as inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* phosphatase MptpB. **Journal of Natural Products**. v. 77, p.800-806, 2014.

LIU, T. X.; SPARKS JR, A. N. **Aphids on Cruciferous Crops Identification and Management**. 2011.

LIU, H; QIN, S; WANG, Y; LI, W; ZHANG, J. Insecticidal action of quinomycin A from *Streptomyces* sp. KN-0647, isolated from a forest soil. **World Journal of Microbiological Biotechnology**. v.24, p 2243-2248, 2008.

LOVATTO, P. B.; GOETZE, M.; THOMÉ, G. C. H. Efeito de extratos de plantas silvestres da família Solanaceae sobre o controle de *Brevicoryne brassicae* em couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*). **Ciência Rural**. v. 34, n. 4, p. 971-978, 2004.

LOWE, A. D. Control of the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae* L.) with some systemic materials. **New Zealand Journal of Agricultural Research**. v.3, n.5, p. 842-844, 1960.

_____. The incidence of parasitism and disease in some populations of the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae* L.) in New Zealand, **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 4, p. 821-828, 1968.

LU, Y.; DONG, X.; LIU, S.; BIE, X. Characterization and Identification of a Novel Marine *Streptomyces* sp. Produced Antibacterial Substance. **Marine Biotechnology**. v. 11, n. 6, p. 717-724, 2009.

MA, J.; TONG, S. M.; WANG, P.; LIAO, H.; ZHANG, L. Insecticides activity of Camptothecin against *Nilaparvata lugens*, *Brevicoryne brassicae* and *Chilo suppressalis*. **Journal Economic Entomology**. v. 103, n. 3, p. 492 – 496, 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10.ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Produtos registrados no Brasil para Controle de *Brevicoryne brassicae* em olerícolas**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>. Consultado em: 05/02/2015.

MARONI, M.; FAIT, A. Health effects in man from long-term exposure to pesticides. A review of the 1975-1991 literature. **Toxicology**. v. 78, n. 1, p. 1-5, 1993.

MCFADYEN, R. **Return on investment: determining the economic impact of biological control programmes**. XII International Symposium on Biological Control of Weeds. 1 ed. CSIRO European Laboratory, França, p. 67 – 74, 2008.

MELO, R. L. **Alternativas de controle de afídeos no cultivo da couve (*Brassica oleracea*) com ênfase a *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae)**. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

NOVO, M. C. S. S.; PRELA-PANTANO, A.; TRANI, P. E.; BLAT, S. F. Desenvolvimento e genótipo de couve manteiga. **Horticultura Brasileira**. v. 28, p. 321-325, 2010

OPFER, P.; MCGRATH, D. **Oregon vegetables, cabbage aphid and green peach aphid**. Department of Horticulture. Oregon State University, Corvallis, OR., 2013.

ORTEGA, S. N.; NITSHKE, M.; MOUAD, A. M.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Isolation of brasilian marine fungi capable of growing on DDD pesticide. **Biodegradation**. v. 22, n. 43 – 50, 2011

ORTEGA-MORALES, B. O.; CHAN-BACAB, M., J.; ROSA-GARCIA, S. C.; CAMACHO-CHAB, J. C. Valuable processes and products from marine intertidal microbial communities. **Current Opinion in Biotechnology**. v.21: 346–352, 2010.

PAN, J.; BHARDWAJ, M.; NAGABHYRU, P.; GROSSMAN, R. B.; SCHARDI, C. L. Enzymes from fungal and plant origin rrequired for Chemical diversification of insecticidal loline alkaloids in grass-epichloë symbiota. **PLoS ONE**. v. 9, n. 12, p. 1-19, 2014

PAULITZ, T. C.; BÉLANGER, R. R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review of Phytopathology**. v. 39, p. 103-133, 2001.

PEREIRA, E. S.; SARQUIS, M. I. M.; FERREIRA-KEPPLER, R. L.; HAMADA, N.; ALENCAR, Y. B. Filamentous fungi associated with mosquito larvae (díptera: Culicidae) in municipalities of the brazilian amazona. **Neotropical Entomology**. v. 38, n. 3, p. 352-359, 2009

PAVELA, R. Insecticidal Activity of Essential Oils Against Cabbage Aphid *Brevicoryne brassicae*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**. v. 9, n. 2, p. 99-106, 2013.

PIMENTEL, D. Diversification of biological control strategies in agriculture. **Crop Protection**. v. 10, 243-253, 1991.

PONTOPPIDAN, B., HOPKINS, R., RASK, L., MEIJER, J. Infestation by cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) on oilseed rape (*Brassica napus*) causes a long lasting induction of the myrosinase system. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v. 109, n. 1, p. 55-62, 2003.

PORSANI, M. V.; AMATUZZI, R. F.; OLIVEIRA, P. R.; BARATTO, L. C.; DALITZ, C. A.; BOZZA, A.; MARANGONI, P. R.; DALZOTO, P. R.; KOLM, H. E.; PIMENTEL, I. C. Antimicrobial potential off ungi and actinobactéria isolated from Sandy sediments of intertial regions. **International Journal of Pharmaceutial Chemical and Biological Sciences**. v. 3, n. 3, p. 899-913, 2013.

POURJAM, E.; KAMALI, N.; SAHEBANI, N. Elicitation of defense responses in tomato against *Meloidogyne javanica* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* with complex. **Journal of Crop Protection**. v. 4, n. 1, p. 29-38, 2015.

PRAVEEN, V.; SRIVASTAVA, A.; TRIPATHI, C. K. M. Purification and Characterization of the Enzyme Cholesterol Oxidase from a New Isolate of *Streptomyces* sp. **Applied Biochemical Biotechnology**. v.165, p.1414–1426, 2011.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.; XU, L. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 89, p 457-573, 2011.

RAJU, A; PIGGOTT, A.M.; CONTE, M; TNIMOV, Z. ALEXANDROV, K. CAPON, R. J. Nocardiopsins: New FKBP12-Binding Macrolide Polyketides from an Australian Marine-Derived Actinomycete, *Nocardiopsis* sp. **Chemistry - A European Journal**. v. 16, n. 10, p. 3194-3200, 2010.

RAMESH, S.; MATHIVANAN, N. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 25, n. 12, p. 2103-2111, 2009

RAZAQ, M; MEHMOOD, A; ASLAM1, M; ISMAIL, M; AFZAL, M; ALI SHAD, S. Losses In Yield And Yield Components Caused By Aphids To Late Sown Brassica *Napus* L., *Brassica Juncea* L. And *Brassica carrinata* A. Braun At Multan, Punjab (Pakistan). **Pakistan Journal of Botany**. v. 43, n. 1, p. 319-324, 2011.

SANTOS RESENDE, A.; LIXA, A.; SANTOS, C.; SOUZA, S.; GUERRA, J.; AGUIAR-MENEZES, E. Comunidade de Joaninhas (Coleoptera: Coccinellidae) em Consórcio de Couve (*Brassica oleraceae* var. *acephala*) com Coentro (*Coriandrum sativum*) sob Manejo Orgânico. **Revista brasileira de agroecologia**. v.6, n.1, p. 81-89, 2011.

SCHLICK-SOUZA, E. C.; BALDIN, E. L. L.; LOURENÇÃO, A. L. Variation in the host preferences and responses of *Ascia monuste orseis* Godart (Lepidoptera: Pieridae) to cultivars of collard greens *Brassica oleracea* (L.) var. *acephala*. **Journal of Pest Science**. v. 84, n.4, p. 429-436, 2011.

SCHUMACHER, D. M.; METZLER, M.; LEHMANN, L. Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione. **Archives of Toxicology**. v.79, n.2, p.110-121, 2005.

SCORSETTI, A. C.; HUMBER, R. A.; GARCIA, J. J.; LÓPEZ LASTRA, C. C. Natural occurrence of entomopathogenic fungi (Zygomycetes: Entomophthorales) of aphid (Hemiptera: Aphididae) pests of horticultural crops in Argentina. **BioControl**. v. 52, p. 641-655, 2007.

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Censo agropecuário. Brasil, grandes regiões e unidades da federação**. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 777p, 2006.

SHAHID, A. A.; RAO, A. Q.; BAKHSH, A.; HUSNAIN, T. Entomopathogenic fungi as biological controllers new insights into their virulence and pathogenicity. **Archives of Biological Science Belgrade**. v. 64, n. 1, p. 21-42, 2012.

SHAKERI, J.; FOSTER, H.A. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. **Enzyme and Microbial Technology**. v, 40, p. 961-968, 2007.

SHARON, E.; BAR-EYAL, M.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A.; KLEIFELD, O.; SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**. v. 91, n. 7, p. 687 – 693, 2001

SO YOUN, L.; TINDWA, H.; SEONG LEE, Y.; WAI NAING, K.; HYUN HONG, S.; NAM, Y.; YONG KIM, K. Biocontrol of Anthracnose in Pepper Using Chitinase, β -1,3 Glucanase, and 2-

Furancarboxaldehyde Produced by *Streptomyces cavourensis* SY224. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.22, n.10, p.1359–1366, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 2^a ed. Instituto Plantarum: Nova Odessa, 2008.

STARÝ, P.; SAMPAIO, M.; BUENO, V. H. P. Aphid parasitoids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) and their associations related to biological control in Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 51, p.107-118, 2007.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; CHANDRA, G.; FITZGERALD G. F.; CHATER K.F.; SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.71, p. 495–548, 2007.

VÖLKL, W.; MACKAUER, M.; PELL, J.K.; BRODEUR, J. Predators, parasitoids and pathogens, p. 187-233. *In* H. van Emden & R. Harrington. **Aphids as crop pests**. Wallingford, CAB International, 745p, 2007.

WEISS, K.; PARZEFALL, C.; HERZNER, G. Multifaceted defense against antagonistic microbes in developing offspring of the parasitoid wasp *Ampulex compressa* (Hymenoptera, Ampulicidae). **PLoS ONE**. v. 9, n. 6, p. 1-14, 2014.

XIONG, L.; LI, J.; KONG, F. *Streptomyces* sp. 173, an insecticidal microorganism from marine. **Letters in Applied Microbiology**. v.38, n.1, p. 32-37, 2004.

ZHANG, W.Q.; HASSAN, S.A. Use of the parasitoid *Diaeretiella rapae* (McIntoch) to control the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (L.). **Journal of Applied Entomology**. v. 127, p. 522–526, 2003.

CAPÍTULO 1
IDENTIFICAÇÃO E POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICOS DE FUNGOS ISOLADOS
EM AMBIENTES MARINHOS

RESUMO

O uso de biopesticidas formulados a partir de fungos entomopatogênicos é uma estratégia cada vez mais utilizada em programas de manejo integrado de pragas. Os micro-organismos empregados nestes biopesticidas são isolados de organismos e ecossistemas terrestres, entretanto a bioprospecção em ambientes marinhos pode revelar fungos promissores para o controle de pragas. Neste sentido, foram identificados e avaliados cinco isolados marinhos no controle de *Brevicoryne brassicae*. O isolado mais virulento foi comparado com bioinseticidas comerciais formulados a partir de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre a mortalidade de *B. brassicae*, além de serem avaliados efeitos letais e subletais sobre parâmetros de crescimento populacional do afídeo. Os isolados foram identificados como *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus sydowii*, *Penicillium dipodomyicola*, e *Trichoderma harzianum*. O mais virulento foi *A. versicolor*, causando 85,9% de mortalidade de *B. brassicae* em avaliações com 24h, e após 72h a mortalidade foi de 100%. A mortalidade causada por *A. versicolor* foi similar a *B. bassiana* e *M. anisopliae* na concentração de 5×10^5 conídios.mL⁻¹, sendo superior a *M. anisopliae*, em avaliações com 24h, na concentração de 5×10^9 conídios.mL⁻¹. A CL₂₅ ($0,32 \times 10^3$) de *A. versicolor* não afetou parâmetros de crescimento populacional de *B. brassicae*. A mortalidade de afídeos causada por *A. versicolor*, similar à *B. bassiana* e *M. anisopliae* e a baixa CL₅₀ ($16,43 \times 10^3$) são indicativos do potencial deste fungo. Além disso, por se desenvolver em condições extremas de salinidade, nutrição, alta pressão, radiação UV e temperatura, competindo com outros fungos, bactérias e vírus, podem atribuir a *A. versicolor* vantagens sobre fungos terrestres em um ambiente hostil como o agrícola, fazendo dele um fungo promissor para o controle biológico de pragas.

Palavras-Chave: Bioprospecção, Controle biológico, MicoInseticidas, *Brevicoryne brassicae*

CHAPTER 1
IDENTIFICATION AND ENTOMOPATHOGENIC POTENTIAL OF FUNGI
ISOLATED FROM MARINE ENVIRONMENTS

ABSTRACT

The use of formulated biopesticide from entomopathogenic fungi is a strategy increasingly used in integrated pest management programs. The microorganisms used in these biopesticides are isolated from terrestrial organisms and ecosystems, however bioprospecting in marine environments may reveal promising fungi for pest control. In this sense, were identified and evaluated five marine isolated on control *Brevicoryne brassicae*. The most virulent isolate was compared with commercial insecticides formulated from *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of *B. brassicae*, and were evaluated lethal and sublethal effects on parameters of the aphid population growth. The isolates were identified as *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus sydowii*, *Penicillium dipodomyicola*, and *Trichoderma harzianum*. The most virulent was *A. versicolor*, causing 85,9% mortality of *B. brassicae* in reviews with 24h, and 72h after the mortality was 100%. The mortality caused by *A. versicolor* was similar to *B. bassiana* and *M. anisopliae* in the concentration of 5×10^5 conidia.mL⁻¹, higher than the *M. anisopliae* in reviews with 24h at a concentration of 5×10^9 conidia.mL⁻¹. The LC₂₅ ($0,32 \times 10^3$ conidia.mL⁻¹) of *A. versicolor* did not affect parameters of population growth of *B. brassicae*. The mortality caused by aphids *A. versicolor*, similar to *B. bassiana* and *M. anisopliae* and the low LC₅₀ ($16,43 \times 10^3$ conidia.mL⁻¹) are indicative of the potential of this fungus. Furthermore, developing in extreme conditions of salinity, nutrition, high pressure, UV radiation and temperature may confer *A. versicolor* fungi advantages competing with other terrestrial fungi, bacteria and viruses in a hostile environment such as farm, making it a promising fungus for biological control of pests.

Keywords: Bioprospecting, Biological control, micoinsecticide, *Brevicoryne brassicae*

1 INTRODUÇÃO

A couve-manteiga (*Brassicae oleracea* L. var. *Acephala*) é uma das hortaliças mais consumidas no mundo. No Brasil seu cultivo cresce de modo significativo (NOVO *et al.*, 2010), sendo uma importante fonte de renda para agricultores. Um dos principais problemas da couve é o afídeo *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae) que causa danos diretos e indiretos, prejudicando o desenvolvimento e comercialização desta hortaliça (MA *et al.*, 2010). Os danos diretos ocorrem pela injeção de toxinas e sucção de seiva, causando murcha, nanismo e morte da planta (PONTOPPIDAN *et al.*, 2003; GRIFFIN & WILLIAMSON, 2012; OPFER & MCGRATH 2013). Os danos indiretos ocorrem pela transmissão de viroses (FERERES & MORENO, 2009) e excreção do *honeydew*, que promove o crescimento de fungos (ELLIS *et al.*, 1998) e atrai formigas que protegem o afídeo, atacando produtores (BARTON & IVES, 2014). Para reduzir esses danos são feitas pulverizações sistemáticas com inseticidas químicos para controle de *B. brassicae*.

O uso de inseticidas químicos corresponde a 95% dos produtos utilizados para controle de *B. brassicae* (MAPA, 2015). As pulverizações são feitas de modo intensivo (FILGUEIRA, 2008), colocando a couve entre os oito produtos agrícolas com maior residual de pesticida (ANVISA, 2011). Entretanto, esta situação pode ser mais grave devido a possível contaminação ambiental e humana, eliminação de insetos benéficos e seleção de afídeos resistentes (AHMAD & ASLAM, 2005; AHMAD & AKHATAR, 2013). Neste cenário, o uso de fungos entomopatogênicos é uma alternativa para reduzir o emprego de inseticidas químicos contra *B. brassicae*.

Os afídeos são considerados um dos grupos mais suscetíveis a fungos entomopatogênicos (MILNER, 1997; SHAH & PELL, 2003). A avaliação destes micro-organismos no controle de afídeos, visando a seleção e possível desenvolvimento de novos micoinseticidas são descritas para diversos fungos (PELL & VANDERBER, 2002; FOURNIER & BRODEUR, 2000; PELL *et al.*, 1997; GURULINGAPPA *et al.*, 2011; BUTT *et al.*, 1995; VU *et al.*, 2007), sendo normalmente isolados de insetos infectados e em ambientes terrestres. Entretanto a bioprospecção de micro-organismos, como os isolados de ambientes marinhos podem revelar linhagens promissoras, com elevada patogenicidade a insetos.

A exploração da diversidade presente em ambientes marinhos tem elevado potencial para desenvolvimento de novos produtos (DUNCAN *et al.*, 2014). Apesar desse ambiente abranger mais de 70% da superfície terrestre (DIONISI *et al.*, 2012), sua exploração é incipiente quando

comparada com ecossistemas e organismos terrestres (FELING *et al.*, 2003; JENSEN *et al.*, 2007; HUGLES *et al.*, 2008). Apesar do Brasil possuir uma das maiores costas marítimas do mundo, estudos com micro-organismos ainda são reduzidos. Fungos isolados destes ambientes podem ser promissores agentes de controle biológico. Por estarem expostos a alta salinidade, temperatura, radiação UV e baixos níveis de nutrientes (PORSANI *et al.*, 2013), sofrem diferenciações fisiológicas que podem promover a produção de enzimas e toxinas que possibilitam sua sobrevivência nesse ambiente hostil (ORTEGA-MORALES *et al.*, 2010). Devido a estas características, fungos marinhos podem ser promissores agentes no controle de pragas agrícolas. Neste sentido, Porsani *et al.*, 2013 avaliaram dezenas de fungos provenientes de ambiente marinho e cinco isolados apresentaram alta atividade antimicrobiana.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi verificar o potencial entomopatogênicos destes cinco isolados marinhos contra *B. brassicae*. Para isso foram realizados trabalhos para identificar estes micro-organismos, selecionar o mais virulento e compará-lo com bioinseticidas comerciais formulados a partir de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, determinar a CL₅₀ deste isolado e avaliar seus efeitos letais e subletais sobre *B. brassicae*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CRIAÇÃO DE *Brevicoryne brassicae*

A criação estoque de *B. brassicae* foi estabelecida por meio de coleta de afídeos em plantas da família Brassicaceae de áreas produtoras de hortaliças de Curitiba, PR. Os insetos foram transportados ao laboratório onde passaram por triagem, e foram transferidos para couve-manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) cultivadas em vasos mantidas em condições controladas (Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; fotofase: 14 horas e UR: $70 \pm 10\%$). Lâminas de exemplares adultos foram confeccionadas para confirmação da espécie.

2.2 MICRO-ORGANISMOS E MEIO DE CULTURA

Foram utilizados cinco isolados fúngicos coletados de sedimentos marinhos na Ilha do Mel, Paraná, Brasil ($25^\circ 20'S - 48^\circ 20'W$ e $25^\circ 35' - 48^\circ 35'W$). Estes isolados foram selecionados por apresentarem forte atividade inibitória sobre linhagens patogênicas de bactérias (PORSANI *et al.*, 2013). Os isolados foram cultivados em placas Petri com meio Czapek Dox (Quadro 1), e Czapek Dox com adição de água salina à água destilada, na razão de 1:2, por sete dias em estufa B.O.D. à 35°C .

Quadro 1 – Produtos utilizados no preparo de 1000 mL do meio Czapek (pH a 25°C : $3 \pm 0,2$).

Produto	Quantidade (gramas)
Sacarose	30,0
Nitrato de Sódio	3,0
Fosfato Dipotássio	1,0
Sulfato de Magnésio	0,5
Cloreto de Potássio	0,5
Sulfato Ferroso	0,01
Ágar	15,0

2.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

Os isolados foram identificados por características macro e micro-morfológicas (ARX, 1974; BARNETT & HUNTER, 1987, DE HOOG & GUARRO, 2004; ELLIS, 1976; KERN & BLEVINS, 1999; KONEMAN & ROBERTS, 1987, LARONE, 1987; ROSSMAN *et al.*, 1987; SILVEIRA, 1995) e por meio do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal (MOSCARDINI *et al.*, 2002). Para caracterização molecular dos isolados foi realizada a extração do DNA (VICENTE *et al.*, 2008), onde os isolados foram cultivados em meio Czapeck Dox sólido, a 28°C por 72 horas. Em tubos Eppendorf de 1,5 mL com sílica e celite (2:1) foi colocado cerca de 1 cm² de micélio das culturas, evitando trazer o ágar. O pellet foi ressuspensão em 100 µL de água miliQ, e deixado por 2 horas em temperatura ambiente e posteriormente foi reservado em freezer - 20°C. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific Launches New NanoDrop 2000).

A PCR foi realizada com os primers ITS1(5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4(5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'), que amplificam a região ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA [57]. As condições da reação foram realizadas de acordo com a descrição a seguir com algumas modificações: 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 0,5 U de Taq polimerase, 0,14 µM de primers (3,5 pmoles), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, e volume final de 25 µL.

A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf*[®] modelo *Mastercycler Gradient*, com desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; 35 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 50°C, 1 minuto a 72°C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5% utilizando o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (1 kb *Ludwing Biotec*).

2.4 SELEÇÃO DO FUNGO COM MAIOR POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO

Para a seleção do fungo com maior potencial entomopatogênico os cinco isolados foram cultivados em placas de Petri, contendo meio Czapeck Dox (Quadro 1), por sete dias a 28°C para obtenção dos esporos. Neste bioensaio foram empregadas ninfas com 48h de idade de *B. brassicae*.

Para obter as ninfas 20 adultos foram transferidos para discos foliares de couve-manteiga com 8 cm de diâmetro e mantidos em placas de Petri contendo uma camada de 1 cm de ágar/água a 2%. As placas foram mantidas em condições controladas (Temp.: $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$; fotofase: 14 horas e UR: $70 \pm 10\%$) e após 48h os adultos eram retirados e as ninfas empregadas nos bioensaios.

Nos bioensaio foram utilizadas mudas de couve desinfetadas superficialmente. Para isso as mudas foram lavadas com etanol 70% por 1 min, seguido de hipoclorito de sódio (0,5%) por 1 min e enxaguadas com água destilada esterilizada e mantidas por uma hora em ambiente protegido e ventilado até a secagem. Após a secagem, folhas com pecíolos foram destacadas das mudas. Essas folhas tiveram os pecíolos envoltos em algodão e colocadas em um tubo eppendorf (3mL) com água destilada esterilizada para manutenção do turgor, sendo posteriormente pulverizadas com suspensões fúngicas.

As pulverizações foram realizadas por um microatomizador “Airbrush” elétrico, modelo “VL”, acoplado a um compressor regulado a 15 libras/pol². Em todas as pulverizações foram empregados 0,5 mL de cada uma das suspensões. As suspensões foram ajustadas a $1,5 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹ por meio de uma câmara de Neubauer. Para as pulverizações foi adicionado às suspensões *Tween 80*[®] (0,01%). Após a pulverização as folhas foram mantidas em local abrigado e protegido até a secagem do residual e posteriormente, com o auxílio de um microscópio estereoscópio e pincel de cerdas finas, foram inoculadas dez ninfas de *B. brassicae* por folha. As folhas infestadas foram acondicionadas em placas de Petri forradas com papel filtro e mantidas em condições controladas ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotofase: 14 horas e UR: $70 \pm 10\%$) (Figura 1).



Figura 1 - Unidade amostral do bioensaio com diferentes suspensões fungicas ($1,5 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹), sendo constituída por placa de petri contendo uma folha de couve-manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) e mantidas com o pecíolo envolto em algodão umedecido em tubo eppendorf (3 mL) e contendo 10 nínfas de *Brevicoryne brassicae*. Fonte: Autor (2014).

As avaliações de mortalidade foram realizadas em intervalos de 24h, durante cinco dias. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico, as ninfas foram vistoriadas e os insetos mortos foram individualizados em câmara úmida (placas de Petri estéreis contendo algodão umedecido com água destilada esterilizada) para favorecer o desenvolvimento do micélio e esporulação dos fungos para confirmação do agente causal.

Os bioensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, sendo que para cada tratamento foram realizadas seis repetições. Cada repetição foi formada por uma folha de couve inoculada com 10 ninfas de *B. brassicae* com até 48h de idade.

2.5 AVALIAÇÃO DO ISOLADO FÚNGICO MAIS PROMISSOR COM BIOINSETICIDAS COMERCIAIS

O isolado fúngico que causou a maior mortalidade sobre *B. brassicae* foi avaliado em comparação aos inseticidas comerciais Methamax[®] e Bovemax[®]. O inseticida Methamax[®] tem como ingrediente ativo *Metarhizium anisopliae* contendo $2,5 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹ (Concentrado Emulsionável, Novozymes Bioagr Produtos Para Agricultura LTDA). O inseticida Bovemax[®] tem como ingrediente ativo *Beauveria bassiana*, isolado CG716, contendo $1,5 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹ (Concentrado Emulsionável, Novozymes Bioagr Produtos Para Agricultura LTDA).

Estes inseticidas e o isolado fúngico tiveram suas concentrações ajustadas para $1,5 \times 10^5$ e 10^9 , por meio de uma câmara de Neubauer, e posteriormente foram pulverizados sobre folhas de couve, por meio de um microatomizador “Airbrush”, sendo em seguida inoculadas ninfas de *B. brassicae*, conforme metodologia descrita no item 2.4.

As avaliações de mortalidade e os procedimentos para confirmação do agente causal foram realizadas em intervalos de 24h, durante cinco dias, conforme descrito no item 2.4.

Os bioensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, sendo que para cada tratamento foram realizadas seis repetições. Cada repetição foi formada por uma folha de couve inoculada com 10 ninfas de *B. brassicae* com até 48h de idade.

2.6 CARACTERIZAÇÃO TOXICOLÓGICA DO ISOLADO FÚNGICO MAIS PROMISSOR

A estimativa da linha básica de suscetibilidade foi realizada através de bioensaios de contato residual, empregando ninfas com até 48h, obtidas conforme metodologia descrita anteriormente (Item 2.4). Foram utilizadas seis concentrações do isolado mais promissor (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9) que proporcionaram uma mortalidade entre 5 e 95% das ninfas de *B. brassicae*. Essas concentrações foram obtidas a partir da raspagem dos conídios produzidos sobre meio de cultura Czapeck Dox utilizando uma espátula esterilizada. A contagem dos conídios foi feita em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada em $1,5 \times 10^9$ conídios/mL⁻¹. Esta suspensão foi diluída serialmente, nas concentrações de $1,5 \times 10^4$ a 10^9 conídios.mL⁻¹, contendo Tween 80[®] (0,01%).

Essas concentrações foram pulverizadas por um microatomizador “Airbrush” elétrico, modelo “VL”, acoplado a um compressor regulado a 15 libras/pol². Em todas as pulverizações foi empregado 500 µL de calda. As pulverizações foram feitas a 15 cm de distância entre o bico pulverizador e a folha. Após a pulverização, as folhas foram mantidas por 1h em local protegido até a secagem do resíduo. Posteriormente, com o auxílio de um microscópio estereoscópio e pincel de cerdas finas, foram inoculadas dez ninfas de *B. brassicae* por folha. As folhas infestadas foram acondicionadas em placa de Petri forradas com papel filtro e mantidas em condições controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotofase: 14 horas e UR: $70 \pm 10\%$).

As avaliações de mortalidade ocorreram em intervalos de 24h durante cinco dias, sendo realizadas como descrito anteriormente (item 2.4). A confirmação do agente causal foi feita pela individualização dos insetos mortos em placas de Petri estéreis contendo algodão umedecido com água destilada esterilizada para favorecer o desenvolvimento do micélio externo e esporulação dos fungos. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, para cada concentração foram realizadas cinco repetições. Cada repetição foi formada por quatro placas de Petri com dez ninfas de *B. brassicae*.

2.7 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS LETAL E SUBLETAL DO FUNGO MAIS PROMISSOR

Plântulas de couve tiveram seu sistema radicular lavado para remoção do substrato (Figura 2A). Posteriormente passaram por desinfecção superficial conforme descrito no item 2.4. Posteriormente estas mudas foram transferidas para tubos de vidro (18 mL) esterilizados, contendo 15 mL de água destilada estéril para manutenção do turgor da planta (Figura 2B). Sobre estas plantas foi inoculado um adulto de *B. brassicae*, sendo este confinado por meio de gaiolas plásticas (copos de poliestireno de 300mL, com tela no fundo) (Figura 2C). Estes insetos foram mantidos em condições controladas (temperatura: $25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$; UR: 70% e fotofase de 14h) por 24h e após este período as plantas foram vistoriadas, deixando-se apenas uma ninfa de 24h de idade por planta.

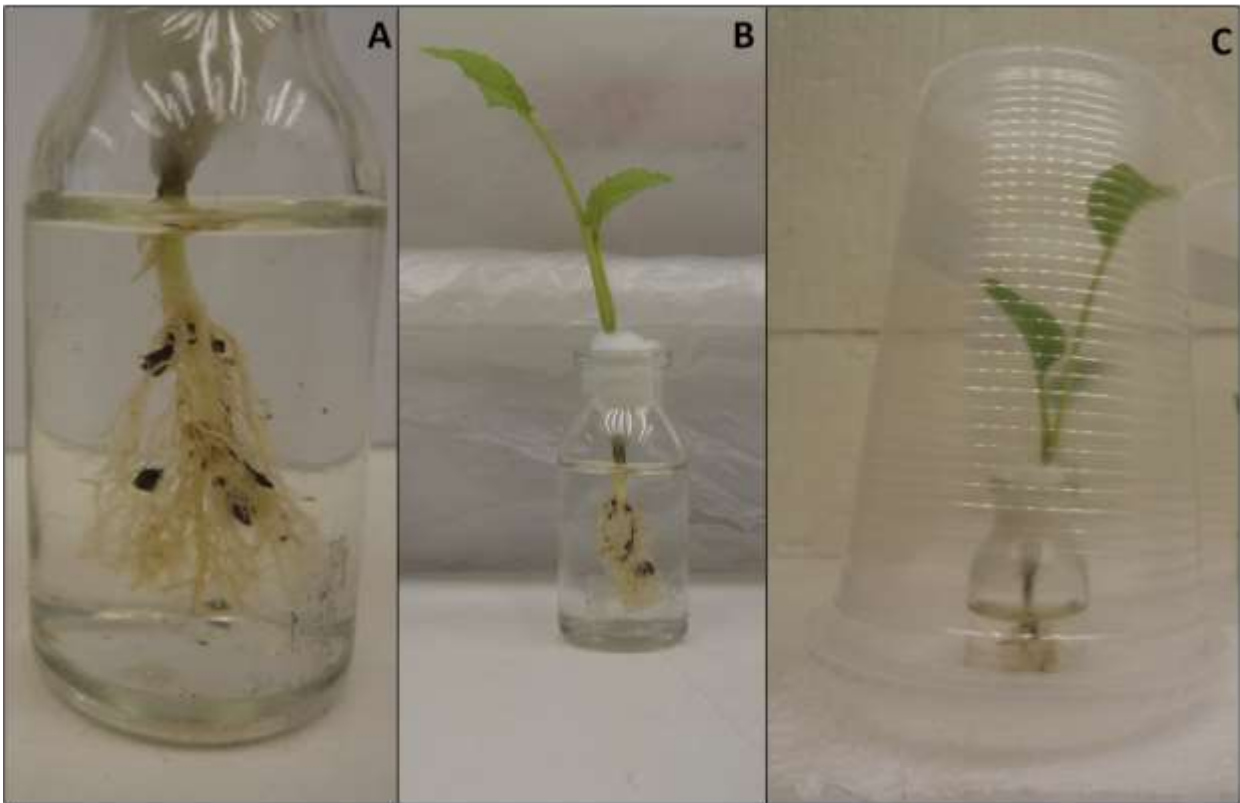


Figura 2 - Preparo de plântulas de couve-manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). **A:** Aspecto do sistema radicular após a remoção do substrato. **B:** plantas mantidas em tubos de penicilina (18 mL) autoclavados, contendo 15 mL de água destilada esterilizada. **C:** gaiola para confinamento de *B. brassicae*. Fonte: Autor (2014).

Sobre estes insetos foram pulverizadas uma concentração de $0,32 \times 10^3$ conídios.mL⁻¹, correspondendo a CL₂₅ do fungo *A. versicolor*. Essas concentrações foram pulverizadas por um microatomizador “Airbrush” elétrico, modelo “VL”, acoplado a um compressor regulado a 15 libras/pol². Em todas as pulverizações foi empregado 500 µL de calda. Após a pulverização, as plantas foram isoladas por uma gaiola plástica telada e mantida em condições controladas (25° ± 2°C; UR: 70% e fotofase de 14h). As vistorias foram feitas diariamente até a morte do inseto por meio de um microscópio estereoscópio (aumento de 32 ×). Os parâmetros biológicos observados foram: número e duração de cada estágio ninfal; duração do período ninfal; porcentagem de sobrevivência do estágio ninfal; duração dos períodos pré-reprodutivo, reprodutivo e pós-reprodutivo; longevidade; fertilidade diária e total; duração do ciclo de vida e viabilidade.

Estes resultados foram utilizados para confecção de uma tabela de vida de fertilidade sendo calculados a taxa líquida de reprodução (R_0), tempo médio de cada geração (T), taxa intrínseca de crescimento populacional (r_m), razão finita de aumento populacional (λ) e o tempo que leva a população para duplicar em número (TD). Para cada tratamento foram realizadas 48 repetições, sendo cada repetição formada por uma planta de couve com um afídeo.

2.8 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados da seleção do fungo com maior potencial entomopatogênico e a avaliação deste isolado com os bioinseticidas Bovemax[®] e Methamax[®] foram transformados pelo arcosen da raiz quadrada para normalização das distribuições e homogeneidade das variâncias (HADDAD & VENDRAMIN, 2000). Os dados transformados foram analisados por análise de variância (ANOVA). O percentual médio (\pm EPM) de insetos mortos foi submetido a uma análise de variância simples (*One-way* ANOVA). Diferenças significativas entre as médias dos tratamentos foram submetidas ao teste de Tukey ($p < 0,05$) (Zar, 2009).

Os dados de mortalidade de *B. brassicae* causado pelas diferentes concentrações de *A. versicolor* foram submetidos à análise de probit para estimativa da CL_{25} e CL_{50} , intervalo de confiança de 95%, por meio do programa PoloPlus (LeOra Software, Petaluma, CA) (ROBERTSON *et al.*, 2007).

Os parâmetros de tabela de vida de fertilidade foram baseados em Andrewartha e Birch (1954). Estes resultados deram subsídio para o cálculo dos parâmetros de crescimento populacional (R_0 , T , r_m , λ e TD), baseados no método jackknife (MEYER *et al.*, 1986). As comparações dos parâmetros de crescimento populacionais de afídeos tratados e não tratados com a CL_{25} de *A. versicolor* foram realizadas pelo test 't' unilateral por meio do programa computacional tabvida (PENTEADO *et al.*, 2010)

3 RESULTADOS

3.1 IDENTIFICAÇÕES DOS MICRO-ORGANISMOS

Os cinco isolados fúngicos utilizados neste trabalho foram identificados por análise morfológica como pertencentes aos gêneros *Penicillium* (Figura 3), *Aspergillus* (Figura 4, 5 e 6) e *Trichoderma* (Figura 7). Para a confirmação da análise morfológica foi realizado o sequenciamento com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4, os quais amplificam as regiões ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal, produzindo sequências de 523 à 561pb. As sequências foram alinhadas e submetidas ao Genbank após a comparação entre sequências já existentes na base de dados que mostraram similaridade variando de 99 a 96%. Os fungos foram identificados como sendo *Penicillium dipodomyicola*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus versicolor* e *A. sydowii* (Tabela 1).

Tabela 1 - Identificação por comparação com sequencias ITS1-5.8s-ITS2 do rDNA de fungos

N° Acesso GenBank	Identificação morfológica	Micro-organismos relacionados	N° Acesso GenBank	E-Value	% Identidade
KC736977	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium dipodomyicola</i>	DQ339570	0.0	99
			GQ161752	0.0	99
			DQ339550	0.0	99
KP675942	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus versicolor</i>	AJ937750	0.0	98
			AJ937749	0.0	98
			AY373880	0.0	97
KP675943	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus sydowii</i>	AY373868	0.0	99
			EU45721	0.0	99
			FJ008988	0.0	99
KP675944	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma harzianum</i>	KJ588240	0.0	96
			FJ884178	0.0	96
			KJ028794	0.0	96
KP675945	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus sydowii</i>	KC795923	0.0	99
			KC795922	0.0	99
			JX518253	0.0	98

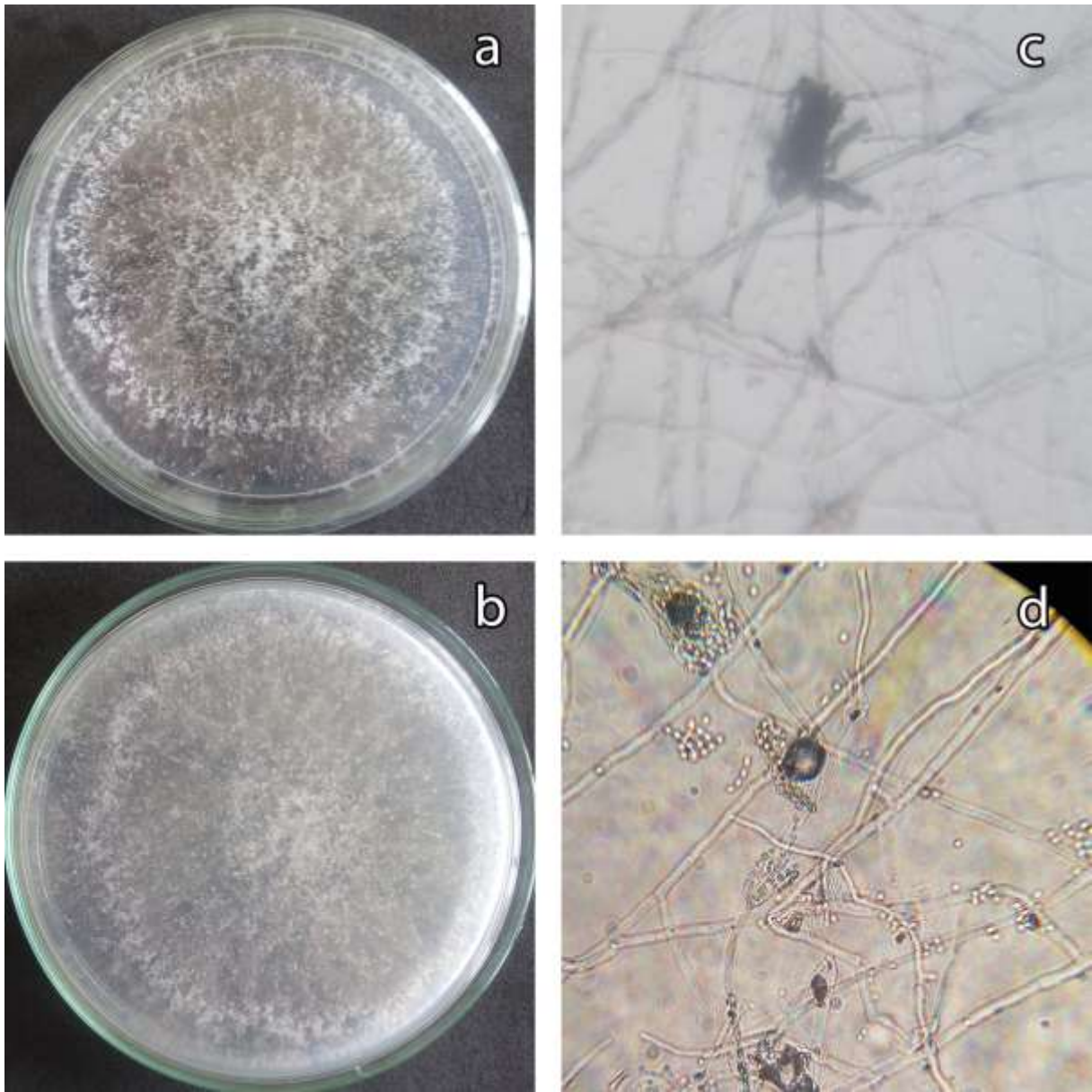


Figura 3 - Identificação macro e micro morfológica do fungo *Penicillium dipodomycola*. a. Morfologia macroscópica (verso da colônia) cultivo em meio Czapek por 14 dias à 35°C b. Morfologia macroscópica (reverso da colônia) em meio Czapek por 14 dias à 35°C c. Microscopia óptica cultivo em meio Czapek por 7 dias à 35°C (aumento: 400x) d. Microscopia óptica cultivo em meio Saboraud por 14 dias à 35°C (aumento 400x). Fonte: Autor (2014).

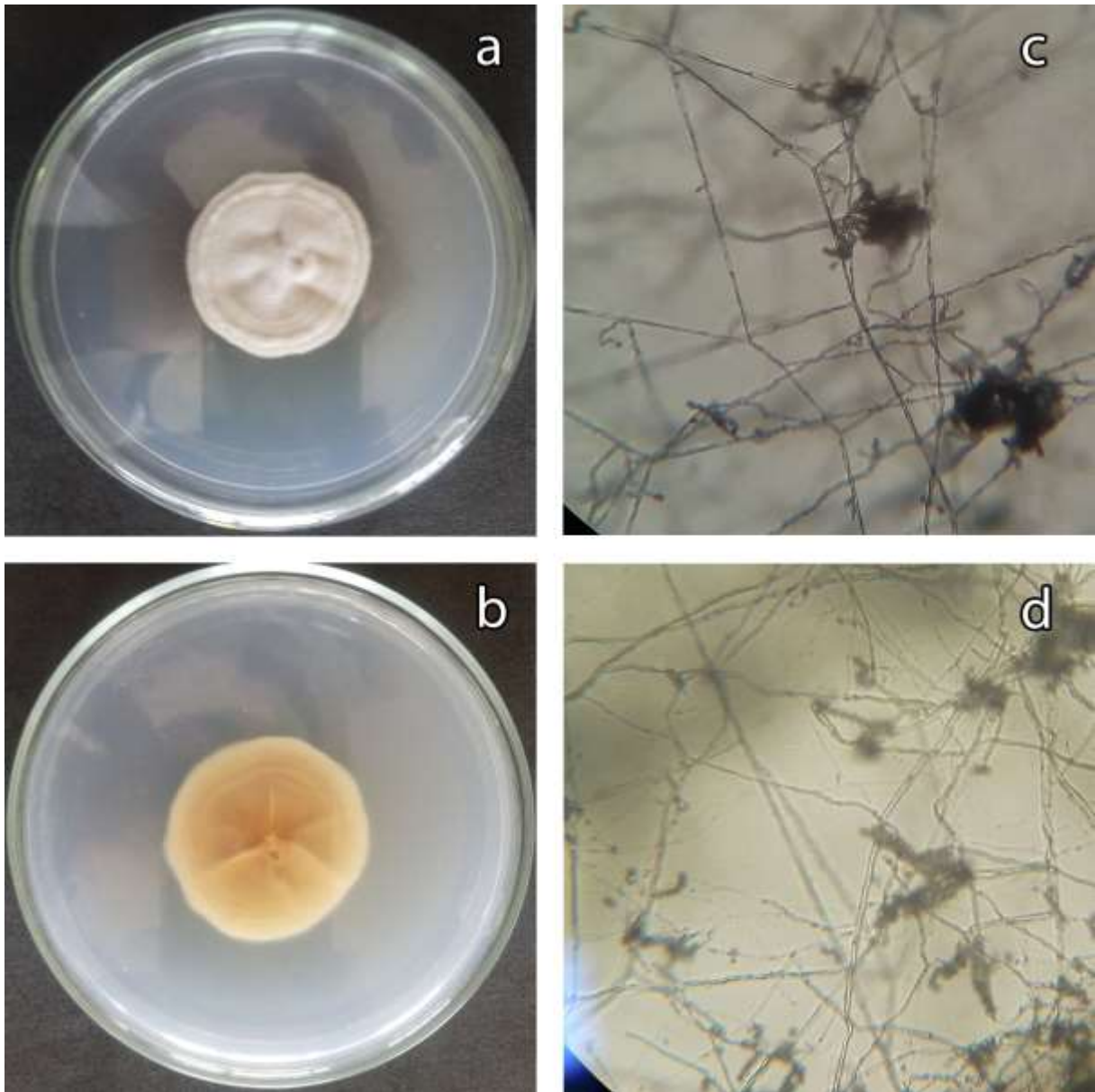


Figura 4 - Identificação macro e micro morfológica do fungo *Aspergillus sydowii*. a. Morfologia macroscópica (verso da colônia) cultivo em meio Czapek por 14 dias à 35°C b. Morfologia macroscópica (reverso da colônia) em meio Czapek por 14 dias à 35°C c. Microscopia óptica cultivo em meio Czapek por 7 dias à 35°C (aumento: 400x) d. Microscopia óptica cultivo em meio Saboraud por 14 dias à 35°C (aumento 400x). Fonte: Autor (2014).

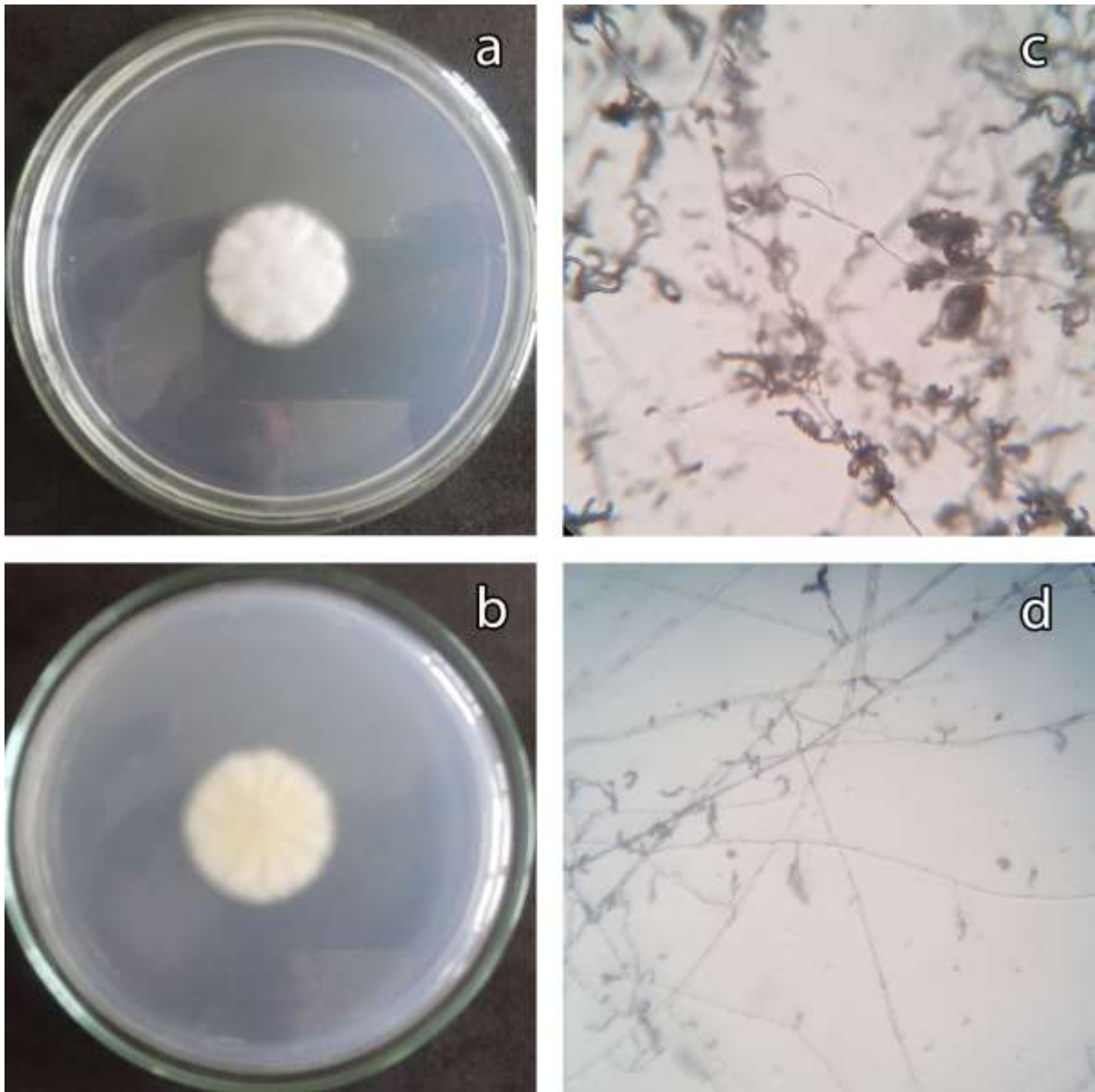


Figura 5 - Identificação macro e micro morfológica do fungo *Aspergillus sydowii*. a. Morfologia macroscópica (verso da colônia) cultivo em meio Czapek por 14 dias à 35°C b. Morfologia macroscópica (reverso da colônia) em meio Czapek por 14 dias à 35°C c. Microscopia óptica cultivo em meio Czapek por 7 dias à 35°C (aumento: 400x) d. Microscopia óptica cultivo em meio Sabouraud por 14 dias à 35°C (aumento 400x). Fonte: Autor (2014).

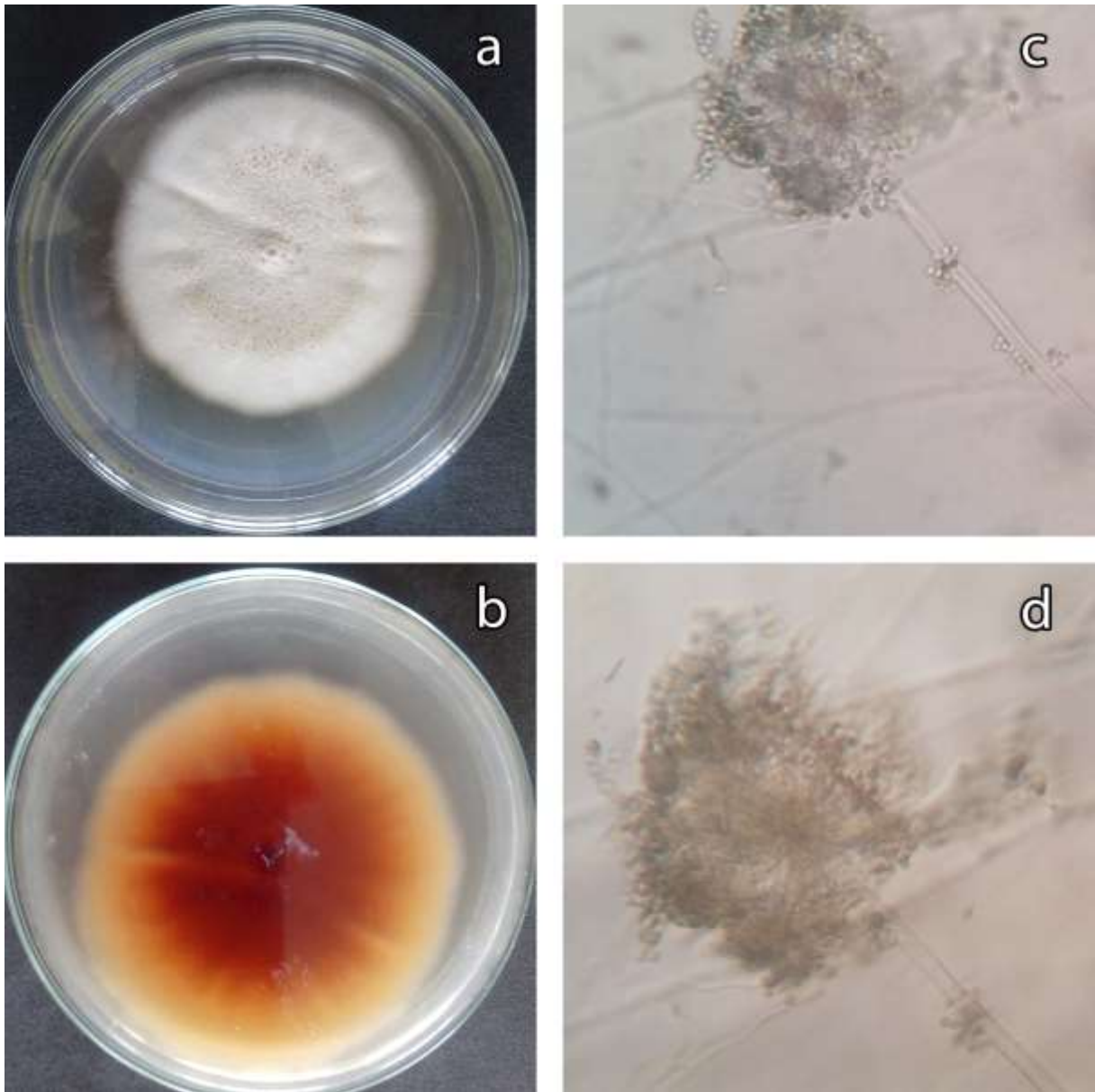


Figura 6 - Identificação macro e micro morfológica do fungo *Aspergillus versicolor*. a. Morfologia macroscópica (verso da colônia) cultivo em meio Czapek por 14 dias à 35°C b. Morfologia macroscópica (reverso da colônia) em meio Czapek por 14 dias à 35°C c. Microscopia óptica cultivo em meio Czapek por 7 dias à 35°C (aumento: 400x) d. Microscopia óptica cultivo em meio Saboraud por 14 dias à 35°C (aumento 400x). Fonte: Autor (2014).

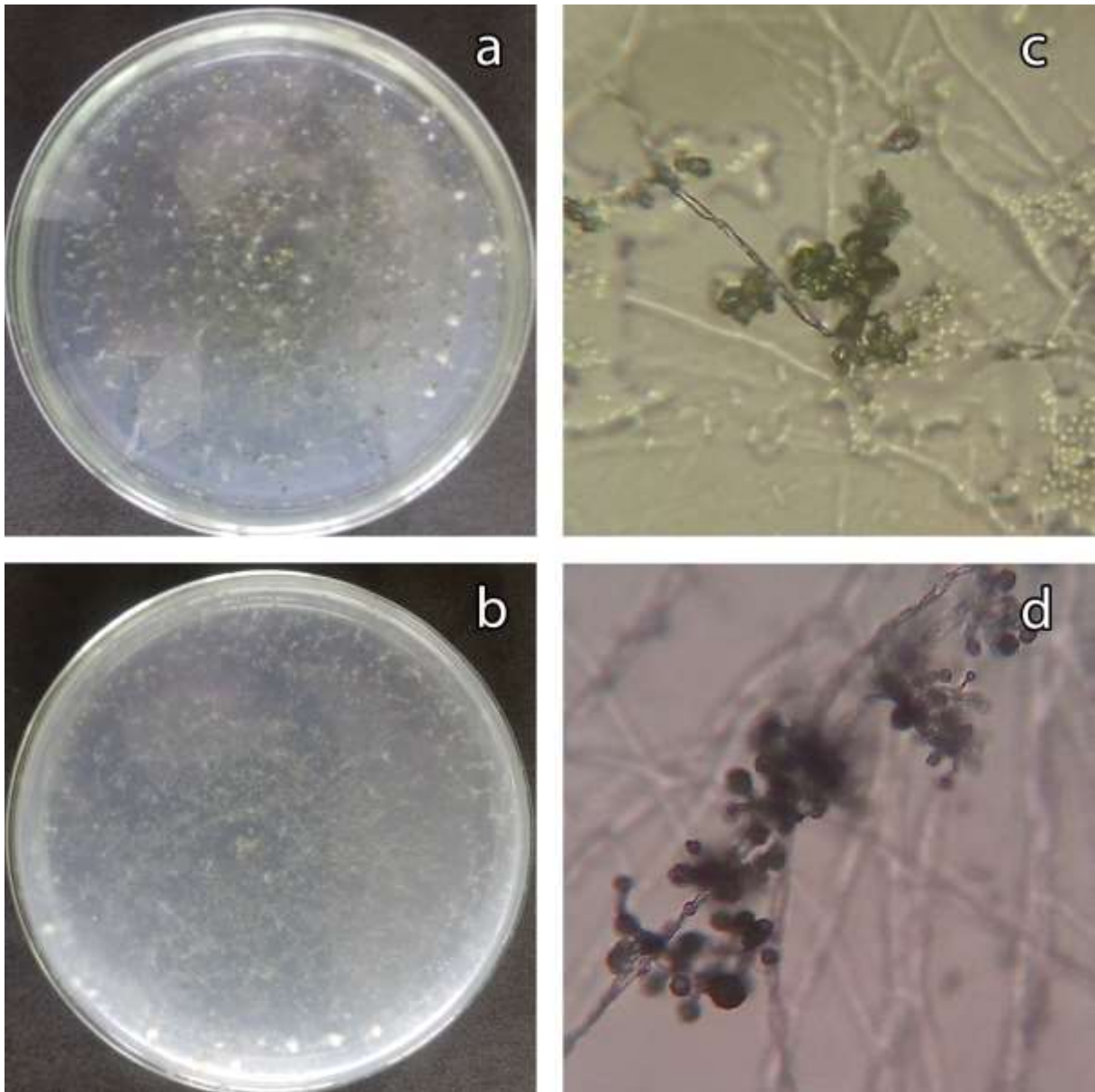


Figura 7 - Identificação macro e micro morfológica do fungo *Trichoderma harzianum*. a. Morfologia macroscópica (verso da colônia) cultivo em meio Czapek por 14 dias à 35°C b. Morfologia macroscópica (reverso da colônia) em meio Czapek por 14 dias à 35°C c. Microscopia óptica cultivo em meio Czapek por 7 dias à 35°C (aumento: 400x) d. Microscopia óptica cultivo em meio Sabouraud por 14 dias à 35°C (aumento 400x). Fonte: Autor (2014).

3.2 SELEÇÃO DO FUNGO COM MAIOR POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO

O isolado *A. versicolor* apresentou o maior potencial entomopatogênico em avaliações com 24h, se diferenciando dos demais fungos ($F = 24,74$; g.l. = 5, 30; $p < 0,001$). A mortalidade causada por *A. versicolor* foi de 85,9%, sendo três vezes superior ao segundo isolado mais agressivo, *T. harzianum* (Figura 7). Os dois isolados de *A. sydowii* e *P. dipodomyicola* causaram uma mortalidade confirmada de 16,7, 15 e 11,7%, respectivamente (Figura 7). Em avaliações com 48h o fungo *A. versicolor* teve uma mortalidade confirmada de 98,3%, superior à causada pelos outros isolados ($F = 60,18$; g.l. = 5, 30; $p < 0,001$). Neste período houve o aumento médio de 50% na mortalidade causada por *T. harzianum*, um dos isolados de *A. sydowii* e *P. dipodomyicola*, sendo que o outro isolado de *A. sydowii* teve um aumento de 74% na mortalidade (Figura 7).

O fungo *A. versicolor* causou 100% de mortalidade em avaliações com 72h, diferenciando-se dos demais isolados ($F = 28,70$; g.l. = 5, 30; $p < 0,001$). Nesta avaliação *T. harzianum* obteve 70% de mortalidade, seguido dos isolados de *A. sydowii* com 58,3 e 48,3% (Figura 7). O isolado *P. dipodomyicola* apresentou a menor mortalidade, sendo similar a verificada na avaliação com 48h (Figura 3). Nas avaliações com 96h a mortalidade confirmada para *T. harzianum* foi de 70%, não se diferenciando de *A. versicolor* e de um dos isolados de *A. sydowii* ($F = 33,56$; g.l. = 5, 30; $p < 0,001$) (Figura 7). *P. dipodomyicola* apresentou o pior desempenho com 36,6% de mortalidade confirmada. Avaliações realizadas com 120h mostraram que *A. versicolor* e *T. harzianum* não se diferenciaram de modo significativo ($F = 47,43$; g.l. = 5, 30; $p < 0,001$), com os demais isolados apresentando resultados similares ao observado na avaliação com 96h (Figura 7).

Em todas as avaliações *A. versicolor* causou a maior mortalidade de *B. brassicae*, além de ter a maior produção de conídios, com $5,2 \times 10^4$ conídios.ml⁻¹ por indivíduo. Os dois isolados de *A. sydowii* apresentaram uma produção de conídios de $3,2 \times 10^4$ e $2,8 \times 10^4$, respectivamente. Já a menor produção de conídios foi verificada para *P. dipodomyicola* ($1,5 \times 10^4$ conídios.ml⁻¹) e *T. harzianum* ($2,0 \times 10^3$ conídios.ml⁻¹). Por ter apresentado o melhor desempenho na mortalidade de *B. brassicae* em todas as avaliações e por apresentar a maior produção de conídios *A. versicolor* foi selecionado para ser empregado nos bioensaios posteriores.

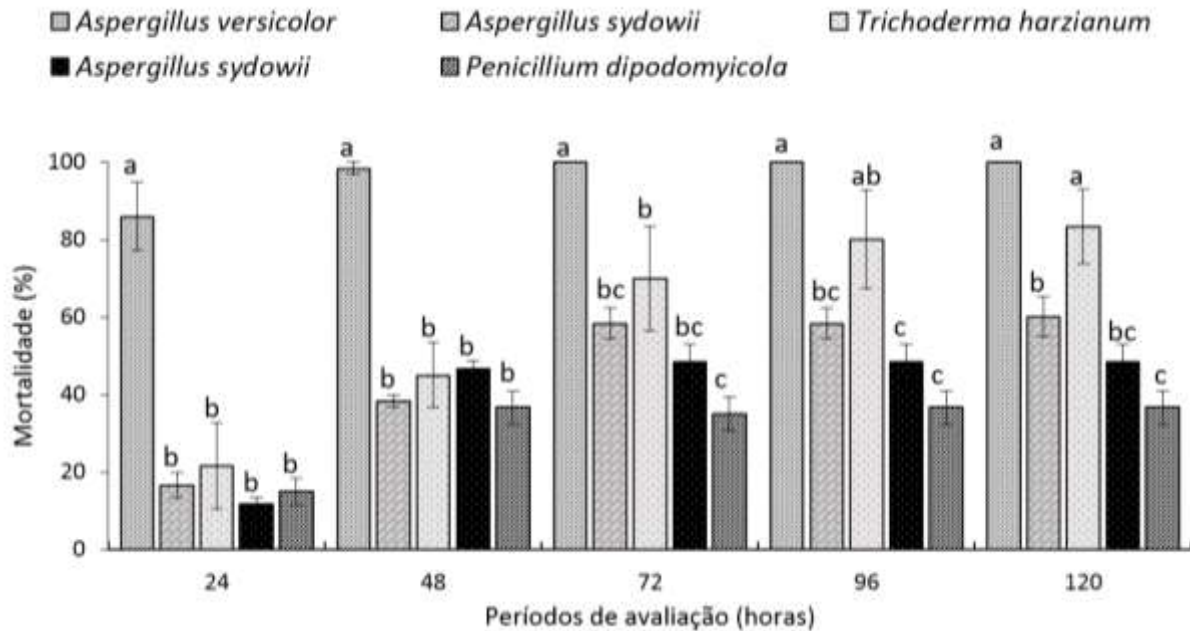


Figura 7 - Mortalidade média confirmada de ninfas de *Brevicoryne brassicae* pulverizados com fungos coletados em ambiente marinho após 24, 47, 72, 96 e 120 horas. Letras distintas no período de avaliação diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.3 AVALIAÇÃO DO ISOLADO FÚNGICO MAIS PROMISSOR COM BIOINSETICIDAS COMERCIAIS

A. versicolor causou uma mortalidade similar a Bovemax[®] e Methamax[®] na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹. Em avaliações com 24h, *A. versicolor* teve uma mortalidade similar aos bioinseticidas ($F = 2,379$; g.l. = 2, 24; $p < 0,1141$). *A. versicolor* e Bovemax[®] causaram 36% de mortalidade, sendo 45% superior a causada por Methamax[®] (20%) (Figura 8). A mortalidade entre tratamentos não se diferenciou em avaliações com 48h ($F = 1,964$; g.l. = 2,24; $p < 0,1623$). *A. versicolor* e Methamax[®] causaram 57,8% de mortalidade e para Bovemax[®] a mortalidade foi de 77,8% (Figura 8). Em avaliações com 72h a mortalidade foi novamente similar entre os tratamentos ($F = 2,379$; g.l. = 2,24; $p < 0,1141$). Methamax[®] não causou mortalidade nesta avaliação. Para *A. versicolor* a mortalidade foi de 68,9%, aproximadamente 16% inferior a causada por Bovemax[®] (82,2%) (Figura 8). Em avaliações com 96h não houve diferenças significativas entre os

tratamentos ($F = 0,1121$; g.l. = 2,24; $p < 0,8944$). *A. versicolor* causou 77,8% de mortalidade, sendo 5,3 e 3,0 % inferior a Bovemax[®] e Methamax[®], respectivamente (Figura 8). Na avaliação realizada com 120h não houve mortalidade de afídeos (Figura 8).

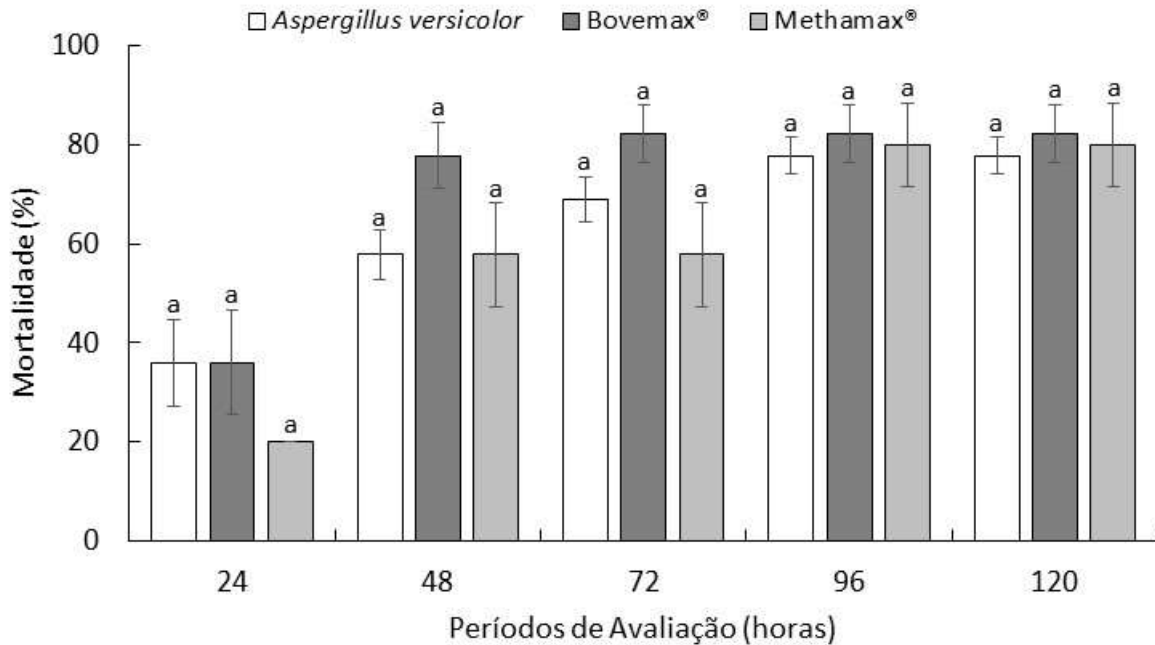


Figura 8 - Mortalidade confirmada de ninfas de *Brevicoryne brassicae* após 24, 47, 72, 96 e 120 horas de exposição à concentração de $1,5 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹ de *Aspergillus versicolor* e os inseticidas Bovemax[®] e Methamax[®]. Letras distintas no período de avaliação diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A. versicolor também causou uma mortalidade similar a Bovemax[®] e Methamax[®] na concentração de 10^9 conídios.ml⁻¹. Em avaliações com 24h, *A. versicolor* e Bovemax[®] tiveram mortalidade superior a Methamax[®] ($F = 7,8553$; g.l. = 2,18; $p < 0,0035$). Nesta avaliação *A. versicolor* e Bovemax[®] causaram, respectivamente 77,1 e 82,9% de mortalidade, sendo 50% superior à causada por Methamax[®] (40%) (Figura 9). Em avaliações com 48h não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($F = 2,7692$; g.l. = 2,27; $p < 0,0805$). Methamax[®] teve um incremento de 58%, atingindo 96% de mortalidade, próximo a Bovemax[®] (94%) e *A. versicolor* (86%) (Figura 9). Nas avaliações com 72h, *A. versicolor* teve 100% de mortalidade e Bovemax[®] e Methamax[®] causaram 96%, não ocorrendo diferenças entre os tratamentos ($F = 0,6923$; g.l. = 2,27;

$p < 0,5191$) (Figura 9). A partir das avaliações realizadas com 96h, a mortalidade de afídeos foi de 100% para todos os tratamentos (Figura 9).

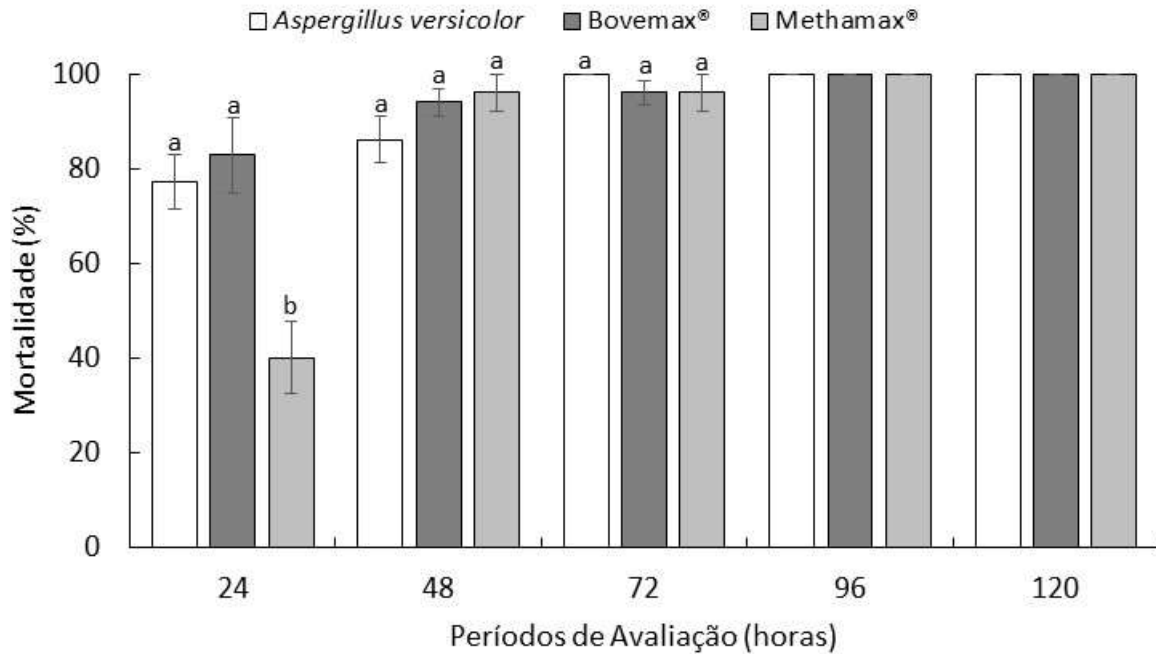


Figura 9 - Mortalidade confirmada de ninfas de *Brevicoryne brassicae* após 24, 47, 72, 96 e 120 horas de exposição à concentração de $1,5 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹ de *Aspergillus versicolor* e os inseticidas Bovemax® e Methamax®. Letras distintas no período de avaliação diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.4 CARACTERIZAÇÃO TOXICOLÓGICA DO ISOLADO FÚNGICO MAIS PROMISSOR

A caracterização toxicológica de *A. versicolor* sobre ninfas de *B. brassicae* expostas por cinco dias ao fungo estimou uma CL₂₅ de $0,32 \times 10^3$ e uma CL₅₀ de $16,43 \times 10^3$ conídios.mL⁻¹ (Tabela 2). A mortalidade observada ao quinto dia ajustou-se ao modelo de Probit, obtendo-se um χ^2 de 4,122 e heterogeneidade de 1,0304, sendo estimado um coeficiente angular de 0,391 ($\pm 0,028$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização toxicológica do isolado fúngico *A. versicolor* obtido sobre ninfas de *Brevicoryne brassicae* após cinco dias da exposição. Temp. 26 ± 2 °C, e 14 horas de fotofase e U.R. $70 \pm 10\%$.

N ¹	CL ₂₅ (IC 95%) ²	CL ₅₀ (IC 95%) ²	Coefficiente Angular (±EPM ³)	χ^2 (g.l.) ⁴	h ⁵
1520	$0,32 \times 10^3$ ($0,05 \times 10^3 - 1,09 \times 10^3$)	$16,43 \times 10^3$ ($6,12 \times 10^3 - 35,78 \times 10^3$)	0,391(±0,028)	4,122 (4)	1,0304

¹ Número de insetos testados; ² Concentração Letal; ³ Erro Padrão da Média; ⁴ Graus de liberdade; ⁵ Heterogeneidade

3.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS LETAL E SUBLETAL DO FUNGO MAIS PROMISSOR

Os parâmetros de crescimento populacional de *B. brassicae* não foram afetados pela exposição a CL₂₅ de *A. versicolor*. A taxa líquida de reprodução (R₀), que determina o total de descendentes fêmeas produzidas por fêmea, durante todo o período de reprodução e que chegam à geração seguinte foi 17,5% maior para os insetos não tratados ($8,86 \pm 0,55$), entretanto, não houve diferença dos afídeos expostos ao fungo ($T = 1,39$; g.l. = 2, 48; $p < 0,22$) (Tabela 3). A duração média de uma geração (T) foi similar para insetos expostos e não expostos a *A. versicolor* ($T = 0,24$; g.l. = 2, 48; $p < 1,00$) (Tabela 3). Do mesmo modo a taxa intrínseca de crescimento populacional ou a capacidade inata de aumentar em número (r_m) não se diferenciou entre os tratamentos ($T = 0,09$; g.l. = 2, 48; $p < 1,00$) (Tabela 3). A exposição a CL₂₅ de *A. versicolor* também não causou diferenças significativas entre insetos expostos e não expostos na razão finita de aumento populacional (λ), que corresponde ao número de vezes que a população multiplica em uma unidade de tempo ($T = 0,12$; g.l. = 2, 48; $p < 1,00$) e no tempo que a população leva para duplicar em número ($T = 0,10$; g.l. = 2, 48; $p < 1,00$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros de crescimento populacional de *Brevicoryne brassicae* expostos e não expostos a CL₂₅ ($0,32 \times 10^3$ confídios.mL⁻¹) de *A. versicolor*

Insetos	R₀	T	r_m	λ	TD
Não tratados	8,86 ± 0,55	2,90 ± 0,18	0,75 ± 0,04	2,12 ± 0,13	0,92 ± 0,05
Tratados	7,31 ± 0,69	2,74 ± 0,25	0,73 ± 0,04	2,07 ± 0,08	0,95 ± 0,05
Valor de <i>T</i>	1,39 ^{ns*}	0,24 ^{ns*}	0,09 ^{ns*}	0,12 ^{ns*}	0,10 ^{ns*}
Valor de <i>p</i>	0,22	1,00	1,00	1,00	1,00

*Não significativo a 5%.

4 DISCUSSÃO

Entre os cinco isolados avaliados, um foi identificado como *Aspergillus versicolor* e dois como *Aspergillus sydowii*. O gênero *Aspergillus* tem mais de 180 espécies (HENRY *et al.*, 2000), com muitas possuindo potencial para descoberta de novos compostos (NIELSEN & SMEDSGRAARD, 2003; TRISUWAN *et al.*, 2011). *A. versicolor* é relatado por possuir ação inseticida (COLE & ROLINSON, 1972), sendo considerado um promissor agente de controle (ZAIN *et al.*, 2014). Do mesmo modo *A. sydowii* apresenta propriedades entomopatogênicas (PEREIRA *et al.*, 2009; WEISS *et al.*, 2014) e alguns de seus metabólitos são utilizados para degradar pesticidas (HASAN, 1999; ORTEGA *et al.*, 2011).

O gênero *Trichoderma* é empregado no controle de patógenos vegetais (TARUS *et al.*, 2003; SHARMA *et al.*, 2011), sendo o fungo *T. harzianum* considerado o mais eficaz agente de biocontrole (KEXIANG *et al.*, 2002). Além disso, possui ação nematicida (SHARON *et al.*, 2001; POURJAM *et al.*, 2015) e inseticida (JASSIM *et al.*, 1990; SHAKERI & FOSTER, 2007; FERNANDES *et al.*, 2010, ABDUL-WAHID & ELBANNA, 2012).

Fungos do gênero *Penicillium* são fontes de vários metabólitos (KOZLOVISKII *et al.*, 2013). Para agricultura, *P. dipomyicola* é importante pela produção de patulina, uma micotoxina nociva ao homem encontrada no suco de maçã devido a frutas contaminadas (FRISVAD *et al.*, 2004). Apesar de não haver relatos sobre a ação inseticida de *P. dipomyicola*, é possível que ocorra mortalidade não significativa devido a produção de metabólitos secundários.

A alta mortalidade causada por *A. versicolor* pode estar associada a produção de um alcalóide (SOUTHON & BUCKINGHAM, 1989). Methyl (+) - α - (methylsuccinimido) acrylate é um metabólito secundário com propriedades inseticida, denominado versimide (BROWN, 1970). Os alcalóides são um dos mais diversificados grupos com propriedades toxicológicas. Além do versimide, outros alcaloides produzidos por fungos possuem atividade inseticida (PAN *et al.*, 2014), entretanto devido a diversidade estrutural podem ocorrer diferentes efeitos sobre insetos (RIEDEL *et al.*, 1991) como ação de choque, fagodeterrência, redução do crescimento e desenvolvimento (KURIYAMA *et al.*, 2004; RIEDEL *et al.*, 1991; POPAY *et al.*, 2009). Descrito como um novo inseticida de contato (ZAIN *et al.*, 2014), versimide causou 100% de mortalidade de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), entretanto não foi um eficiente larvicida

para *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) (Cole e Rolinson, 1972). Em levantamentos de fungos associados a *Paratrechina longicornis* (Hymenoptera: Formicidae) foi verificada a presença de *A. versicolor* em cadáveres, entretanto não foi investigada a relação hospedeiro-patógeno, mas há a possibilidade de *A. versicolor* ser um potencial candidato para controle de *P. longicornis* (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Embora *A. versicolor* possua um alcalóide com reconhecida ação contra insetos, fungos podem possuir outros metabólitos com propriedades inseticidas. Nesse contexto, uma lactona produzida por *A. versicolor* causou uma mortalidade superior a 70% em coleópteros (CARVALHO *et al.*, 2001). As lactonas com ação inseticida são compostos bioativos produzidos por muitos fungos entomopatogênicos, sendo a destruxina a mais estudada (ROBERTS & KRASNOFF, 1988). Além da atividade inseticida, lactonas entomopatogênicas podem atuar como imunodepressoras (CERENIUS *et al.*, 1990) e ativar os canais de cálcio dos músculos dos insetos (SAMUELS *et al.*, 1988). Deste modo, fungos entomopatogênicos podem produzir diversos metabólitos que podem atuar em conjunto para o sucesso do patógeno, como na dissolução da cutícula, supressão do sistema imunológico e conversão de tecidos em nutrientes (ALVES, 1998). Assim, é possível a interação de diferentes metabólitos com propriedades inseticidas, como alcaloides e lactonas, justificando a elevada mortalidade de afídeos causada por *A. versicolor* neste trabalho.

A ausência de diferenças entre *A. versicolor* e os inseticidas microbianos na mortalidade de afídeos pode indicar o potencial entomopatogênico deste fungo. Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* possuem como hospedeiros mais de mil espécies de insetos pertencentes a mais de cinquenta famílias (HUMBER, 2008), sendo utilizados como eficientes inseticidas em todo o mundo (FARIA & WRAIGHT, 2007). Sobre *B. brassicae* a ação inseticida de *B. bassiana* e *M. anisopliae* é amplamente reportada (ALMEIDA *et al.*, 2007; DERAKHSHAN *et al.*, 2007; FARAG, 2008; ASI *et al.*, 2009a; ASI *et al.*, 2009b; AKMAL *et al.*, 2013; AKBARI *et al.*, 2014), com o processo de infecção superando diversas defesas físico-químicas do inseto (GIBSON *et al.*, 2014). O fato de *A. versicolor* ter apresentado uma mortalidade semelhante a causada por Bovemax[®] e Methamax[®] nas concentrações de 10^5 e 10^9 conídios.mL⁻¹ pode ser um indicativo do seu potencial como agente de controle biológico, sendo que *A. versicolor* causou mais mortalidade que Methamax[®] em avaliações com 24h para concentração de 10^9 esporos.mL⁻¹.

A CL_{50} de *A. versicolor* ($16,43 \times 10^3$ conídios.mL⁻¹) é um indicativo de sua toxicidade. Em trabalhos com *B. bassiana* foram obtidas CL_{50} de 2,04 e $6,28 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹ para adultos de *B. brassicae* (AKMAL *et al.*, 2013; AKBARI *et al.*, 2014). Para *M. anisopliae* foram estimadas CL_{50} de 3,48 e $5,30 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹ sobre *B. brassicae* (ASI *et al.*, 2009b). Apesar destas CL s serem superiores a estimada neste trabalho, destaca-se que a diferença entre a CL_{50} obtida para *A. versicolor* e as descritas em literatura para *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre *B. brassicae* estão associadas a diferentes condições experimentais, fase de desenvolvimento do inseto e protocolos de bioensaio. O fato de *A. versicolor* apresentar uma baixa CL_{50} e causar uma mortalidade similar a inseticidas formulados a partir de *B. bassiana* e *M. anisopliae* pode indicar a sua exploração como promissora, corroborando com Flannagan *et al.* (2011) que descrevem *A. versicolor* como potencial para o desenvolvimento de novos produtos para controle de pragas agrícolas.

Não foram observados efeitos subletais sobre parâmetros biológicos de *B. brassicae* expostos a CL_{25} de *A. versicolor*. Uma provável justificativa pode ser atribuída a CL_{25} ($0,32 \times 10^3$ conídios.mL⁻¹) apresentar um baixo inóculo. Efeitos subletais do fungo *Leptolegnia chapmanii* sobre *Aedes aegypti* só ocorreram de uma concentração de $2,2 \times 10^6$ zoosporos.mL⁻¹ sobre imaturos, gerando adultos com a locomoção e oviposição comprometidas (PELIZZA *et al.*, 2013). Percevejos *Lygus hisperus* expostos a CL_{10} , CL_{50} e CL_{90} de *B. bassiana* tiveram a alimentação e oviposição afetada apenas pela CL_{90} ($1,34 \times 10^7$ conídios.mL⁻¹) (NOMA & STRICKLER, 2000). Os afídeos *Metapolophium dirhodum* e *Rhopalosiphum padi* expostos a três concentrações de *M. anisopliae* tiveram sua fecundidade e r_m reduzidas apenas pela maior concentração do fungo ($1,0 \times 10^7$ conídios.mL⁻¹) (MURERWUA *et al.*, 2014). Outra hipótese para a ausência de diferença nos parâmetros biológicos de *B. brassicae* infectados e não infectados por *A. versicolor* está ligada a manutenção ou incremento reprodutivo de insetos em resposta ao baixo nível de infecção (BLANFORD & THOMAS, 2001), justificando a ausência de diferenças na taxa líquida de reprodução (R_0), taxa intrínseca de crescimento populacional (r_m) e a razão finita de aumento populacional (λ).

Os resultados apresentados por *A. versicolor* fazem deste isolado marinho um candidato promissor para o controle biológico de pragas agrícolas. A mortalidade de afídeos similar à registrada para *B. bassiana* e *M. anisopliae* e a baixa CL_{50} são indicativos do potencial deste fungo. Neste contexto, fungos marinhos são considerados fonte de novos metabólitos secundários biologicamente ativos (NAMIKOSHI *et al.*, 2002; JENSEN & FENICAL, 2000; ANKE & ERKEL

2002; BIABANI & LAATSCH, 1998; SAMUEL *et al.*, 2011) e possivelmente muitos com propriedades entomopatogênicas que podem originar novos inseticidas (ZAIN *et al.*, 2014).

Estas linhagens marinhas, coletadas em um ambiente hostil como oceanos podem apresentar vantagens sobre aquelas de ambiente terrestre. Estes fungos se desenvolvem em condições extremas de salinidade, nutrição, alta pressão, radiação UV e temperatura, competindo com outros fungos, bactérias e vírus, fazendo com que possam ter desenvolvido metabolitos secundários diferenciados dos encontrados em fungos terrestres (PORSANI *et al.*, 2013; ZAIN *et al.*, 2014). Estas características podem atribuir a fungos marinhos vantagens sobre fungos terrestres, destacando-se uma possível manutenção de sua patogenicidade por um maior período em um ambiente hostil como o agrícola, onde o fungo está exposto a vários fatores que podem comprometer sua eficiência.

REFERÊNCIAS

ABDUL-WAHID, O. A.; ELBANNA, S. M. Evaluation of the insecticidal activity of *Fusarium solani* and *Trichoderma harzianum* against cockroaches; *Periplaneta americana*. **African Journal of Microbiology Research**. v. 6, n. 5, p. 1024-1032, 2012.

AHAMAD, M.; AKHATAR, S. Development of insecticide resistance in field populations of *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae) in Pakistan. **Journal Economic Entomology**. v. 106, n. 2, p. 954 -958, 2013.

AHAMAD, M.; ASLAM, M. Resistance of Cabbage Aphid, *brevicoryne brassicae* (Linnaeus) to Endosulfan, Organophosphates and Synthetic Pyrethroids. **Pakistan Journal of Zoology**. v. 37, n. 4, p. 293 – 295, 2005.

AKBARI, S.; SAFAVI, S. A.; GHOSTA, V. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Blas.) Vuill. against cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* L. (Hem.: Aphididae) in laboratory condition. **Archives Of Phytopathology And Plant Protection**. v. 47, n. 12, p. 1454 – 1458, 2014

AKMAL, M.; FREED, S.; MALIK, M. N.; GUL, H. T. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycetes) against deferente aphids species under laboratory conditions. **Pakistan Journal Zoology**. v. 45, n. 1, p. 71-78, 2013

ALMEIDA, G. D.; PRATISSOLI, D.; POLANCZYK, R. A.; HOLTZ, A. M.; VICENTINI, V. B. Determinação da concentração letal média (CL₅₀) de *Beauveria bassiana* para o controle de *Brevicoryne brassicae*. **IDESIA**. v. 25, n. 2, p. 69-72, 2007

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano**, 2º edição, FEALQ, 1663p. 1988.

ANDREWARTHA, H. G.; BIRCH, L. C. The innate capacity for increase in numbers, p. 35-54. In: ANDREWARTHA, H. G.; BIRCH, L. C. (eds). **The distribution and abundance of animals**. Chicago, University of Chicago Press, 782 p.

ANKE, T.; ERKEL, G. Non- β -lactam antibiotics. In: **Osiewaczitor**. The Mycota. Industrial Applications. Vol. 10. Berlin: Springer-Verlag; 2002. p. 93-108

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos, 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>
Consultado em: 05/02/2015

ARX, J. A. **The Genera of fungi sporulation in pure culture**. 2 ed. J. Cramer, Vanduz, Germany, 1974.

ASI, M. R.; BASHIR, M. H.; MIRZA, J. H.; AFZAL, M.; IMRAN, S. In vitro efficacy of entomopathogenic fungi against cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* L. **Pakistan Entomology**. v. 31, n. 1, p. 43-47, 2009^a.

ASI, M. R.; BASHIR, M. H.; AFZAL, M.; IMRAN, S. Effect of conidial concentration of entomopathogenic fungi on mortality of cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* L. **Pakistan Journal Science**. v. 2 p. 175-180, 2009^b.

BARNETT H. C.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Burgess Publications, Minneapolis, p. 218, 1987.

BARTON, B. T.; IVES, A. R. Direct and indirect effects of warming on aphids, their predators and ants mutualists. **Ecology**. v. 95, p. 1479 – 1484, 2014.

BIABANI, M.A. AND LAATSCH, H. Advances in chemical studies on low-molecular weight metabolites of marine fungi. **Journal für Praktische Chemie**. v. 340, 589-607, 1998.

BLANFORD, S.; THOMAS, M. Adult survival, maturation, and reproduction of the desert locust *Schistocerca gregaria* infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 78, p. 1-8, 2001

BROWN, A. G. Versimide, a Metabolite of *Aspergillus versicolor*. **Journal Chemistry Society**. p. 2572-2573, 1970

BUTT, T. M.; IBRAHIM, L.; CLARK, S. J.; BECKETT, A. The germination behaviour of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. **Mycological Research**. v.99, n. 8: 945-950, 1995.

CARVALHO, M. R.; BARBOSA, L. C. A.; QUEIRÓZ, J. H.; HOWARTH, O. W. Novel lactones from *Aspergillus versicolor*. **Tetrahedron Letters**. v. 42, p. 809-811, 2001

CERENIUS, L. P. O.; THORNQVIST, A.; VEY, M.; JOHANSSON, W.; SODERHALL, K. The effect of the fungal toxin destruxin E on isolated crayfish hemocytes. **Journal of Insect Physiology**. v. 36, p. 785-790, 1990

COBBE, R. V.; JABUONSKI, R. E. A importância econômica e social das plantas olerícolas. In: Ferreira, M. E.; Castellane, P. D.; Cruz, M. C. P. (Eds.). **Nutrição e adubação de hortaliças**. Piracicaba: POTAFOS, 1993, P. 1-14.

COLE, M.; ROLINSON, G. N.; Microbial metabolites with insecticidal properties. **Applied Microbiology**. v. 24, n. 4, p. 660-662, 1972

COSTA, M. T. P. M.; RESENDE, L. M. A. Algumas estatísticas sobre brássicas em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v. 9, n. 98, p. 3-10, 1983

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J. **Atlas of Clinical Fungi**. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 2004.

DERAKHASHAN, A.; RABINDRA, R. J.; RAMANUJAM, B. Efficacy of diferente isolates of entomopathogenic fungi against *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus) at deferente temperatures and humidities. **Journal of Biological Control**. v. 2, n. 1, p. 65-72, 2007

DIONISI, H. M.; LOZADA, M.; OLIVEIRA, N. L. Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 44, p. 49-60, 2012.

DUNCAN, K.; HALTLI, B.; GILL, K. A.; KERR, R. G. Bioprospecting from Marine Sediments of New Brunswick, Canada: Exploring the Relationship between Total Bacterial Diversity and Actinobacteria Diversity. **Marine Drugs**. v. 12, p. 899-925, 2014.

ELLIS, M. B. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. CAB International Mycological Institute, Kew, UK. 507pp, 1976.

ELLIS, P. R.; PINK, D. A. C.; PHELPS, K.; JUKES, P. L.; BREEDS, S. E.; PINNEGAR, A. E. Evaluation of a core collection of *Brassicaceae Oleraceae* accession for resistance to *Brevicoryne brassicae* the cabbage aphid. **Euphytica**. v. 103, p. 149 – 160, 1998.

FARAG, N. A. Impacto f entomopathogenic fungi on the aphid, *Brevicoryne brassicae* L. and its associated predator, *Coccinella undecimpunctata* L. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**. v. 18, n. 2, p. 297-301, 2008

FARIA, N. R.; WRAIGHT, S. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**. v. 43, p. 237-256, 2007

FELING, R.H.; BUCHAN, G.O.; MINCER, T.J.; KAUFFMAN, C.A.; JENSEN, P.R.; FENICAL, W. Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. **Angewandte Chemie**. v. 42, p. 355–357, 2013.

FERERES, A.; MORENO, A. Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. **Virus Research**. v. 141, p. 158 -168, 2009.

FERNANDES, E. G.; DURÃES, L. D. S.; BORGES, M. A. Z.; VALÉRIO, H. M. Isolamento e seleção de fungos para controle de larvas de terceiro instar de *Musca domestica*. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**. v. 77, n. 2, p. 317 – 322, 2010.

FILGUEIRA, F.A.R. Brassicaceas – couves e plantas relacionadas, p. 279-299. In F.A.R. Filgueira (ed.), **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3ed. Viçosa, Editora UFV, 421p, 2008.

FLANNAGAN, R.; HERRMANN, R.; PRESNAIL, J.; TOROK, T.; YALPANI, N. **Microbial diversity-based novel crop protection products**. Disponível em: <http://escholarship.org/uc/item/58p4w4p8> Consultado em:13/01/2015.

FOURNIER, V.; BRONDEUR, J. Dose-Response Susceptibility of Pest Aphids (Homoptera: Aphididae) and their Control on Hydroponically Grown Lettuce with the Entomopathogenic Fungus *Verticillium lecanii*, Azadirachtin, and Insecticidal Soap. **Environmental Entomology**. v. 29, n. 3, p. 568 – 578, 2000.

FRISVAD, J. C.; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T. O.; SAMSON, R. A. Mycotoxins, drugs and others extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Studies in Mycology**. v. 49, p. 201-241, 2004

GALIMBERTI, R., A. KOWALCZUK, I. H. PARRA, M. G. RAMOS, AND V. FLORES. Cutaneous aspergillosis: a report of six cases. **British Journal of Dermatology**. v. 139, p. 522-526, 1998.

GIBSON, D.; DONZELLI, G. G.; KRASNOFF, B.; KEYHANI, O. Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. **Natural Product Reports**. v. 31, p. 1287-1305, 2014

GRIFFIN, R. P.; WILLIAMSON, J. **Cabbage, Broccoli & Other Cole Crop Insect Pests**. HGIC 2203, Home & Garden Information Center. Clemson Cooperative Extension. Clemson University, Clemson, SC, 2013.

GURULINGAPPA, P.; MCGEE, P. A.; SWORD, G. Endophytic *Lecanicillium lecanii* and *Beauveria bassiana* reduce the survival and fecundity of *Aphis gossypii* following contact with conidia and secondary metabolites. **Crop Protection**. v.30, p. 349-353, 2011.

HADDAD, M. L.; VENDDRAMIN, J. D. Comparação de porcentagens observadas com casos extremos de 0 e 100%. **Anais da sociedade entomológica do Brasil**, v. 29, n. 4, p. 835-837, 2000.

HASAN, H. A. H. Fungal utilization of organophosphate pesticides and their degradation by *Aspergillus flavus* and *A. sydowii* in soil. **Folia Microbiologica**. v. 44, p. 77 – 84, 1999.

HENRY, T.; IWEN, P.C.; HINRICHS, S. H. Identification of *Aspergillus* Species using internal transcribed spacer region 1 and 2. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, n. 4, p. 1510-1515, 2000

HODGSON, M. J.; MOREY, P.; LEUNG, W. Y.; MORROW, L.; MILLER, D.; JARVIS, B. B.; ROBBINS, H.; HALSEY, J. F.; STOREY, E. Building-associated pulmonary disease from exposure to *Stachybotrys chartarum* and *Aspergillus versicolor*. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**. v.40, p. 241-249, 1998.

HUGHES, C. C.; PRIETO-DAVO, A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. The marinopyrroles, antibiotics of an unprecedented structure class from a marine *Streptomyces* sp. **Organic Letters**. v. 10, p. 629–631, 2008.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia médica – Texto e Atlas**. 2 ed. Editorial Premier, São Paulo, 1999.

HUMBER, R. A. Evolution of entomopathogenicity in fungi. **Journal Of Invertebrate Pathology**. v. 98, p. 262-266, 2008

JASSIM, H.; FOSTER, H. A.; FAIRHURST, C. P. Biological control fo Dutch elm disease: Larvicidal activity of *Trichoderma harzianum*. *T. polysporum* and *Scylalidium lignicola* in *Scolytus scolytus* and *S. multistriatus* reared in artificial culture. **Annals of Applied Biology**. v. 117, p. 187-196, 1990.

JENSEN, P.R. AND FENICAL, W. Marine microorganisms and drug discovery: Current status and future potential. In: Fusetani N, editor. **Drugs from the Sea**. Basel: Karger. p. 6-29, 2000.

JENSEN, P.R.; WILLIAMS, P.G.; DONG-CHAN, O.; ZEIGLER, L.; FENICAL, W. Species-Specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, p. 1146–1152, 2007.

KEXIANG, G.; XIAOGUANG, L.; YONGHONG, L.; TIANBO, Z.; SHULIANG, W. Potential of *Trichoderma harzianum* and *T. atroviridae* to control *Botryosphaeria herengeriana* f. sp. *piricola*, the cause o apple ring rot. **Journal of Phytopathology**. v. 150, p. 271-276, 2002

KONEMAN, E. W.; ROBERTS, G. D. **Micologia Prática de Laboratório**. Editora Médica Panamericana, Buenos Aires, 1987.

KOZLOVSKII, A. G.; ZHELIFONOVA, V. P.; ANTIPOVA, T. V. Fungi of the genus *Penicillium* as producers of Physiologically active compounds (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 49, n. 1, p. 1-10, 2013

KURIYAMA, T.; KAKEMOTO, E.; TAKAHASHI, N.; IMAMURA, K.; OYAMA, K.; SUZUKI, E.; HARIMAYA, K.; YAGUCHI, T.; OZOE, Y. Receptor Assay-Guided isolation of anti-

GABAergic insecticidal alkaloids from a fungal culture. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v. 52, p. 3884-3887, 2004.

LARONE, D. H. **Medically important fungi: a guide to identification**. Elsevier, New York, 1987.

MA, J.; TONG, S. M.; WANG, P.; LIAO, H.; ZHANG, L. Insecticides activity of Camptothecin against *Nilaparvata lugens*, *Brevicoryne brassicae* and *Chilo suppressalis*. **Journal Economic Entomology**. v. 103, n. 3, p. 492 – 496, 2010.

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Produtos registrados no Brasil para Controle de *Brevicoryne brassicae* em olerícolas**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>. Consultado em: 05/02/2015.

MEYER, J. S.; IGERSON, C. G.; McDONALD, L. L.; BOYCE, M. S. Estimating uncertainty in populations growth rates: Jackknife vs Bootstrap Techniques. **Ecology**. v. 67, n. 1056 – 1166, 1986.

MILNER, R. J. Prospects for biopesticides for aphid control. **Entomophaga**. v. 42, p. 227 – 239, 1997

MONCIARDINI, P.; SOSIO, M.; CAVALLETTI, L.; CHIOCCHINI, C. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 42, p. 419-429, 2002.

MURERWA, P.; ARAMA, P. F.; KAMAU, A. W.; MANIANIA, N. K. Effect of infection by *Metarhizium anisopliae* isolate ICIPE 51 on developmental stage, fecundity and intrinsic rate of increase of *Rhopalosiphum padi* and *Metopolophium dirhodum*. **Journal of Entomology and Nematology**. v. 6, n. 11 p. 154-160, 2014.

NAMIKOSHI, M.; AKANO, K.; KOBAYASHI, H.; KOIKE, Y.; KITAZAWA, A.; RONDONOWU, A. B. Distribution of marine filamentous fungi associated with marine sponges in coral reefs of palau and bunaken island, Indonesia. **Journal of the Tokyo University of Fisheries**. v. 88, p. 15-20, 2002

NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography – UV – spectrometry methodology. **Journal of Chromatography**. v. 1002, p. 111 – 136, 2003.

NOMA, T.; STRICKLER, K. Effects of *Beauveria bassiana* on *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding and oviposition. **Environmental entomology**. v. 29, n. 2, p. 394-402, 2000

NOVO, M. C. S. S.; PRELA-PANTANO, A.; TRANI, P. E.; BLAT, S. F. Desenvolvimento e genótipo de couve manteiga. **Horticultura Brasileira**. v. 28, p. 321-325, 2010

OPFER, P.; MCGRATH, D. **Oregon vegetables, cabbage aphid and green peach aphid. Department of Horticulture**. Oregon State University, Corvallis, OR., 2013.

ORTEGA, S. N.; NITSHKE, M.; MOUAD, A. M.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Isolation of brasilian marine fungi capable of growing on DDD pesticide. **Biodegradation**. v. 22, n. 43 – 50, 2011

ORTEGA-MORALES, B. O.; CHAN-BACAB, M., J.; ROSA-GARCIA, S. C.; CAMACHO-CHAB, J. C. Valuable processes and products from marine intertidal microbial communities. **Current Opinion in Biotechnology**. v.21: 346–352, 2010.

PAN, J.; BHARDWAJ, M.; NAGABHYRU, P.; GROSSMAN, R. B.; SCHARDI, C. L. Enzymes from fungal and plant origin rrequired for Chemical diversification of insecticidal loline alkaloids in grass-epichloë symbiota. **PLoS ONE**. v. 9, n. 12, p. 1-19, 2014

PELIZZA, S. A.; SCORSETTI, A. C.; TRANCHIDA, M. C. The sublethal effects of the entomopathogenic fungus *Leptolegnia chapmanii* on some biological parameters of the dengue vector *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Science**. v. 13, p. 1-8, 2013

PELL, J. K.; PLUKE, R.; CLARK, S. J.; KENWARD, M. G. ALDERSON, P. G. Interactions between Two Aphid Natural Enemies, the Entomopathogenic Fungus *Erynia neoaphidis* Remaudière & Hennebert (Zygomycetes: Entomophthorales) and the Predatory Beetle *Coccinella septempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae). **Journal Of Invertebrate Pathology**. v. 69, p. 261–268, 1997.

PELL, J. K.; VANDERBERG, J. D. Interactions Among the Aphid *Diuraphis noxia*, the Entomopathogenic Fungus *Paecilomyces fumosoroseus* and the Coccinellid *Hippodamia convergens*. **Biocontrol Science and Technology**. v. 12, p. 217 – 224, 2002.

PENTEADO, S. R. C.; OLIVEIRA, E. B.; LAZARRI, S. M. N. **Tabvida: Sistema computacional para cálculo de parâmetros biológicos e de crescimento de populações de afídeos**. Séries documentos Embrapa Florestas, 2010.

PEREIRA, E. S.; SARQUIS, M. I. M.; FERREIRA-KEPPLER, R. L.; HAMADA, N.; ALENCAR, Y. B. Filamentous fungi associated with mosquito larvae (díptera: Culicidae) in municipalities of the brazilian amazona. **Neotropical Entomology**. v. 38, n. 3, p. 352-359, 2009

PONTOPPIDAN, B., HOPKINS, R., RASK, L., MEIJER, J. Infestation by cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) on oilseed rape (*Brassica napus*) causes a long lasting induction of the myrosinase system. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v. 109, n. 1, p. 55-62, 2003.

POPAY, A. J.; TAPPER, B. A.; PODMORE, C. Endophyte-infected meadow fescue and loline alkaloids affect Argentine stem weevil larvae. **New Zealand Plant Protection**. v. 62, p. 19–27, 2009.

PORSANI, M. V.; AMATUZZI, R. F.; OLIVEIRA, P. R.; BARATTO, L. C.; DALITZ, C. A.; BOZZA, A.; MARANGONI, P. R.; DALZOTO, P. R.; KOLM, H. E.; PIMENTEL, I. C. Antimicrobial potential off ungi and actinobactéria isolated from Sandy sediments of intertial regions. **International Journal of Pharmaceutial Chemical and Biological Sciences**. v. 3, n. 3, p. 899-913, 2013.

POURJAM, E.; KAMALI, N.; SAHEBANI, N. Elicitation of defense responses in tomato against *Meloidogyne javanica* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* wilth complex. **Journal of Crop Protection**. v. 4, n. 1, p. 29-38, 2015.

RIEDEL, W. E.; KIECKHEFER, R. E.; PETROSKI, R. J.; POWELL, R. G. Naturally-occurring and synthetic loline alkaloid derivatives – insect feeding-behavior modification and toxicity. **Journal of Entomological Science**. v. 26, p. 122–129, 1991.

ROBERTS, D. W.; DRASNOFF, S. B. Toxinas e enzimas de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano**, 2º edição, FEALQ, 1663p. 1988.

ROBERTSON, J. L.; RUSSELL, R. M.; PREISLER, H. K.; SAVIN, N. E. **Bioassays with Arthropods**, 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, FL, 2007.

RODRIGUES, A.; SOLIS, D. R.; FOX, E. G. P. PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. Preliminary list of microfungi found in *Paratrechina longicornis* (Hymenoptera: Formicidae). **Florida Entomologist**. v. 93, n. 4, p. 651 – 653, 2010

ROSSMAN, A. Y.; PALM, M.; SPIELMAN, L. J. **A literature guide for the identification of plant pathogenic fungi**. APS Press, St. Paul, 1987.

SAMUEL, P., PRINCE, L. AND PRABAKARAN, P. Antibacterial activity of marine derived fungi collected from South East Coast of Tamil Nadu, India. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**. v. 1, p. 86-94, 2011.

SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 61, p. 413 – 423, 2003.

SHAKERI, J.; FOSTER, H.A. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. **Enzyme and Microbial Technology**. v, 40, p. 961-968, 2007.

SHARMA, P.; VIGNESH KUMAR, P.; RAMESH, R.; SARAVANAN, K.; DEEP, S.; SHARMA, M. MAHESH, S.; DINESH, S. Biocontrol genes from *Trichoderma* species: A review. **African Journal Biotechnology**. v. 10, n. 86, p. 19898-19907, 2011

SHARON, E.; BAR-EYAL, M.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A.; KLEIFELD, O.; SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**. v. 91, n. 7, p. 687 – 693, 2001

SILVEIRA, V. D. **Micologia**. 5 ed. Âmbito Cultural, Rio de Janeiro. 1995.

SOUTHON, I. W.; BUCKINGHAM, J. **Dictionary of Alkaloids**. 2 ed. Chapman and Hall Ltda. Londres, 1989.

TARUS, P. K.; LANG'AT-THORUWA, C. C.; WANYONYI, A.W.; CHHABRA, S. C. Bioactive metabolites from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma Longibrachiatum*. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**. v. 17, n. 2, p. 185 – 190, 2003

THISUWAN, K.; RUKACHAISIRIKUL, V.; KAEWPET, M.; PHONGPAICHIT, S.; HUTADILOK-TOWATANA, N.; PREEDANON, S.; SAKAYOROJ, J. Sesquiterpene and Xanthone derivatives from the Sea Fan-derived Fungus *Aspergillus sydowii* PSU-F154. **Journal of Natural Products**. v. 74, n. 1663 – 1667, 2011

VICENTE, V. A. ; ATTILI-ANGELIS, D. ; PIE, M. R.; QUEIROZ-TELLES, F. ; CRUZ, L. M. ; NAJAFZADEH, M. J. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies Mycology**. v. 61, p. 137–44, 2008.

VU, V. H.; HONG, S. I.; KIM, K. Selection of Entomopathogenic Fungi for Aphid Control. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**. v. 104, n. 6, p. 498–505, 2007.

WEISS, K.; PARZEFALL, C.; HERZNER, G. Multifaceted defense against antagonistic microbes in developing offspring of the parasitoid wasp *Ampulex compressa* (Hymenoptera, Ampulicidae). **PLoS ONE**. v. 9, n. 6, p. 1-14, 2014.

ZAIN, M. E.; AWAAD, A. S.; AL-OTHMAN, M. R.; ALAFEEFY, A. M.; EL-MELLYGY, R. M. Biological activity of fungal secondary metabolites. **International Journal of Chemical and Applied Biological Sciences**. v. 1, n. 1, p. 14-22, 2014.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5 ed. Prentice Hall, 2009.

CAPÍTULO 2
IDENTIFICAÇÃO E POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICOS DE ACTINOBACTÉRIAS
ISOLADAS EM AMBIENTES MARINHOS

RESUMO

O pulgão-da-couve, *Brevicoryne brassicae*, é uma das principais pragas de brássicas, sendo controlado com pulverizações sistemáticas com inseticidas químicos. Uma alternativa ao controle químico é o uso de actinobactérias isoladas de organismos e ambientes terrestres. Microrganismos isolados em ambiente marinho, no entanto, também podem ser promissores no controle de pragas. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito dos isolados marinhos de actinobactérias, *Streptomyces variabilis*, *Streptomyces seoulensis*, *Streptomyces cavourensis*, *Streptomyces parvus* e *Streptomyces bacillaris* nos parâmetros de crescimento populacional, comportamento alimentar e mortalidade de *B. brassicae*. Foram utilizados isolados de actinobactérias de sedimento marinho coletados da região entre-marés da Ilha do Mel, Paraná (25°20'S – 48°20'W e 5°35' – 48°35'W). O isolado com maior mortalidade sobre *B. brassicae* foi caracterizado. *S. variabilis* apresentou maior toxicidade, com 100% de mortalidade em 96 horas. A CL₅₀ estimada para foi de $0,20 \times 10^7$ células.mL⁻¹, sendo que a CL₂₅ ($0,12 \times 10^6$ células.mL⁻¹) não afetou parâmetros de crescimento populacional de *B. brassicae*. No entanto estas concentrações reduziram significativamente (75%) a taxa de alimentação do pulgão, demonstrando um efeito na diminuição dos danos às plantas infestadas por ele. Estes resultados evidenciam o potencial de *S. variabilis* como promissor agente no controle biológico de pragas. Alia-se sua capacidade de desenvolvimento em ambientes extremos, com salinidade, pressão, radiação UV muito altas, variações grandes de temperatura e disposição de alimentos, que permite competir com outros microrganismos em relação ao ambiente agrícola, que também apresentam condições extremas.

Palavras-chave: Bioprospecção, Controle biológico, actinobactéria, *Brevicoryne brassicae*

CHAPTER 2
IDENTIFICATION AND ENTOMOPATHOGENIC POTENTIAL of ACTINOBACTERIA
ISOLATED IN MARINE ENVIRONMENTS

ABSTRACT

The cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*, is a major pest of brassica, being controlled with systematic spraying with chemical insecticides. An alternative to chemical control is the use of actinomycetes isolated from terrestrial environments. Microorganisms isolated from marine environment, however, can also be promising for the control of pests. In this sense, the objective of this paper was to evaluate the effect of marine isolates of actinomycetes, *Streptomyces variabilis*, *Streptomyces seoulensis*, *Streptomyces cavourensis*, *Streptomyces parvus* and *Streptomyces bacillaris* on the parameters of population growth, feeding behavior and mortality of *B. brassicae*. Were used actinomycetes isolated from marine sediment collected from the intertidal region of Ilha do Mel, Paraná (25°20'S - 48°20'W and 5°35' - 48°35'W). The isolate with higher mortality of *B. brassicae* was characterized. *S. variabilis* showed greater toxicity, with 100% mortality in 96 hours. The estimated LC₅₀ was $0,20 \times 10^7$ cells.mL⁻¹, and the LC₂₅ ($0,12 \times 10^6$ cells.mL⁻¹) did not affect parameters of increase of *B. brassicae*. However, there was a significantly reduction (75%) of the aphids feed rate, demonstrating an effect in reducing the damage to the plants infested by them. These results point *S. variabilis* as promising biological control of pests. Furthermore is their ability to grow in extreme environments, with salinity, pressure, UV radiation very high, large temperature fluctuations and provision of food, allowing compete with other microorganisms in relation to the agricultural environment, which also feature extreme conditions.

Keywords: Bioprospecting, biological control, actinobacteria, cabbage aphid

1 INTRODUÇÃO

O pulgão-da-couve, *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera, Aphididae) se alimenta de seiva elaborada, sendo suas hospedeiras preferenciais as plantas da família Brassicaceae (GABRYS *et al.*, 1997), com destaque para a couve-manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*). Os danos primários são devido a alimentação, causando o esmaecimento e amarelamento (OPFER & MCGRATH, 2013). Além do dano direto, os afídeos produzem *honeydew* que favorece o desenvolvimento de fungos sobre as folhas, diminuindo a taxa de fotossíntese da planta (ASI *et al.*, 2009). Segundo Kumar & Chapman (1984), o pulgão também causa danos secundários pela inoculação de vírus presentes em sua saliva. Razaq *et al.* (2011) estimam que haja uma perda de até 80% dos cultivos de brássicas somente pela ação de *B. brassicae*. No Brasil o controle desta praga é feito com pesticidas de amplo espectro, como neonicotinoides, piretroides e organofosforados (MAPA, 2014).

O controle químico de *B. brassicae* é feito com produtos com alta toxicidade, que afetam seus inimigos naturais (BACCI *et al.*, 2009). A aplicação indevida de pesticidas leva a contaminação do solo, lençol freático e presença de resíduos nas plantas (EL-KHAWAGA & MEGAHED, 2012), posicionando a couve-manteiga em oitavo lugar na lista dos produtos agrícolas com maiores índices de resíduos (ANVISA, 2011). Outro fator importante, observado por Ahmad e Akhtar (2013), é a seleção de populações resistentes a inseticidas. Uma das alternativas para minimizar os impactos decorrentes do uso de inseticidas químicos é o emprego do controle biológico.

O controle biológico de pragas é feito pelo uso de predadores, parasitoides e microrganismos. Entre os microrganismos, destacam-se fungos, bactérias e vírus, sendo as actinobactérias as bactérias com maior potencial de controle, caracterizadas pela produção de metabólitos secundários com atividades antibióticas e inseticidas (DOUMBOU, 2001). Cerca de 60% dos inseticidas que chegaram ao mercado nos últimos anos foram sintetizados a partir destes metabólitos (EL-KHAWAGA & MEGAHED, 2012), como o inseticida Spinosad derivado de extratos de *Saccharopolyspora spinosa*. Entre as actinobactérias, o gênero *Streptomyces* possui maior destaque, representando 55% da produção de todos os antibióticos no mercado, e ainda possui ação inseticida reconhecida (PRASHITH KEKUDA, SHOBHA & ONKARAPPA, 2010).

A maioria das actinobactérias utilizadas no controle de pragas são isoladas do solo ou de plantas (QIN *et al.*, 2011). Entretanto, Liu *et al.* (2008), descreveram um isolado de *Streptomyces* extraído de sedimento marinho que apresentou atividade inseticida contra *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). A região entre marés, por apresentar características extremas, como ciclo de marés, temperatura, radiação UV, salinidade e disposição de nutrientes levou ao desenvolvimento de microrganismos com fisiologia particular, principalmente quanto aos metabólitos secundários produzidos (ORTEGA-MORALES *et al.* 2010).

No estudo de Porsani *et al.* (2013), foi avaliada a atividade antimicrobiana de isolados de fungos e actinobactérias derivados de sedimento marinho, oriundos da Ilha do Mel, PR-Brasil. De 60 fungos e 116 actinobactérias avaliados, 35 e 79 respectivamente, apresentaram atividade inibitória no crescimento de *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Neste contexto, no presente trabalho avaliou-se o potencial de cinco isolados de actinobactérias, no controle de *B. brassicae*, identificou-se qual gerou maior taxa de mortalidade, definiu-se a concentração letal média; bem como testaram-se os efeitos do isolado bacteriano, em diferentes concentrações, nos parâmetros populacionais e no comportamento alimentar de *B. brassicae*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CRIAÇÃO DE *Brevicoryne brassicae*

A criação estoque de *B. brassicae* foi estabelecida por meio de coleta de afídeos em plantas da família Brassicaceae de áreas produtoras de hortaliças de Curitiba, PR. Os insetos foram transportados ao laboratório onde passaram por triagem, e foram transferidos para couve-manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) cultivadas em vasos mantidas em condições controladas (Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; fotofase: 14 horas e UR: $70 \pm 10\%$). Lâminas de exemplares adultos foram confeccionadas para confirmação da espécie.

2.2 ACTINOBACTÉRIA E MEIOS DE CULTURA

Foram utilizados os isolados de actinobactérias de sedimento marinho coletados da região entre-marés da Ilha do Mel, Paraná ($25^\circ 20' \text{S} - 48^\circ 20' \text{W}$ e $25^\circ 35' - 48^\circ 35' \text{W}$) (PORSANI *et al.*, 2013). Estes isolados foram cultivados em placas Petri com meio Czapek Dox (**Quadro 1**), e Czapeck Dox com adição de água salina à água destilada, na razão de 1:2, por sete dias em estufa B.O.D. à 35°C .

Quadro 1 – Produtos utilizados no preparo de 1000 mL do meio Czapeck (pH a 25°C : $3 \pm 0,2$).

Produto	Quantidade (gramas)
Sacarose	30,0
Nitrato de Sódio	3,0
Fosfato Dipotássio	1,0
Sulfato de Magnésio	0,5
Cloreto de Potássio	0,5
Sulfato Ferroso	0,01
Ágar	15,0

2.3 SELEÇÃO DA ACTINOBACTÉRIA COM MAIOR POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO

Segundo a metodologia proposta por Melatti *et al.* (2008), os isolados de *Streptomyces seoulensis*, *S. bacillaris*, *S. cavourensis*, *S. variabilis* e *S. parvus* foram selecionados para este bioensaio. A escolha destes isolados foi devido à alta capacidade inibitória destas actinobactérias sobre as linhagens patogênicas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (PORSANI *et al.*, 2013).

As suspensões bacterianas foram preparadas a partir da raspagem das colônias sobre meio de cultura Czapeck Dox utilizando uma espátula metálica esterilizada. A concentração de células foi feita empregando-se a Escala de McFarland, ajustada em 3×10^9 células.mL⁻¹ para os cinco isolados de actinobactéria. Devido a hidrofobicidade das células, as suspensões receberam espalhante adesivo Tween 80® (0,01%).

Para o *screening* da actinobactéria com efeito inseticida foram empregadas ninfas com até 48h de idade. Como alimento foram fornecidas folhas provenientes de plântulas de couve previamente desinfetadas com etanol 70% por 1 min, seguido de hipoclorito de sódio (0,5%) por 1 min, sendo enxaguadas com água destilada esterilizada duas vezes e mantidas por uma hora em ambiente protegido e ventilado até a secagem. Após a secagem das plântulas de couve, folhas com pecíolos foram destacadas, tendo seus pecíolos imersos em um tubo de penicilina (10 mL) contendo 5mL de cada uma das diferentes suspensões de actinobactérias (Figura 1A). Posteriormente, com o auxílio de um microscópio estereoscópio e pincel de cerdas finas, foram transferidas para cada folha dez ninfas de *B. brassicae*. As folhas infestadas foram acondicionadas em potes plásticos com tampas perfuradas e vedadas com tecido *voil* e mantidas em condições controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotofase: 14 horas e UR: $70 \pm 10\%$) (Figura 1B).

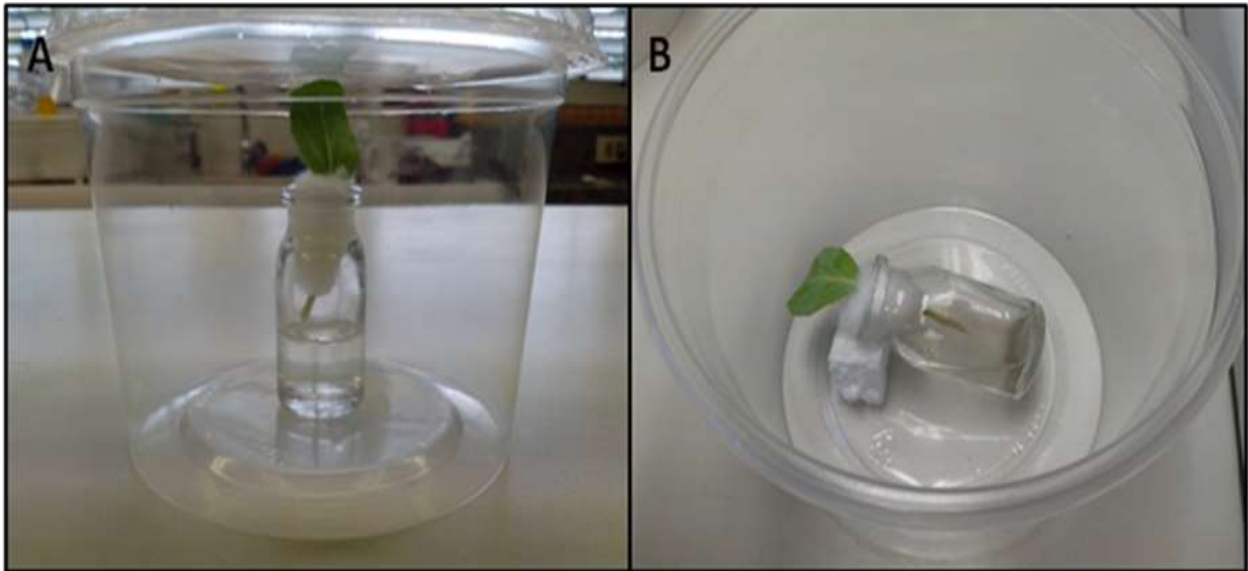


Figura 1 – Folhas de couve-manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) mantidas com o pecíolo imerso em soluções com diferentes concentrações de actinobactérias. **A:** Vedação do frasco de vidro com solução pronta. **B:** Posição das folhas com ninfas de *B. brassicae* no interior dos recipientes plásticos. Fonte: Autor (2014).

As avaliações de mortalidade foram realizadas em intervalos de 24h, durante cinco dias. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico, as ninfas eram vistoriadas e os insetos mortos eram individualizados em placas de Petri estéreis contendo algodão umedecido com água destilada esterilizada para favorecer o desenvolvimento do micélio externo.

Os bioensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, sendo que para cada tratamento foram realizadas seis repetições. Cada repetição foi formada por uma folha de couve inoculada com 10 ninfas de *B. brassicae* com até 48h de idade.

2.4 ESTIMATIVA DA LINHA DE CONCENTRAÇÃO RESPOSTA

A estimativa da linha de concentração resposta da actinobactéria com maior efeito inseticida (*S. variabilis*) foi realizada através do emprego de bioensaios descritos no Item 2.3. Foram utilizadas ninfas com até 48h de idade, obtidas conforme metodologia descrita anteriormente (Item 2.1). Foram utilizadas seis concentrações do isolado (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e

10^9 células.mL⁻¹) que proporcionaram uma mortalidade entre 5 e 95% das ninfas. Estas suspensões bacterianas foram preparadas a partir da raspagem das colônias sobre meio de cultura Czapeck Dox utilizando uma espátula metálica esterilizada. A concentração de células foi feita com comparação com a Escala de McFarland, ajustada em 3×10^9 células.mL⁻¹. Esta suspensão foi diluída serialmente, nas concentrações de 3×10^4 a 10^8 células.mL⁻¹ com *Tween 80*[®] (0,01%).

As avaliações de mortalidade foram realizadas em intervalos de 24h, durante cinco dias. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico, as ninfas eram vistoriadas e os insetos mortos eram individualizados em placas de Petri estéreis contendo algodão umedecido com água destilada esterilizada para favorecer o desenvolvimento do micélio externo.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Além das diferentes concentrações da actinobactéria foi empregado um controle formado por água destilada esterilizada. Para cada concentração foram realizadas cinco repetições. Cada repetição foi formada por quatro placas de Petri com dez ninfas de 48h de *B. brassicae*.

2.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS LETAL E SUBLETAL

Para avaliação do efeito letal e subletal do isolado bacteriano selecionado (*S. variabilis*) mudas de couve com 10 cm de altura foram lavadas em etanol 70% por 1 min, seguido de hipoclorito de sódio (0,5%) por 1 min, sendo enxaguadas com água destilada esterilizada duas vezes e mantidas por uma hora em ambiente protegido e ventilado até a secagem. Após a secagem das mudas deixou-se até duas folhas tenras por planta. Estas plantas foram transferidas para recipientes de vidro (20 mL) contendo 15 mL da suspensão com actinobactérias na concentração de $0,12 \times 10^6$ células.mL⁻¹ (CL₂₅) (Figura 2A), de modo que o sistema radicular permanecesse imerso nesta suspensão (Figura 2B).

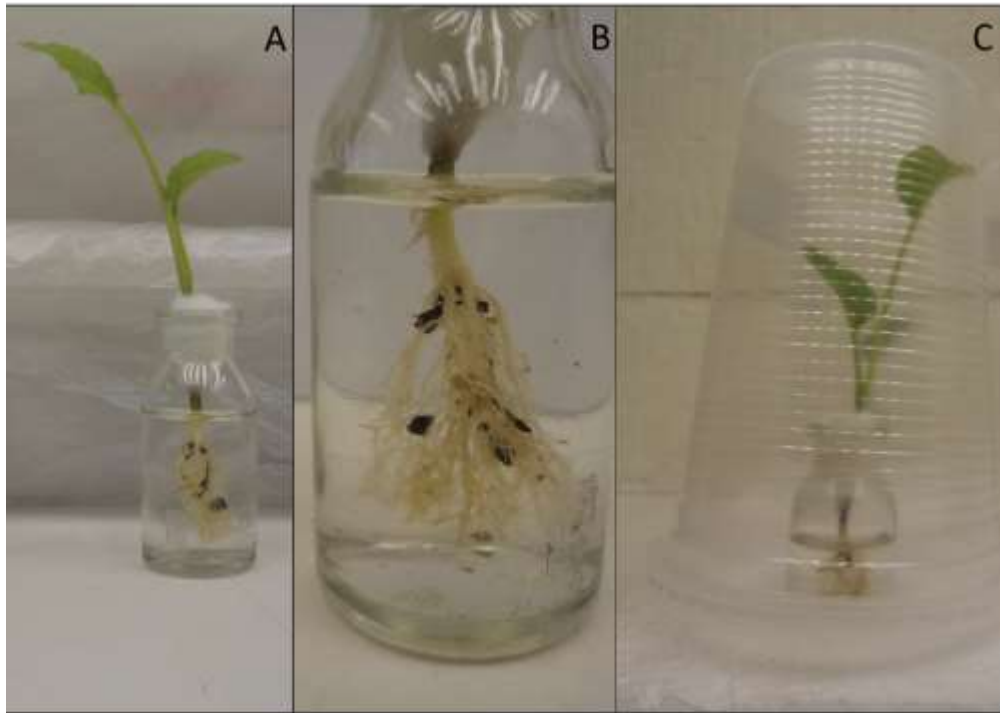


Figura 2 – Plântulas de couve-manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) utilizada para avaliação do efeito letal e subletal da actinobactéria *S. variabilis* sobre *Brevicoryne brassicae*. **A:** Planta imersa em suspensão com actinobactéria (CL₂₅). **B:** Sistema radicular imerso na suspensão de actinobactérias. **C:** Gaiola plástica utilizada para isolamento da planta e do afídeo. Fonte: Autor (2014).

Posteriormente foi transferido um adulto de *B. brassicae* para cada planta, sendo esta isolada por meio de uma gaiola plástica telada (Figura 2C). As plantas com os afídeos foram mantidas em condições controladas por 24h (temperatura: $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: 70% e fotofase de 14h). Após este período foram vistoriadas, deixando-se apenas uma ninfa de 24h de idade por planta. Além das plantas mantidas na solução de actinobactérias (CL₂₅) foi empregado um controle onde as plantas permaneceram com o sistema radicular imerso em água destilada esterilizada.

As vistorias foram feitas diariamente até a morte do inseto. Durante a avaliação era verificado o número e duração dos instares, determinados pela observação, em microscópio estereoscópio (aumento de 32 x) com a coleta das exúvias. Na fase adulta, procedeu-se à contagem da produção diária de ninfas, com sua posterior retirada da folha, permanecendo apenas o adulto. Os parâmetros biológicos avaliados foram: número e duração de cada estágio ninfal; duração do

período ninfal; porcentagem de sobrevivência do estágio ninfal; duração dos períodos pré-reprodutivo, reprodutivo e pós-reprodutivo; longevidade; fertilidade diária e total; duração do ciclo de vida e viabilidade. Durante as vistorias os frascos eram verificados, e havendo necessidade, o nível de água ou suspensão com actinobactérias era complementado.

Com estes resultados foi confeccionada uma tabela de vida de fertilidade para avaliar o efeito da actinobactéria *S. variabilis* sobre parâmetros biológicos de *B. brassicae*, sendo calculados: Taxa líquida de reprodução (**R₀**), ou seja, o total de descendentes fêmeas produzidas por fêmea, durante todo o período de reprodução, que chegam à geração seguinte; T tempo médio de cada geração (**T**), ou a duração média de uma geração; Taxa intrínseca de crescimento populacional ou a capacidade inata de aumentar em número (**r_m**); Razão finita de aumento populacional, ou seja, o número de vezes que a população aumenta em um determinado intervalo de tempo (**λ**) e o tempo que leva a população para duplicar em número (**TD**).

Para cada tratamento foram realizadas 30 repetições, sendo cada repetição formada por uma planta de couve infestada com uma ninfa de *B. brassicae*.

2.6 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR

A ação de *S. variabilis* sobre o comportamento alimentar de *B. brassicae* foi avaliada pela excreção de honeydew. Para isso mudas de couve foram higienizadas segundo a metodologia anteriormente descrita (Item 2.5) e acondicionadas em recipientes de vidro contendo soluções ajustadas a $1,5 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^9$ células.ml⁻¹ de *S. variabilis*. Após 24h uma folha foi selecionada, sendo as demais eliminadas e sobre a parte abaxial desta folha foi feita uma arena com cola entomológica (Tanglefoot®), sendo posteriormente transferido dois afídeos adultos, deixados sem alimentação por uma hora.

As plantas com os afídeos foram posicionadas horizontalmente em suportes para que a face abaxial ficasse sobre discos de papel filtro (11 cm ø) impregnados com uma solução contendo 3mL de ácido acético, 10 mL de n-butanos e 0,3g de ninhidrina (MITTLER, 1958). Essa solução colore o aminoácido presente no honeydew excretado por insetos. Os discos de papel filtro foram montados sobre relógios analógicos (COSTA *et al.*, 2009) de modo a fazerem uma rotação completa sobre seu eixo em 12h. As plantas com os afídeos foram mantidas em condições

controladas por 12h (temperatura: $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: 70% e fotofase de 14h) e após este período os afídeos foram removidos e os discos avaliados quanto ao número de gotas de honeydew excretadas. Além das concentrações de $1,5 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^9$ células.mL⁻¹ de *S. variabilis* foi empregado um controle onde as plantas foram mantidas em água destilada estéril. Para cada tratamento foram realizadas cinco repetições.

2.7 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados da seleção da actinobactéria com maior potencial entomopatogênico dos períodos 24 e 48 horas e a avaliação desta sobre o comportamento alimentar de *B. brassicae* foram transformados pelo arseen da raiz quadrada para normalização das distribuições e homogeneidade das variâncias (HADDAD & VENDRAMIN, 2000). Os dados transformados foram analisados por análise de variância (ANOVA). O percentual médio (\pm EPM) de insetos mortos foi submetido a uma análise de variância simples (*One-way* ANOVA). Diferenças significativas entre as médias dos tratamentos foram submetidas ao teste de Tukey ($p < 0,05$) (ZAR, 2009).

Os dados de mortalidade de *B. brassicae* causado pelas diferentes concentrações de *S. variabilis* foram submetidos à análise de probit para estimativa da CL₂₅ e CL₅₀, intervalo de confiança de 95%, por meio do programa PoloPlus (LeOra Software, Petaluma, CA) (ROBERTSON *et al.*, 2007).

Os parâmetros de tabela de vida de fertilidade foram baseados em Andrewartha e Birch (1954). Estes resultados deram subsídio para o cálculo dos parâmetros de crescimento populacional (R_0 , T , r_m , λ e TD), baseados no método jackknife (Meyer *et al.*, 1986). As comparações dos parâmetros de crescimento populacionais de afídeos tratados e não tratados com a CL₂₅ de *S. variabilis* foram realizadas pelo test 't' unilateral por meio do programa computacional tabvida (PENTEADO *et al.*, 2010).

3 RESULTADOS

3.1 SELEÇÃO DA ACTINOBACTÉRIA COM MAIOR POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO

O isolado *S. variabilis* foi o mais promissor. Em avaliações com 24h, este isolado diferiu de modo significativo dos demais ($F = 10,9562$; $g.l = 4:20$; $p < 0,001$). A mortalidade causada por *S. variabilis* foi de 32%, sendo duas vezes superior ao segundo isolado mais agressivo, *S. seoulensis* (Figura 3). Os isolados *S. seoulensis*, *S. bacillaris*, *S. cavourensise* *S. parvus* causaram uma mortalidade confirmada de 16, 6, 2 e 4%, respectivamente (Figura 3). Em avaliações com 48h o isolado *S. variabilis* causou uma mortalidade confirmada de 50% ($F = 4,8388$; $g.l = 4:20$; $p < 0,001$). Esta mortalidade foi superior à causada pelos demais isolados ($F = 60,18$; $g.l = 5, 30$; $p < 0,001$), mesmo com o aumento na mortalidade para todos os tratamentos, com os isolados *S. seoulensis*, *S. bacillaris*, *S. cavourensise* *S. parvus* que apresentaram aumentos consideráveis, mostrando mortalidade de 16, 10, 14 e 18% (Figura 3).

Após 72h o isolado *S. variabilis* causou 80% de mortalidade ($F = 15,250$; $g.l = 4:20$; $p < 0,006$). Nesta avaliação, o isolado *S. seoulensis* atingiu o mesmo valor de mortalidade inicial do melhor tratamento (50%) e o isolado *S. parvus* quase dobrou a taxa de mortalidade (32%). Os demais *S. bacillaris* e *S. cavourensise* tiveram aumentos menos evidentes (14 e 26%, respectivamente) (Figura 3). Nas avaliações com 96h, a mortalidade entre os isolados menos promissores houve um aumento de aproximadamente 10% e o isolado *S. variabilis* atingiu 100% ($F = 11,1474$; $g.l = 4:20$; $p < 0,001$).

As avaliações realizadas com 120h mostraram que o isolado *S. variabilis* se manteve significativamente mais letal que os demais (Figura 3) ($F = 5,9625$; $g.l = 4:20$; $p < 0,0024$). Os demais apresentaram resultados similares aos observados na avaliação com 96h (Figura 3). Neste contexto, em todas as avaliações, o isolado *S. variabilis* obteve o melhor desempenho no controle de *B. brassicae*, indicando possuir maior potencial entomopatogênico dentre os isolados testados e será empregado nos bioensaios posteriores, enquanto o isolado *S. bacillaris* se mostrou o menos agressivo, obtendo apenas 30% de mortalidade ao fim dos cinco dias de avaliação.

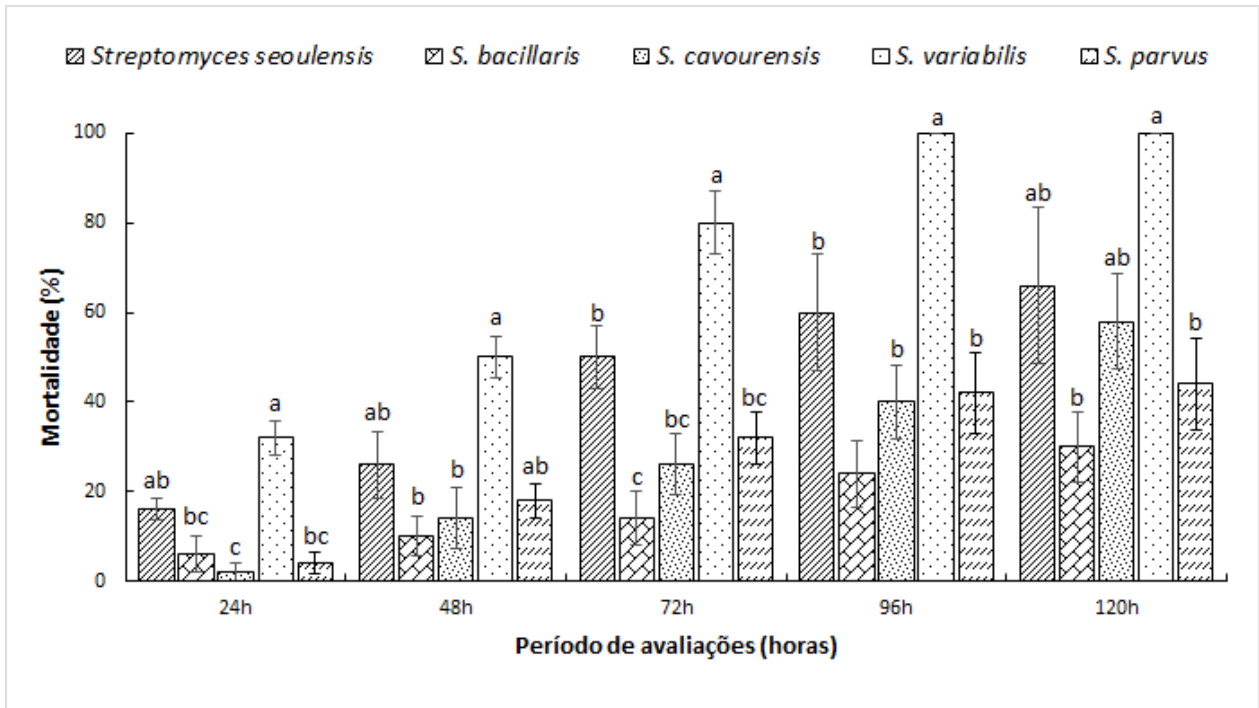


Figura 3. Mortalidade média confirmada de ninfas de *Brevicoryne brassicae* após 24, 48, 72, 96 e 120 horas de exposição as actinobactérias entomopatogênicas *S. seoulensis*, *S. bacillaris*, *S. cavourensis*, *S. variabilis* e *S. parvus*. Letras distintas no dia da avaliação diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.2 ESTIMATIVA DA LINHA DE CONCENTRAÇÃO RESPOSTA

A caracterização toxicológica de *S. variabilis* sobre ninfas de *B. brassicae* expostas por cinco dias ao tratamento estimou uma CL_{25} de $0,12 \times 10^6$ e uma CL_{50} de $0,20 \times 10^7$ células.mL⁻¹ (Tabela 1). A mortalidade observada ao quinto dia ajustou-se ao modelo de Probit, obtendo-se um χ^2 de 4,1627 e heterogeneidade de 1,0407, sendo estimado um coeficiente angular de 0,547 ($\pm 0,028$) (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização toxicológica do isolado de actinobactéria *Streptomyces variabilis* obtido sobre ninfas de *Brevicoryne brassicae* após cinco dias da exposição. Temp. 25 ± 2 °C, e 14 horas de fotofase e U.R. $70 \pm 10\%$.

n ¹	CL ₂₅ (IC 95%) ²	CL ₅₀ (IC 95%) ²	Coeficiente		
			Angular (±EPM ³)	χ^2 (g.l.) ⁴	h ⁵
	$0,12 \times 10^6$	$0,20 \times 10^7$			
1400	$(57,14 \times 10^3 - 0,22 \times 10^6)$	$(0,12 \times 10^7 - 0,34 \times 10^7)$	0,547 (±0,028)	4,1627(4)	1,0407

¹ Número de insetos testados; ² Concentração Letal; ³ Erro Padrão da Média; ⁴ Graus de liberdade; ⁵ Heterogeneidade

3.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS

A exposição a CL₂₅ de *S. variabilis* não afetou os parâmetros de crescimento populacional de *B. brassicae*. Não houve diferença sobre a taxa líquida de reprodução (R₀), que determina o total de descendentes fêmeas produzidas por fêmea durante todo o período de reprodução e que chegam à geração seguinte ($T = 0,43$; g.l. = 2, 48; $p < 1,00$) (Tabela 2). A duração média de uma geração (T) foi similar para insetos controle e tratados ($T = 1,36$; g.l. = 2, 48; $p < 1,00$) (Tabela 2). A taxa intrínseca de crescimento populacional ou a capacidade inata de aumentar em número (r_m) não se diferenciou entre os tratamentos ($T = -0,77$; g.l. = 2, 48; $p < 1,00$) (Tabela 2), assim como a exposição a CL₂₅ de *S. variabilis* também não causou diferenças significativas na razão finita de aumento populacional (λ), que corresponde ao número de vezes que a população multiplica em uma unidade de tempo ($T = -1,08$; g.l. = 2, 48; $p < 1,00$) e no tempo que a população leva para duplicar em número (TD) ($T = 0,74$; g.l. = 2, 48; $p < 1,00$) (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros de crescimento populacional de *Brevicoryne brassicae* expostos e não expostos a CL₂₅ ($0,12 \times 10^6$ células.mL⁻¹) de *S. variabilis*.

Insetos	Ro	T	r_m	λ	TD
Não tratados	8,85 ± 0,55	2,90 ± 0,18	0,75 ± 0,05	2,12 ± 0,13	0,92 ± 0,05
Tratados	8,84 ± 0,37	2,90 ± 0,08	0,97 ± 0,04	2,64 ± 0,10	0,71 ± 0,02
Valor de <i>T</i>	0,43 ^{ns*}	1,38 ^{ns*}	-0,77 ^{ns*}	-1,08 ^{ns*}	0,74 ^{ns*}
Valor de <i>p</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

*Não significativo a 5%.

3.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR

As diferentes concentrações de *S. variabilis* interferiram no comportamento alimentar de *B. brassicae*. A excreção de honeydew de afídeos mantidos em plantas de couve sem a bactéria, em um período de 24h, foi significativamente diferente das concentrações de 10^5 e 10^9 células.mL⁻¹ ($F = 14,26$; g.l. = 2,12; $p < 0,0006$). A redução na excreção do honeydew foi de 84 e 75% para as concentrações de 10^5 e 10^9 respectivamente. Essa redução é um indicativo da alteração no comportamento alimentar de *B. brassicae* na presença da actinobactéria, quando comparadas com o controle. Já a ausência de diferenças entre as concentrações são um indicativo de que baixas concentrações do patógeno já são suficientes para reduzir a alimentação do afídeo.

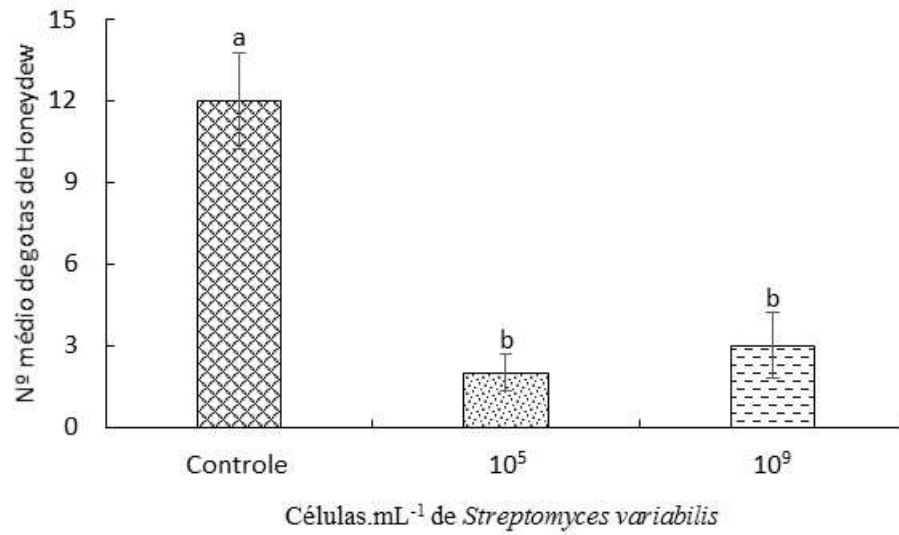


Figura 4. Número de gotas de *honedew* excretadas por *Brevicoryne brassicae* no período de 12 horas de exposição à actinobactérias entomopatogênica *S. variabilis*. Letras distintas nas concentrações diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

O isolado de *Streptomyces variabilis* apresentou maior potencial no controle de *Brevicoryne brassicae*, resultando em 100% de mortalidade após 96 horas de avaliação. Este isolado também apresentou atividade inibitória sobre bactérias patogênicas (PORSANI *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2009), demonstrando um potencial para ser usado no controle biológico. *Streptomyces seoulensis*, segundo Qing-fei *et al.* (2009), apresenta ação antihelmíntica. *Streptomyces cavourensis* é utilizado no controle de antracnose pela produção de quitinases (So Youn *et al.*, 2012). Praveen, Srivastava e Tripathi (2011) relatam a extração de uma enzima colesterol oxidase de *Streptomyces parvus*, que pode apresentar efeito inseticida pela degradação do colesterol, ou pela diminuição no armazenamento de tecido adiposo no inseto e *Streptomyces bacillaris*, ao que traz Hudec *et al.* (2014), esta bactéria é produtora de ácido gama-aminobutírico (GABA), utilizado com inseticida que afeta o sistema nervoso, ainda que seja o isolado com menor toxicidade contra *B. brassicae*.

Dentre as actinobactérias, os gêneros *Streptomyces* e *Streptoverticillum* apresentam maior potencial de controle sobre insetos (BREM *et al.*, 2001) e exemplares de *Streptomyces* isolados de sedimento marinho e solo arenoso possuem destaque na ação inseticida (XIONG *et al.*, 2004). Merzendorfer (2013) menciona que *Streptomyces* produzem uma série de inibidores de sintetizadores de quitina, como polioxinas, que são efetivas como agentes antifúngicos e podem ter ação inseticida. Neste contexto, El-khawaga e Megahed (2012) apresentam um isolado de *Streptomyces bikiniensis*, coletado em sedimento arenoso, que apresentou 100% taxa de mortalidade sobre *Spodoptera littoralis*, que demonstra a efetividade de isolados deste gênero quanto a ação inseticida.

A letalidade de *S. variabilis* pode ser associada à produção de metabólitos reativos (LI & YAN, 2014), que identificaram uma série de genes ativos em isolados *S. variabilis*, principalmente o gene KS α (ketoacyl-synthase), comum em *Streptomyces*, característico na produção de policetídeos, macromoléculas altamente reativas de função adaptativa ao ambiente, que são utilizados por apresentarem ação farmacológica (antitumorais e imunossupressores), antimicrobiana, antihelmíntica e inseticida (Spinosad).

O metabólito Ammosamida D, um composto redutor de quinonas, que impede a formação correta da dupla hélice de DNA, causando apoptose (PAN *et al.*; 2012). Kesavan *et al.* (2014) caracterizaram metabólitos obtidos do extrato de *S. variabilis* com funções de eliminação de células tumorais na medula óssea, atividade citotóxica, estimulação de adipogênese e gliceroneogênese, além de afetar a diferenciação de liposarcoma humano. Al-Bari *et al.* (2006) mencionam o composto bis (2-ethylhexyl) ftalato, encontrado em *S. variabilis* por Kesavan *et al.* (2014) como tendo ação antifúngica e Ellero-Simatos *et al.* (2011) trazem monoethylhexyl ftalato também isolado desta actinobactéria, que possui, junto ao composto anterior, ação inibitória na deposição de gordura em adipócitos. Ainda que não haja relatos de testes toxicológicos contra insetos com esta actinobactéria, compostos com ação citotóxica em mamíferos podem apresentar toxicidade sobre o afídeo *B. brassicae*.

O controle biológico através de células *in vivo* foi trabalhado através de testes com diversas concentrações, para estipular a Concentração Letal Média (CL₅₀) de *S. variabilis*, quantificada como $0,20 \times 10^7$ células/mL⁻¹, com 100% de mortalidade em 5 dias, comparativamente menor que a CL₃₀ para *Bacillus thuringiensis*, $1,8 \times 10^7$ células/mL⁻¹, testada sobre larvas de *Spodoptera littoralis*, chegando à apenas 16% de mortalidade em 3 dias (SNEH & GASITH, 1983).

O método mais comum para testes toxicológicos tende à ser pelo uso de extratos fermentados de bactérias, e aplicados sobre o alvo (SO YOUN *et al.*, 2012; QING-FEI *et al.*, 2009). Estas soluções contém os metabólitos produzidos pelas células bacterianas, não havendo deposição direta destas sobre o substrato. Neste trabalho optou-se pelo uso de células *in vivo* devido a tolerância ambiental característica à elas, possibilitando que fossem dispersas no substrato das plantas e absorvidas, sendo então ingeridas pelo afídeo ao se alimentar da seiva elaborada, afim dos metabólitos das actinobactérias afeterem diretamente os insetos testados (BRAVO, GILL & SOBERÓN, 2007). Esta liberação no ambiente possibilita a continuidade de colônias no substrato das plantas, mantendo um certo grau de antagonismo contra insetos que se alimentem da seiva.

A CL₂₅ de *S. variabilis* não afeto parâmetros populacionais de *B. brassicae*, possivelmente sendo uma concentração inferior ao mínimo necessário para afetar a fisiologia deste afídeo. Lashkari, Sahragard e Ghadamyari (2007) realizaram um experimento similar utilizando uma concentração subletal (LC₃₀) de dois inseticidas comerciais, imidacloprida e pymetrozine, obtendo uma redução significativa no número total e diária de ninfas geradas por fêmeas adultas. No entanto, o isolado de *S. variabilis* apresentou um número aumentado de mortalidade dos afídeos

durante o experimento, com redução de 33% na longevidade observada, levemente superior à observada por Pavela, Barnet e Kocourek (2004) (29%) utilizando $0,005 \text{ mg.mL}^{-1}$ azadiractina, um composto que causa inibição alimentar e interrupção de metamorfose em insetos. A manutenção ou incremento reprodutivo de insetos é uma possibilidade para justificar a ausência de diferença nos parâmetros biológicos de *B. brassicae* tratados com *S. variabilis* (BLANFORD & THOMAS, 2001)

É observada uma redução de 75% no número de gotas de *honeydew* produzidos por *B. brassicae* tratado com *S. variabilis*, independente da concentração de actinobactérias usada. Costa, Moraes e Costa (2009) observaram similar redução (80%) em seu trabalho, utilizando imidacloprida, um inseticida sistêmico neurotóxico, sobre o pulgão-verde (*Schizaphis graminum*), demonstrando que a efetividade do isolado *S. variabilis* se comparada à um químico comercial. Shi *et al.* (2010) relatam sobre a diminuição na excreção de *honeydew* do pulgão-do-algodão (*Aphis gossypii*) sob uma concentração sub letal (CL_{20}) de diversos inseticidas em três períodos de tempo, 24, 48 e 72 horas, onde não foi observada redução significativa na alimentação desde quando exposto a imidacloprida por até 48 horas; dentre os agentes químicos apresentados, dinotefuran, tiametoxam e clothianidin, todos neurotóxicos, atingiram, após 72 horas uma inibição alimentar (82, 73 e 72%, respectivamente) comparável ao isolado de *S. variabilis* sobre *B. brassicae* no período de 12 horas. A diminuição na excreção de *honeydew* indica ação fagodeterente desta actinobactéria sobre o pulgão. Com a redução da alimentação do afídeo, o efeito de esmaecimento nas plantas também é diminuído, mantendo o valor comercial e melhores condições fisiológicas.

A actinobactéria marinha, *Streptomyces variabilis* possui propriedades únicas que o distinguem não somente pela síntese de metabólitos secundários com potencial medicinal, mas também efeito inseticida contra o afídeo *Brevicoryne brassicae*. Comparação com agentes químicos comerciais trazem similar ou maior inibição alimentar, enquanto outras bactérias de uso no controle de pragas apresentaram desempenho inferior. Assim, *S. variabilis* tem potencial comercial para o mercado de inseticidas biológicos, extraindo seus metabólitos ativos ou utilizando-o *in vivo*, por sua característica tolerância ambiental.

Actinobactérias marinhas apresentam diferenças em diversas características com as de solo devido ao seu local de crescimento (KIJOA & SAWANGWONG, 2004; RAMESH & MATHIVANAN, 2009). Este ambiente da região entre-marés é caracterizado por altas taxas de salinidade, umidade, radiação UV, temperatura, ação mecânica das marés e escassez de nutrientes

(ORTEGA-MORALES *et al.* 2010). Estas condições específicas favorecem o desenvolvimento de microrganismos com funções fisiológicas especialmente adaptadas ao ambiente, apresentando componentes metabólicos específicos, que podem ser explorados para diversos usos, inclusive controle biológico (Li *et al.*, 2014; XIONG *et al.*, 2004). Estes organismos altamente tolerantes apresentam capacidade de proliferar em outros ambientes similares, como campos de plantio, principalmente sobre a alta incidência de radiação UV (KAKANI *et al.*, 2003) e salinidade (CABOT *et al.*, 2014). É possível que esta resistência provenha meios para colônias se instalarem em campos, possibilitando o uso de células *in vivo* como método de controle biológico, que potencialmente reduziria o custo total para aplicação de produtos baseados nestes microrganismos.

REFERÊNCIAS

AHMAD, M; AKHTAR, S. Development of insecticide resistance in field populations of *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae) in Pakistan. **Journal of Economic Entomology**. v.106, p. 954-958, 2013.

AKBAR, T. A.; AKBAR, R. A. Pesticide Health Risk Mapping and Sensitivity Analysis of Parameters in Groundwater Vulnerability Assessment. **Clean – Soil, Air, Water**. v.41, n.11, p. 1073-1079, 2013

AL-BARI, M. A. A.; SAYEED, M. A.; RAHMAN, M. S.; MOSSADIK, M. A. Characterization and antimicrobial activities of a phthalic acid derivative produced by *Streptomyces bangladeshiensis*-A novel species in Bangladesh. **International Journal of Research in Medical Sciences**. v. 1, p. 77-81, 2006

ARAÚJO JR, J. M.; MARQUES, E. J.; OLIVEIRA, J. V.; Potencial de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* e do Óleo de Nim no controle do pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**. v. 34, p. 520-525, 2009

ASI, M. R.; BASHIR, M. H.; MIRZA, J. H.; AFZAL, M.; IMRAN, SAQUIB. In vitro efficacy of entomopathogenic fungi against cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*. **Pakistan Entomologist**. v.31, n.1, 2009.

AZUMA, M. V. P. **Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da região entremarés da Ilha-do-Mel, PR, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

BACCI, L; PICANÇO, M. C.; GUSMÃO, M. R.; CRESPO, A. L. B.; PEREIRA, E. J. G. Seletividade de Inseticidas a *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae) e ao Predador

Doru luteipes (Scudder) (Dermaptera: Forficulidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, n.4, p. 707-713, 2001.

BACCI, L.; PICANÇO, M. C.; ROSADO, J. F.; SILVA, G. A.; CRESPO, A. L. B.; PEREIRA, E. J. G.; MARTINS, J. C. Conservation of natural enemies in brassica crops: comparative selectivity of insecticides in the management of *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 44, p. 103-113, 2009.

BACKER, R. Diversity in biological control. **Plant Pathology and Weed Science**. v. 10, p. 85-94, 1991.

BALKAYA, A.; YANMAZ, R. Promising kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) populations from Black Sea region, Turkey. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**. v. 33, p. 1-7, 2005.

BARTON, B. T.; IVES, A. T. Direct and indirect effects of warming on aphids, their predators, and ant mutualists. **Ecology**, v. 95, n.6, p. 1479–1484, 2014.

BLANFORD, S.; THOMAS, M. Adult survival, maturation, and reproduction of the desert locust *Schistocerca gregaria* infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 78, p. 1-8, 2001

BONFIELD, J; BEAL, K; JORDAN, M; CHEN, Y; STADEN, R. **The Staden Package Manual**, Cambridge, UK, 2006.

BREAM, A. S.; GHAZAL, S.A.; ABD EL-AZIZ, Z. K.; IBRAHIM, S.Y. Insecticidal activity of selected actinomycete strains against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen**. v.66, p. 503-12, 2001.

CABOTA, C.; SIBOLETA, J. V.; BARCELÓB, J.; POSCHENRIEDER, C. Lessons from crop plants struggling with salinity. **Plant Science**. n. 226, p. 2-13, 2014.

CARTER, C. C; SORENSEN, K. A. **Insect and related pests of vegetables**. 1.ed. Center for Integrated Pest Management. North Carolina State University: Raleigh. 2013.

CHOU DHURY, S. B.; LEE, J.; DAVIDSON, G.; YIM, Y.; BOSE, K.; SHARMA, M. L.; KANG, S.; CABELLO, D, E.; MARONEY, M. L. Examination of the Nickel Site Structure and Reaction Mechanism in *Streptomyces seoulensis* Superoxide Dismutase. **Biochemistry**. v.38, p. 3744-3752, 1999.

COSTA, R. R.; MORAES, J. C.; COSTA, R. R. Interação silício-imidacloprid no comportamento biológico e alimentar de *Schizaphis graminum* (rond.) (hemiptera: aphididae) em plantas de trigo. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 33, n. 2, p. 455-460, 2009.

CZAPEK; F. Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweißbildung der Pflanzen. **Beitr Chem Physiol u Phatol**. v. 1, p. 540–560, 1902.

DHALIWAL, G. S.; JINDAL, V.; DHAWAN, A.K. Insect Pest Problems and Crop Losses: Changing Trends. **Indian Journal of Ecology**. v. 37, n.1, p.1-7, 2010.

DOUMBOU, C. L.; SALOVE, M. K. H.; CRAWFORD, D. L.; BEAULIEU, C. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. **Phytoprotection**. v. 82, n. 3, p. 85-102, 2001.

DOX, A. W. The intracellular enzymes of *Penicillium* and *Aspergillus* with special references to those of *P. camemberti*. **US Dept Agr Bur Anim Ind Bull**. v. 120, p. 170, 1910.

ELLERO-SIMATOS, S.; CLAUS, S. P.; BENELLI, C.; FOREST, C.; LETOURNEUR, F.; CAGNARD, N.; BEAUNE, P. H.; DE WAZIERS, I. Combined transcriptomic–1h NMR metabonomic study reveals that monoethylhexyl phthalate stimulates adipogenesis and

glyceroneogenesis in human adipocytes. **Journal of Proteome Research**. v. 10, n. 12, p. 5493–502, 2011.

EL-KHAWAGA, M. A.; MEGAHED, M. M. M. Antibacterial and insecticidal activity of actinomycetes isolated from sandy soil of (Cairo-Egypt). **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences**. v.4, n.1, p. 53-67, 2012.

FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Annual Review of Entomology**. v.23, p. 409-42, 1978.

GABRYS, B. J; GADOMSKI, H. J; KLUKOWSKI, Z; PICKETT, J. A; SOBOTA, G. T; WADHAMS, L. J; WOODCOCK, C. M. 1997. Sex pheromone of cabbage aphid *Brevicoryne brassicae*: identification and field trapping of male aphids and parasitoids. **Journal of Chemical Ecology**. v.23, p. 1881-1890, 1997.

HUDEC, J.; KOBIDA, L.; CANIGOVÁ, M.; LACKO-BARTOSIVÁ, M.; LOZEK, O.; CHLEBO, P.; MRÁZOVÁ, J.; DUCSAYA, L.; BYSTRICKÁE, J. Production of γ -aminobutyric acid by microorganisms from different food sources. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 2014.

HUGHES, R. D. Population Dynamics of the Cabbage Aphid, *Brevicoryne brassicae* (L.). **Journal of Animal Ecology**. v. 32, n. 3, p. 393-424, 1963.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J.; **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

KAKANI, V.G.; REDDY, K.R.; ZHAO, D.; SAILAJA, K. Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. **Agricultural and Forest Meteorology**. n. 120, p. 191-218, 2003.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia médica**. 2.ed. São Paulo: Premier. 1999.

KESAVAN, S. S.; BAVANILATHA, M.; VIJYALAKSHMI, R.; HEMALATHA, S. Analysis of bioactive constituents from a new *Streptomyces variabilis* strain Su5 by gas chromatography - mass spectrometry. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 6, n. 1, p. 224-226, 2014.

KIJJOA, A.; SAWANGWONG, P. Drugs and cosmetics from the sea. **Marine Drugs**. v. 2, n. 6, p. 73-82, 2004.

KUBO, I. Insect control agents from tropical plants. **Recent advances in phytochemistry: phytochemical potential of tropical plants**. New York, v. 27, p. 133-151, 1993.

KUMAR, K; CHAPMAN, R. B. Toxicity of insecticides to cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* L. **New Zeland Journal of Experimental Agriculture**. v. 12, p. 55-58, 1984.

LAMSAL, K.; KIM, S. W.; NAEMIMI, S.; ADHIKARI, M.; YADAJ, D. R.; KIM, C.; LEE, G. B.; LEE, Y. S. Three New Records of *Penicillium* Species Isolated from Insect Specimens in Korea. **Mycobiology**. v.41, n. 2, p. 116-119, 2013.

LASHKARI, M. R.; SAHRAGARD, A.; GHADAMYARI, M. Sublethal effects of imidacloprid and pymetrozine on population growth parameters of cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* on rapeseed, *Brassica napus* L. **Insect Science**. v.14, p. 207-212, 2007.

LI, P.; YAN, P. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* and cancer cells by marine actinomycete strains. **Journal of Ocean University of China**. v. 13, n. 6, p. 985-994, 2014.

LIU, H; QIN, S; WANG, Y; LI, W; ZHANG, J. Insecticidal action of quinomycin A from *Streptomyces* sp. KN-0647, isolated from a forest soil. **World Journal of Microbiological Biotechnology**. v.24, p 2243-2248, 2008.

LOVATTO, P. B.; GOETZE, M.; THOMÉ, G. C. H. Efeito de extratos de plantas silvestres da família Solanaceae sobre o controle de *Brevicoryne brassicae* em couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*). **Ciência Rural**. v. 34, n. 4, p. 971-978, 2004.

LOWE, A. D. Control of the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae* L.) with some systemic materials. **New Zealand Journal of Agricultural Research**. v.3, n.5, p. 842-844, 1960.

_____. The incidence of parasitism and disease in some populations of the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae* L.) in New Zealand, **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 4, p. 821-828, 1968.

LU, Y.; DONG, X.; LIU, S.; BIE, X. Characterization and Identification of a Novel Marine *Streptomyces* sp. Produced Antibacterial Substance. **Marine Biotechnology**. v. 11, n. 6, p. 717-724, 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10.ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MAPA – Inseticidas recomendados para o manejo de *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera, Aphididae) em couve. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 out 2014.

MARONI, M.; FAIT, A. Health effects in man from long-term exposure to pesticides. A review of the 1975-1991 literature. **Toxicology**. V.78, n. 1, p. 1-5, 1993.

MELATTI, M. V.; MARTINS, E.; PRAÇA, L. B.; BERRY, C.; SUJII, E.; MONNERAT, R. G. **Elaboração de metodologia de bioensaio seletivo e de dose de bacillus thuringiensis contra o pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*)**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 14p., 2008.

MELO, R. L. **Alternativas de controle de afídeos no cultivo da couve (*Brassica oleracea*) com ênfase a *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae)**. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

MERZENDORFER, H.; Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. **Insect Science**. v. 20, n. 2, p.121–138, 2013.

MITTLER, T. E. Studies on the feeding and nutrition of *Tuberolachnus salignus* (Gmelin) (Homoptera: Aphididae) II: the nitrogen and sugar composition of ingested phloem sap and excreted honeydew. **Journal of Experimental Biology**. v. 35, n. 1, p. 74-84, 1958.

MONCIARDINI, P; SOSIO, M; CAVALLETTI, L; CHIOCCHINI, C. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. **FEMS Microbiology Ecology** v. 42, p. 419-429, 2002.

OPFER, P; MCGRATH, D. 2013. **Oregon vegetables, cabbage aphid and green peach aphid**. Department of Horticulture. Oregon State University, Corvallis. 2013.

ORTEGA-MORALES, B.O.; CHAN-BACAB, M. J.; ROSA-GARCIA, S.C.; CAMACHO-CHAB J. C. Valuable processes and products from marine intertidal microbial communities. **Current Opinion in Biotechnology**. n. 21, p. 346–352, 2010.

PAN, E.; JAMISON, M.; YOUSUFUDDIN, M.; MACMILLAN, J. B. Ammosamide D, an Oxidatively Ring Opened Ammosamide Analog from a Marine-Derived *Streptomyces variabilis*. **Organic Letters**. v. 14, n. 9, p. 2390–2393, 2012.

PAULITZ, T. C.; BÉLANGER, R. R. BIOLOGICAL CONTROL IN GREENHOUSE SYSTEMS. **Annual Review of Phytopathology**. v.39, p. 103-133, 2001.

PIMENTEL, D. Diversification of biological control strategies in agriculture. **Crop Protection**. v. 10, 243-253, 1991.

PRASHITH KEKUDA, T. R.; SHOBHA, K. S.; ONKARAPPA, R. Potent iseticidal activitu of two *Streptomyces* species isolated from the soils of the Western ghats of Agumbe, Karnataka. **Journal of Natural Pharmaceuticals**. v.1, n.1, p 30-32, 2010.

PRAVEEN, V.; SRIVASTAVA, A.; TRIPATHI, C. K. M. Purification and Characterization of the Enzyme Cholesterol Oxidase from a New Isolate of *Streptomyces sp.* **Applied Biochemical Biotechnology**. v.165, p.1414–1426, 2011.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.; XU, L. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobactéria. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 89, p 457-573, 2011.

QINQ-FEI, Z.; CHUAN-HAO, L.; HUI-QIN, H.; ZHE, F.; SHI-XIANG, B. Screening and identification of nematicidal actinomycetes and optimization of ferment conditions. **Chinese Journal of Biological Control**. v. 25, n. 3, p. 255-259, 2009.

RAJU, A; PIGGOTT, A.M.; CONTE, M; TNIMOV, Z. ALEXANDROV, K. CAPON, R. J. Nocardiopsins: New FKBP12-Binding Macrolide Polyketides from an Australian Marine-Derived Actinomycete, *Nocardiopsis sp.* **Chemistry - A European Journal**. v. 16, n. 10, p. 3194-3200, 2010.

RAMESH, S.; MATHIVANAN, N. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 25, n. 12, p. 2103-2111, 2009

RAZAQ, M; MEHMOOD, A; ASLAM1, M; ISMAIL, M; AFZAL, M; ALI SHAD, S. Losses In Yield And Yield Components Caused By Aphids To Late Sown Brassica *Napus L.*, *Brassica*

Juncea L. And *Brassica carrinata* A. Braun At Multan, Punjab (Pakistan). **Pakistan Journal of Botany**. v. 43, n. 1, p. 319-324, 2011.

SANTOS RESENDE, A.; LIXA, A.; SANTOS, C.; SOUZA, S.; GUERRA, J.; AGUIAR-MENEZES, E. Comunidade de Joaninhas (Coleoptera: Coccinellidae) em Consórcio de Couve (*Brassica oleraceae* var. *acephala*) com Coentro (*Coriandrum sativum*) sob Manejo Orgânico. **Revista brasileira de agroecologia**. v.6, n.1, p. 81-89, 2011.

SCHLICK-SOUZA, E. C.; BALDIN, E. L. L.; LOURENÇÃO, A. L. Variation in the host preferences and responses of *Ascia monuste* orseis Godart (Lepidoptera: Pieridae) to cultivars of collard greens *Brassica oleracea* (L.) var. *acephala*. **Journal of Pest Science**. v. 84, n.4, p. 429-436, 2011.

SCORSETTI, A. C.; HUMBER, R. A.; GARCIA, J. J.; LÓPEZ LASTRA, C. C. Natural occurrence of entomopathogenic fungi (Zygomycetes: Entomophthorales) of aphid (Hemiptera: Aphididae) pests of horticultural crops in Argentina. **BioControl**. v. 52, p. 641-655, 2007.

SHI, X.; JIANG, L.; WANG, H.; QIAO, K.; WANG, D. WANGA, K. Toxicities and sublethal effects of seven neonicotinoid insecticides on survival, growth and reproduction of imidacloprid-resistant cotton aphid, *Aphis gossypii*. **Pest Management Science**. v.67, p. 1528-1533, 2011.

SNEH, B.; GROSS, S.; GASITH, A. Biological control of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep., Noctuidae) by *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* and *Bracon hebetor* Say (Hym., Braconidae). **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**. n.96, p.408-412, 1983.

SO YOUN, L.; TINDWA, H.; SEONG LEE, Y.; WAI NAING, K.; HYUN HONG, S.; NAM, Y.; YONG KIM, K. Biocontrol of Anthracnose in Pepper Using Chitinase, β -1,3 Glucanase, and 2-Furancarboxaldehyde Produced by *Streptomyces cavourensis* SY224. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.22, n.10, p.1359–1366, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 2ª ed. Instituto Plantarum: Nova Odessa, 2008.

SUA, S.; TIANBC, L.; CHENA, G.; LIA, Z.; XUA, W.; PEI, Y. Two new compounds from the metabolites of a marine-derived actinomycete *Streptomyces cavourensis*. **Journal of Asian Natural Products Research**. v. 15, n.3, P.265–269, 2013

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 24, p. 1596-1599, 2006.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; CHANDRA, G.; FITZGERALD G. F.; CHATER K.F.; SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.71, p. 495–548, 2007.

XIONG, L.; LI, J.; KONG, F. *Streptomyces* sp. 173, an insecticidal microorganism from marine. **Letters in Applied Microbiology**. v.38, n.1, p. 32-37, 2004.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D. H.; SHINSKY, J. J.; WHITE, T.J. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, San Diego, 1990, p. 315–322.

ZHAO, X.; JIAO, W.; JIANG, B.; YUAN, W.; YANG, T.; HAO, S. Screening and identification of actinobacteria from marine sediments: Investigation of potential producers for antimicrobial agents and type I polyketides. **World Journal of Microbiological Biotechnology**. n.25, p.859–866, 2009

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5 ed. Prentice Hall, 2009.