

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina
25. Meio Ambiente

17, 18 y 19 de octubre de 2018

Bactérias obtidas do exoesqueleto de formigas cortadeiras utilizadas em estudo antagônico contra fitopatógenos de interesse agrícolaFreitas, Guilherme Peixoto de; guilhermefreitasufpr@gmail.com; Pinto, Luana Patrícia;
Grange, Luciana; Barreiros, Marco Antônio Bacellar;
Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina**Resumo**

A utilização excessiva de defensivos químicos para controlar patógenos e incrementar a produtividade agrícola, vem cada vez mais impactando diretamente no ambiente selecionando organismos patogênicos resistentes, favorecendo o desequilíbrio biológico e reduzindo a biodiversidade. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi investigar microrganismos com potencial para serem empregados como agentes de biocontrole na busca pela mitigação no uso de fungicidas. Este estudo de bioprospecção foi realizado a partir do isolamento de bactérias presentes no exoesqueleto de formigas cortadeiras através de testes de antagonismo frente a fitopatógenos de interesse agrícola. As bactérias foram isoladas de formigas cortadeiras da espécie *Acromyrmex subterraneus*. Os isolados obtidos foram utilizados para testes de antagonismo *in vitro* contra os patógenos *Clavibacter michiganensis* e *Curtobacterium flaccumfaciens*. Para o antagonismo foram preparadas suspensões bacterianas dos patógenos com a densidade ajustada pela turbidez 0,5 da escala de MacFarland. Da suspensão, 1000 μ L foram adicionados em meio Dygs ainda fluido (37°C) e agitado em vórtex para dissipar as células. No meio gelificado as bactérias obtidas das formigas foram inoculadas pelo método *spread-plate* individualmente em placa de petri com 4 repetições por bactéria e crescidas em B.O.D a 27°C por 72 horas. As placas foram avaliadas utilizando características qualitativas para presença ou não de halo de inibição e medição do diâmetro dos halos obtidos. De 22 isolados obtidos, 6 apresentaram presença de halo. Os isolados 01, 11, e 20 foram os que apresentaram os maiores tamanhos de halo, sendo apontados como candidatos com potencial para inibição dos patógenos até então avaliados.

Palavras-chave: Antagonismo; controle biológico; defensivos agrícolas.

25. Meio Ambiente

Bactérias obtidas do exoesqueleto de formigas cortadeiras utilizadas em estudo antagônico contra fitopatógenos de interesse agrícola

Freitas, Guilherme Peixoto de; Pinto, Luana Patrícia; Grange, Luciana; Barreiros, Marco

Antônio Bacellar;

guilhermefreitasufpr@gmail.com; lucianagrang@gmail.com;

Setor Palotina

Universidade Federal do Paraná

Resumo

A utilização excessiva de defensivos químicos para controlar patógenos e incrementar a produtividade agrícola, vem cada vez mais impactando diretamente no ambiente selecionando organismos patogênicos resistentes, favorecendo o desequilíbrio biológico e reduzindo a biodiversidade. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi investigar microrganismos com potencial para serem empregados como agentes de biocontrole na busca pela mitigação no uso de fungicidas. Este estudo de bioprospecção foi realizado a partir do isolamento de bactérias presentes no exoesqueleto de formigas cortadeiras através de testes de antagonismo frente a fitopatógenos de interesse agrícola. As bactérias foram isoladas de formigas cortadeiras da espécie *Acromyrmex subterraneus*. Os isolados obtidos foram utilizados para testes de antagonismo *in vitro* contra os patógenos *Clavibacter michiganensis* e *Curtobacterium flaccumfaciens*. Para o antagonismo foram preparadas suspensões bacterianas dos patógenos com a densidade ajustada pela turbidez 0,5 da escala de MacFarland. Da suspensão, 1000 µL foram adicionados em meio Dygs ainda fluido (37°C) e agitado em vórtex para dissipar as células. No meio gelificado as bactérias obtidas das formigas foram inoculadas pelo método *spread-plate* individualmente em placa de petri com 4 repetições por bactéria e crescidas em B.O.D a 27°C por 72 horas. As placas foram avaliadas utilizando características qualitativas para presença ou não de halo de inibição e medição do diâmetro dos halos obtidos. De 22 isolados obtidos, 6 apresentaram presença de halo. Os isolados 01, 11, e 20 foram os que apresentaram os maiores tamanhos de halo, sendo apontados como candidatos com potencial para inibição dos patógenos até então avaliados.

Palavras-chave: Antagonismo; controle biológico; defensivos agrícolas.

Introdução

Nos atuais sistemas agrícolas de produção, cada vez mais tem-se buscado a utilização de mecanismos alternativos para produzir de forma sustentável e

manter os padrões produtivos. O uso excessivo de defensivos para controle de pragas, doenças e plantas daninhas, tem levado a uma série de problemáticas que impactam o meio ambiente, promovendo a

resistência de organismos aos mecanismos de ação utilizados, desequilíbrio biológico que afetam na ciclagem de nutrientes, eliminação de microrganismos benéficos e os impactos causados sobre a biodiversidade (MORANDI; BETTIOL, 2009).

Nesse contexto, pesquisas relacionadas a bioprospecção de microrganismos com potencial para serem utilizados como agentes de controle biológico, vêm sendo desenvolvidas como alternativa para reduzir o uso excessivo dos defensivos (GLICK, 2012). A bioprospecção de novos microrganismos é uma das chaves para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável, visto o potencial destes para a produção de compostos como sideróforos, β -1,3 glucanase, quitinases e antibióticos que, pela competição por espaço e/ou nutrientes, além da indução de resistência nas plantas, podem reduzir a população dos fitopatógenos e assim minimizar a utilização de defensivos no sistema (EGAMBERDIEVA et al., 2015).

Uma das alternativas para a busca de novos microrganismos são os insetos sociais, destacando-se principalmente as formigas cortadeiras (Della Lucia e Souza, 2011). Com a capacidade de cultivar seu próprio alimento através de relações mutualísticas com fungos, as formigas cortadeiras realizam interações simbióticas com bactérias contidas em seu exoesqueleto, no qual, tais microrganismos desempenham papel de

antagonistas frente ao desenvolvimento de parasitas e entomopatógenos provenientes do solo (KOOIJ et al., 2014; DÂNGELO et al., 2016). Bactérias do gênero *Pseudonocardia* e *Streptomyces* são exemplos de microrganismos actinomicetos presentes no exoesqueleto das formigas e que atuam na síntese de substâncias específicas para inibir o desenvolvimento de fungos entomopatogênicos, como os do gênero *Escovopsis* (PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI JUNIOR, 2011).

Desse modo, estudos relacionados a investigação do potencial destas bactérias frente a outros microrganismos de interesse agrícola, como fungos e bactérias fitopatogênicas, é uma das possibilidades viáveis para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável que visa reduzir a utilização de agroquímicos.

Objetivos

O presente trabalho obteve isolados bacterianos a partir do exoesqueleto de formigas cortadeiras para realizar embates antagônicos frente as bactérias fitopatogênicas *Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis* e *Curtobacterium flaccumfaciens subsp. Flaccumfaciens*, com o objetivo de obter candidatos com potencial biotecnológico para o biocontrole.

Material e Métodos

Obtenção das Formigas Cortadeiras

Para o desenvolvimento do trabalho, formigas cortadeiras da espécie *Acromyrmex subterraneus* (figura 1) foram coletadas á campo nas mediações rurais do município de Assis Chateaubriand-PR. A obtenção consistiu na coleta de toda a colônia incluindo a rainha, formigas jardineiras, operárias e o fungo simbiote. A colônia coletada foi mantida em laboratório sob condições controladas de temperatura (25°C) e umidade relativa (70 ± 10 %) além do constante fornecimento de alimento (folhas) e água de acordo com Della Lucia et al. (1993).

A colônia foi mantida em repouso para estabilização por um período de 1 mês para posteriormente realizar a seleção dos indivíduos que seriam utilizados para o isolamento das bactérias contidas no exoesqueleto.



Figura 1. Formiga *Acromyrmex subterraneus* utilizada para o isolamento das bactérias. **Foto:** Dilson Busanello (UFPR – Palotina-PR). **Identificação:** Mariane Nickele e Wilson Reis (EMBRAPA Floresta, Colombo-PR).

Obtenção dos Isolados Bacterianos

Os isolados bacterianos candidatos foram obtidos a partir do

exoesqueleto de formigas cortadeiras coletadas sobre o fungo simbiote. Para a coleta, 30 formigas cortadeiras foram coletadas com auxílio de pinça esterilizada e adicionadas 3 em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina (0,85%), sendo 10 formigas para cada tubo.

Para o isolamento, foi utilizado o método *spread-plate* com 4 placas de petri contendo meios de cultura para cada tubo. Em fluxo laminar, os tubos foram submetidos a agitador tipo vórtex por 1 minuto com o objetivo de desagregar as bactérias contidas no exoesqueleto das formigas. Dos tubos, foi realizado uma diluição seriada até a obtenção das diluições de trabalho (10^{-3} ; 10^{-4}). Da diluição de trabalho, 1000 microlitros (μL) foram coletados e adicionados em placas de petri contendo meios de cultura, no qual, para diluição 10^{-3} foi utilizado o meio generalista Dygs e para 10^{-4} , o seletivo para actinomicetos ágar-água. As placas foram submetidas a crescimento em B.O.D a 27 °C por 72 horas para o meio Dygs e 14 dias para o ágar-água (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966; RODRIGUEZ NETO et al, 1986).

As colônias bacterianas puras obtidas pela Unidade Formadoras de Colônias (UFC) foram submetidas a caracterização morfológica segundo Yano et al. (1993). Este procedimento foi realizado como um screening inicial e mais econômico a fim de diferenciar, selecionar e agrupar os indivíduos

semelhantes. Os isolados representantes dos grupamentos obtidos por tipagem morfológica e análise pelo programa BioNumerics, foram identificados através de numeração e armazenados no banco da coleção de cultura do laboratório de biotecnologia (LABIOTEC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina para os posteriores testes. As bactérias fitopatogênicas utilizadas nos testes de antagonismo, *Clavibacter michiganensis* e *Curtobacterium flaccumfaciens*, foram disponibilizadas pelo Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR da cidade de Londrina-PR.

Teste de Antagonismo

As bactérias fitopatogênicas e as obtidas a partir do exoesqueleto das formigas cortadeiras foram crescidas em meio de cultura Dygs para a realização dos embates antagônicos. As suspensões das bactérias fitopatogênicas consistiu na diluição das células obtidas (UFC) em tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina estéril (0,85%) que foram submetidos a agitador tipo vórtex até a obtenção de uma solução homogênea. A densidade de células adicionadas nos tubos foi padronizada pela turbidez conforme o tubo 0,5 da escala de MacFarland.

Das suspensões obtidas para ambas as bactérias fitopatogênicas, 1000 µL foram coletados e adicionados em tubos tipo Falcon contendo 15 mL de meio Dygs ainda fluido (37°C), para agitar em vórtex visando dissipar as células por todo

o meio pelo método *pour-plate*. Com o meio ainda fluido pós agitação, este foi vertido em placas de petri para ocorrer a gelificação.

Nas placas contendo as bactérias fitopatogênicas dissipadas por todo o meio gelificado, foi realizado a inoculação das estirpes obtidas das formigas pelo método *spread-plate* de forma individual (Figura 1), utilizando a repetição de 4 placas por bactéria. As placas foram submetidas a crescimento em B.O.D a 27°C por 72 horas para a visualização dos halos de inibição presentes nas placas.

Para a mensuração dos halos de inibição, foi realizado a medida em milímetros do diâmetro da colônia bacteriana da formiga cortadeiras juntamente com o halo de inibição subtraindo o diâmetro da colônia bacteriana e realizado a média das 4 placas utilizadas.

As placas com os embates antagônicos frente as duas bactérias fitopatogênicas, foram avaliadas utilizando medidas qualitativas visuais: presença ou ausência da inibição do patógeno e a mensuração do tamanho dos halos presentes nas placas que possuíam atividade de antagonismo (Figuras 2 e 3). Os valores de diâmetro obtidos na medição das placas, foram submetidos ao teste de média, Tukey 5%, para observar as diferenças estatísticas presentes entre as bactérias.

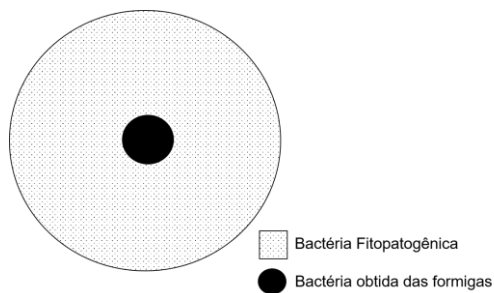


Figura 2. Esquemática de placa de petri contendo a bactéria fitopatogênica dissipada no meio de cultura (*pour-plate*) e bactéria obtida das formigas cortadeiras sobre o meio de cultura (*spread-plate*)

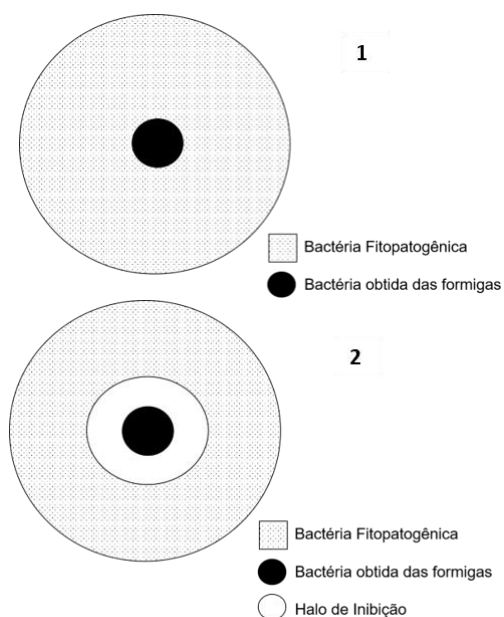


Figura 3. Esquemática de placa com ausência de halo de inibição. 2. Placa com a presença de halo de inibição utilizada para medição.

Resultados e Discussões

Das formigas cortadeiras coletadas sobre o fungo simbiote para o isolamento das bactérias presentes em seu exoesqueleto, foi possível isolar 22 bactérias distintas morfologicamente. Estas bactérias foram utilizadas no teste de antagonismo para avaliação do potencial de inibição de patógenos (Tabela 1).

Do total, foi observado 5 halos de inibição para *Clavibacter michiganensis* e

6 para *Curtobacterium flaccumfaciens*, correspondendo a uma porcentagem de 22 e 27% de bactérias com potencial para serem utilizadas no controle destes patógenos. A partir dos resultados observados, é importante ressaltar que a maioria dos isolados com potencial para a formação de halos de inibição, apresentou resultado para ambos os patógenos, sendo eles: 01, 04, 11, 20 e 25.

Tabela 1. Avaliação da presença ou ausência de halos de inibição em placas de petri das bactérias obtidas das formigas cortadeiras frente aos fitopatógenos *Clavibacter michiganensis* e *Curtobacterium flaccumfaciens*.

| Bactéria Candidatas* | <i>Clavibacter michiganensis</i> | <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> |
|----------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| 01 | + | + |
| 02 | - | - |
| 03 | - | - |
| 04 | + | + |
| 05 | - | - |
| 06 | - | - |
| 07 | - | - |
| 08 | - | - |
| 09 | - | - |
| 10 | - | - |
| 11 | + | + |
| 12 | - | - |
| 13 | - | - |
| 14 | - | - |
| 16 | - | - |
| 17 | - | + |
| 20 | + | + |
| 21 | - | - |
| 22 | - | - |
| 23 | - | - |
| 24 | - | - |
| 25 | + | + |
| Total | 5 Halos | 6 Halos |

*Isolados bacterianos obtidos a partir do exoesqueleto de formigas cortadeiras através do método *spread-plate*.

De acordo com De Castro Assumpção et al. (2010), alguns trabalhos

vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de encontrar agentes de controle biológico potencialmente eficientes. Isolados que possuam atividade antagônica frente a diversos fitopatógenos são uma alternativa viável para a aplicação destes microrganismos na supressão de patógenos (LOPES, 2009; KUPPER et al., 2013; GARCIA; KNAAK; FIUZA, 2015).

Nesse sentido, para a utilização destes microrganismos potenciais, novas pesquisas relacionadas a supressão de patógenos em testes *in vivo* torna-se necessário, para comprovar a aptidão destas bactérias como agentes de controle biológico para firmar como uma alternativa a ser utilizada para reduzir o uso de defensivos agrícolas.

Avaliando separadamente os isolados 01, 04, 11, 20 e 25 no embate individual contra *Clavibacter michiganensis*, foi possível observar variações nos halos de inibição obtidos entre as bactérias (Tabela 2). De acordo com os resultados obtidos, a bactéria 01 (Figura 4) foi a que obteve estatisticamente a maior média de diâmetro do halo de inibição, diferindo das demais bactérias. Já os isolados 11 e 20 não apresentaram estatisticamente superiores a bactéria anterior, porém, possuíram halos de inibição com medidas consideráveis em relação as bactérias 25 e 04, demonstrando também grande potencial para a inibição do fitopatógenos.

| Bactéria Formigas | Diâmetro halo de inibição |
|-------------------|---------------------------|
| 01 | 21,5 a |
| 04 | 6,5 c |
| 11 | 17,0 ab |
| 20 | 21,0 ab |
| 25 | 14,0 b |
| CV | 28.34 % |

Tabela 2. Média em milímetros das medidas de diâmetro dos halos de inibição avaliados das bactérias com potencial antagônico frente a *Clavibacter michiganensis*. *Média seguidas da mesma letra na coluna não se diferem entre si estatisticamente a Tukey 5%.

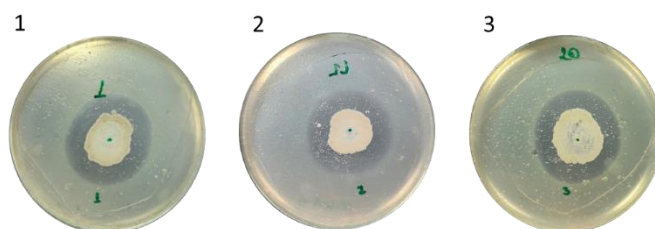


Figura 4. 1. Halo de inibição do isolado 01. 2. Halo de inibição do isolado 11. 3. Halo de inibição do isolado 20, todas contra *Clavibacter michiganensis*.

De acordo com os resultados obtidos, a bactéria 01 foi a que obteve estatisticamente a maior média de diâmetro do halo de inibição, diferindo das demais bactérias. Já os isolados 11 e 20 não apresentaram estatisticamente superiores a bactéria anterior, porém, possuíram halos de inibição com medidas consideráveis em relação as bactérias 25 e 04, demonstrando também grande potencial para a inibição do fitopatógenos. Já as bactérias 04 e 25 foram as que obtiveram as menores médias de diâmetro dentre todos isolados potenciais, porém

inibiram o desenvolvimento do patógeno e ainda podem ser uma alternativa de utilização.

Segundo Shiomi et al. (2015), as bactérias podem atuar na inibição de fitopatógenos através de mecanismos como: a atividade de antibiose, a competição e a lise das estruturas do microrganismo, sendo assim, os isolados citados com potencial para inibir o desenvolvimento do patógeno, podem estar atuando utilizando destas alternativas antagônicas de supressão.

Segundo Sengupta et al. (2013), microrganismos em seu habitat natural estão sempre em constante pressão seletiva, resultando na produção de metabólitos que podem estar atuando como agentes de biocontrole para garantir a sobrevivência. Nesse sentido os menores valores de diâmetro obtidos pelas bactérias 04 e 25, podem ser explicados pelo fato de que tais microrganismos não foram sujeitos a pressão de sobrevivência tão alta que os estimulasse a produzir metabólitos de forma, que resultaria na visualização de maiores halos de inibição por exemplo.

Dos isolados avaliados frente ao patógeno *Curtobacterium flaccumfaciens* foi possível observar halos de inibição médios variando de 15,0 a 21,5 mm de diâmetro. Os maiores halos de inibição foram obtidos pelas bactérias 04, 11, 20 e 25 (figura 5), porém não se diferiram estatisticamente das demais bactérias testadas. Os isolados 01 e 17 obtiveram

as menores médias de diâmetro na comparação com os demais microrganismos, porém ainda inibiram o desenvolvimento do fitopatógenos.

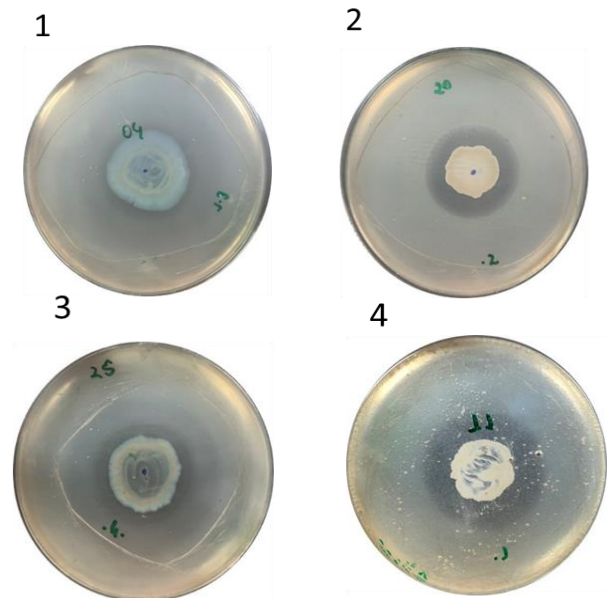


Figura 5. 1. Halo de inibição do isolado 04 contra *Curtobacterium flaccumfaciens*. **2.** Halo de inibição do isolado 20. **3.** Halo de inibição do isolado 25. **4.** Halo de inibição isolado 11.

Comparando o potencial de inibição dos dois testes de antagonismo, é importante destacar que algumas bactérias com grande potencial de inibição para determinado patógeno, não apresentou a mesma característica para o outro agente causal de doença, como por exemplo o isolado 01 (Gráfico 1) que possuiu a maior média para a inibição de *Clavibacter michiganensis*, porém, a menor média de diâmetro para inibição de *Curtobacterium flaccumfaciens*. Por outro lado, foi possível observar em isolados como a bactéria 20, o potencial de inibição para ambos os patógenos de forma contínua, indicando que tal individuo

possui maior espectro de inibição quando comparado aos demais microrganismos

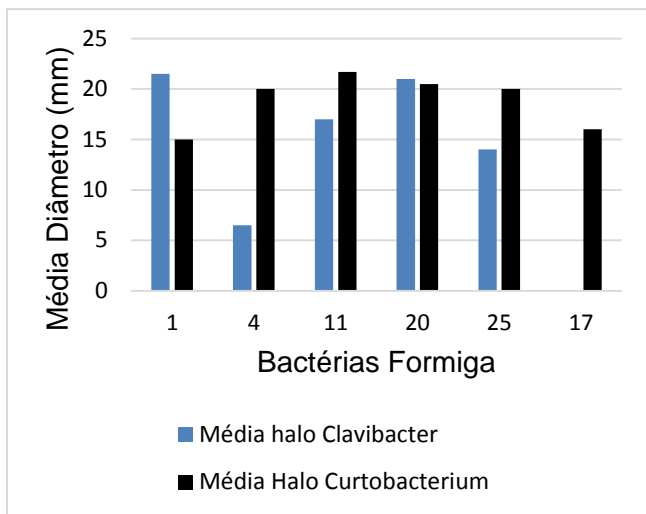


Gráfico 1. Diâmetros de inibição médio obtido pelas bactérias frente as fitopatógenos *Clavibacter michiganensis* e *Curtobacterium flaccumfaciens*.

Avaliando o potencial de biocontrole de rizobactérias frente a *Ralstonia solanacearum* pelo método de sobrecamada, Rocha e Moura (2013), também observaram comportamento variado quanto a capacidade de inibição das bactérias frente ao patógeno, no qual, alguns isolados se destacaram com os maiores halos de inibição e outros não, sendo explicado pela sensibilidade aos compostos produzidos variar em função do patógeno. Já Mattana (2017), avaliando o potencial de bactérias endofíticas com atividade antagônica contra *Xanthomonas gardneri* e *Pseudomonas syringae in vitro*, observou que a maioria dos isolados testados apresentou halo de inibição somente contra um tipo de patógeno. Neste mesmo trabalho, Mattana, observou que apenas 4

isolados dos 34 testados, apresentaram capacidade de inibir o desenvolvimento de ambos os patógenos.

De acordo com Rocha e Moura (2013), os estudos de antagonismo *in vitro* é um dos métodos que vem sendo utilizados para selecionar microrganismos potenciais. Sendo assim, torna-se necessário cada vez mais, o desenvolvimento de novos estudos de bioprospecção com o intuito de investigar o potencial de novas bactérias para serem utilizadas como agentes de controle biológico.

Nesse sentido, a investigação de bactérias envolvidas em relações mutualísticas pode representar uma nova oportunidade para a identificação microrganismos de potencial biotecnológico (DELLA LUCIA; SOUZA, 2011). Nestes sistemas complexos estabelecidos evolutivamente (NICKELE et al., 2013), podem ser encontradas estirpes com capacidade de inibir o desenvolvimento de um amplo espectro de fitopatógenos. Estudos sobre suas funcionalidade e metabólitos, podem levar ao desenvolvimento de bioprodutos e bioprocessos que futuramente poderão permitir aplica-los no controle de diversas doenças mitigando o uso indevido de defensivos e agrotóxicos na produção de alimentos.

Conclusões

Levando em consideração os resultados obtidos, as formigas cortadeiras pode representar uma fonte de

investigação para a bioprospecção de novos microrganismos com potencial para agentes de controle biológico. Sendo assim, torna-se necessário a realização de novas pesquisas para avaliar as aptidões destas bactérias no controle de outros patógenos.

Bibliografía

Dângelo, R. A. C., de Souza, D. J., Mendes, T. D., Couceiro, J. D. C., & Lucia, T. M. C. D. (2016). Actinomycetes inhibit filamentous fungi from the cuticle of *Acromyrmex* leafcutter ants. *Journal of basic microbiology*, 56(3), 229-237.

de Castro Assumpção, L., Lacava, P. T., Dias, A. C. F., de Azevedo, J. L., & Menten, J. O. M. (2010). Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 44(5), 503-510.

Della Lucia, T. M. C., & Moreira, D. D. O. (1993). Caracterização dos ninhos. *As formigas cortadeiras. Viçosa: Folha de Viçosa*, 32-42.

Della Lucia, T. M. C., & Souza, D. J. (2011). Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. *DELLA LUCIA, TMC Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo. Viçosa-MG: UFV*, 13-26.

Egamberdieva, D. (2016). *Plant-growth-promoting Rhizobacteria (pgpr) and Medicinal Plants*. S. Shrivastava, & A. Varma (Eds.). Springer.

Garcia, T. V., Knaak, N., & Fiuza, L. M. (2015). Endophytic bacteria as

biological control agents in rice fields. *Arquivos do Instituto Biológico*, 82, 1-9.

Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.

Kooij, P. W., Rogowska-Wrzęsinska, A., Hoffmann, D., Roepstorff, P., Boomsma, J. J., & Schiøtt, M. (2014). *Leucoagaricus gongylophorus* uses leaf-cutting ants to vector proteolytic enzymes towards new plant substrate. *The ISME journal*, 8(5), 1032.

Kupper, K. C., Cervantes, A. L. L., Klein, M. N., & da Silva, A. C. (2013). Avaliação De Microrganismos Antagônicos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 425-436.

Lopes, C. A. (2009). Murcha bacteriana ou murchadeira: uma inimiga do tomateiro em climas quentes. *Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.

Mattana, J. (2017). *Caracterização de bactérias endofíticas para o controle da mancha bacteriana do tomateiro* (dissertação de mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

Morandi, M. A. B., & Bettiol, W. (2009). Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna*, 7-14.

Nickele, M. A., Pie, M. R., Reis Filho, W., & Penteado, S. D. R. C. (2013). Formigas cultivadoras de fungos: estado da arte e direcionamento para pesquisas futuras. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 33(73), 53-72.

Ocampos, C. J. G. (2010). *Bactérias isoladas do filoplano no biocontrole da alternariose e da podridão negra da couve* (dissertação de mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.

Pagnocca, F. C., Rodrigues, A., & Bacci Júnior, M. Microrganismos associados às formigas-cortadeiras. *DELLA LUCIA, TMC Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo. Viçosa-MG: UFV*, 263-283.

Rocha, D. J. A., & Moura, A. B. (2013). Controle biológico da murcha de tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *licopersici* por rizobactérias. *Tropical Plant Pathology*, 38(5), 423-430.

Rodrigues Neto, J. (1986). Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathol*, 12, 16.

Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K., & Grossart, H. P. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in microbiology*, 4, 47.

Shiomi, H. F., Melo, I. S. D., & Minhoni, M. T. D. A. (2015). Assessing of endophytic bacteria for biological control of northern corn leaf blight (*Exserohilum*

turcicum). *Arquivos do Instituto Biológico*, 82, 1-4.

Shirling, E. B., & Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol*, 313–340.

Yano, D. M. Y. (1993). Técnicas assépticas e semeadura de microrganismos. In: Yano, D. M. Y.; Farris, M. G.; Umino, C. Y.; Coutinho, H. L. C.; Canhos, V. P. *Técnicas para cultivo, identificação e preservação de bactérias*. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1-9.