Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Simbiontes de insetos como endofíticos: a interação *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) - *Zea mays* L. (Poales: Poaceae)

Diandra Achre

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2018

Diandra Achre
Engenheira Agrônoma

Simbiontes de insetos como endofíticos: a interação *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) - *Zea mays* L. (Poales: Poaceae)

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO LUIS CÔNSOLI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Achre, Diandra

Simbiontes de insetos como endofíticos: a interação *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) - *Zea mays* L. (Poales: Poaceae) / Diandra Achre. - - Piracicaba, 2018.

73 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Controle de praga 2. Interação inseto-planta 3. Promotor de crescimento 4. Simbionte I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Selvino e Jaqueline, pelo amor, apoio, incentivo e compreensão durante todo o processo de formação do mestrado

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nos dar força, persistência e coragem para nunca desistir de nossos sonhos.

Aos meus pais, Jaqueline e Selvino Achre, por todos os conselhos, incentivo, amor e conforto nos momentos difíceis, a quem devo todo o respeito e gratidão.

Aos meus irmãos Edivaldo e Antonio Sandro, suas esposas Solange e Leicyane e meus sobrinhos, pelas conversas, risos, incentivo, amizade, cumplicidade e pela demonstração de amor.

Ao querido Rafael Massahiro Yassue, pela ajuda durante todo o mestrado nos experimentos, pelos bons conselhos, pelas críticas quando necessárias, mas sobretudo pela amizade, carinho e todo apoio. Sem você tudo teria sido mais difícil.

Ao Prof. Dr. Fernando Luís Cônsoli, meu orientador, muito obrigada pela oportunidade, amizade, confiança, exigência, que contribuíram muito para minha formação profissional e também pessoal.

À amiga mais do que especial Ana Flávia Canovas Martinez pelas conversas, amizade e pela ajuda em todo o meu trabalho; com certeza uma amizade que levarei pela vida toda em meu coração.

À amiga Marcele Coelho, Especialista de Laboratório do Laboratório de Interações em Insetos, pela dedicação, companhia e disposição na condução dos experimentos. Uma pessoa admirável.

Ao amigo Luís Gustavo de Almeida, pelo acompanhamento, disposição e por toda ajuda no início dos meus experimentos.

À amiga Wanessa Scopel, pelas noites que passou comigo no laboratório, conversando e me ajudando sempre.

Aos amigos Ana Flávia Canovas Martinez, Ana Flávia Gomes, Bianca Carbogim, Camila B. Gächter Skanata, Fábio Ramon Martins Duarte, Fábio Cleisto Alda Dossi, Iara Donadão Preto, Leticia Slongo, Luís Gustavo de Almeida, Marcele Coelho, Nathalia Cavichiolli de Oliveira, Taísa Pavani e Wanessa Scopel, pelas horas agradáveis, dentro e fora do laboratório, companheirismo, conversas, momentos de descontração e muitas risadas.

Aos amigos do Laboratório de Interações em Insetos, Bruna Laís Merlin, Caio Zitelli, Camila Paiva, Eloisa Torrezan, Felipe Domingues, Mariane Possignolo e Pedro Rodrigues, pelo agradável convívio e pelos auxílios prestados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo fornecimento da bolsa e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a condução dos experimentos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pelas excelentes aulas ministradas.

Ao Adriano Frizon e a Empresa Fistarol, pela disponibilização das sementes de milho.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO **8**

ABSTRACT **9**

LISTA DE FIGURAS **10**

LISTA DE TABELAS **12**

1. INTRODUÇÃO **13**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **15**

2.1. MICROBIOTA ASSOCIADA A INSETOS 15

2.2. INTERAÇÕES INSETO-SIMBIONTE-PLANTA 16

2.3. MICROBIONTES COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS 17

2.4. VIAS DE SINALIZAÇÃO DE RESPOSTA DE DEFESA DA PLANTA À HERBIVORIA 18

3. MATERIAL E MÉTODOS **21**

3.1. CRIAÇÃO DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* 21

3.2. ISOLAMENTO E CULTIVO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO TRATO DIGESTIVO DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* . 21

3.3. IDENTIFICAÇÃO PUTATIVA DAS BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS ASSOCIADAS AO TRATO DIGESTIVO DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* 22

3.4. EFEITO DE ISOLADOS DA MICROBIOTA DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DO MILHO 24

3.4.1. Cultivo e manutenção das plantas 24

3.4.2. Preparação do inóculo 25

3.4.3. Disponibilização dos microrganismos selecionados às plantas de milho 26

3.4.4. Avaliação do papel de isolados de bactérias no crescimento da planta 27

3.5. RESPOSTA À HERBIVORIA 29

3.5.1. Preferência alimentar e área foliar consumida por *Spodoptera frugiperda* ... 29

3.5.2. Sobrevivência de *Spodoptera frugiperda* 30

3.5.3. Consumo e utilização do alimento por *Spodoptera frugiperda* 31

4. RESULTADOS **35**

4.1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO TRATO DIGESTIVO DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* 35

4.2. EFEITO DA MICROBIOTA DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* NO CRESCIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE MILHO . 38

4.3. AVALIAÇÃO DA PREFERÊNCIA ALIMENTAR DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* E DA ÁREA FOLIAR CONSUMIDA DE FOLHAS DE PLANTAS TRATADAS COM DIFERENTES BACTÉRIAS 45
4.4. SOBREVIVÊNCIA 45
4.5. AVALIAÇÃO DE CONSUMO E UTILIZAÇÃO DE ALIMENTOS 46
5. DISCUSSÃO 51
6. CONCLUSÃO 57
REFERÊNCIAS 59
ANEXOS 71

RESUMO

Simbiontes de insetos como endofíticos: a interação *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) - *Zea mays* L. (Poales: Poaceae)

Insetos representam a maioria dos seres vivos na Terra. O sucesso biológico desses organismos está, em parte, relacionado às associações com microrganismos que influenciam aspectos de sua bioecologia, incluindo as relações com o primeiro e terceiro níveis tróficos. Assim como os insetos, plantas também apresentam associações com microrganismos que podem interferir na sua nutrição e relação com patógenos e herbívoros. Esse trabalho buscou analisar a capacidade de simbiontes associados a insetos de atuar como endofíticos de planta e influenciar, assim, o potencial biótico da planta e a sua capacidade de defesa contra a herbivoria, utilizando o modelo milho - *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Quatro simbiontes de insetos foram selecionados. Três deles (IIL-Sfm05, IILSfc-sus01 e IIL-Sfb05) associados ao trato digestivo de *S. frugiperda* e outro (IIL-ASP45) de *Acromyrmex coronatus* (IIL-ASP45). Adicionalmente, um endofítico (IILzm-Idp03) isolado do próprio milho foi adicionado como controle positivo. Os ensaios foram conduzidos após cultivo de sementes inoculadas com os diferentes microrganismos via *bio-priming*, aplicação no solo e aplicação foliar. Dos cinco isolados testados, três (IILSfc-sus01, IIL-Sfb05 e IILzm-Idp03) induziram maior crescimento em plantas de milho; porém, a forma de disponibilização dos microrganismos influenciou a resposta da planta. O isolado IILzm-Idp03 induziu o maior crescimento da planta pela sua disponibilização via *bio-priming;* IILzm-Idp03 e IIL-Sfb05 via inoculação do solo; e o isolado IILSfc-sus01 via inoculação foliar. Testes biológicos com *S. frugiperda* em plantas de milho inoculadas ou não com os microrganismos selecionados indicaram que dois deles (isolados IIL-Sfb05 e IIL-ASP45) resultaram em relações patogênicas, chegando à induzir a completa mortalidade de insetos alimentados em tecidos foliares de plantas inoculadas com esses microrganismos. Testes de preferência alimentar demonstraram que as lagartas não foram influenciadas pela alimentação com folhas de plantas inoculadas com as bactérias via *bio-priming*. Estudos comparativos dos índices nutricionais de plantas tratadas com as diferentes bactérias, indicaram que aquelas tratadas com IIL-ASP45 resultaram no menor crescimento e desenvolvimento larval de *S. frugiperda*, corroborado pelo menor consumo e índices nutricionais alcançados nessa fonte de alimento. A alimentação em plantas tratadas com IIL-Sfb05 causou 100% de mortalidade larval, não sendo possível a avaliação dos índices nutricionais. Os resultados desse trabalho demonstram o potencial de manipulação da planta hospedeira por bactérias associadas ao herbívoro, bem como o potencial biocida de microrganismos associados a insetos.

Palavras-chave: Controle de pragas; Interação inseto-planta; Promotor de crescimento; Simbionte

ABSTRACT

Symbionts of insects as endophytes: the interaction *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) - *Zea mays* L. (Poales: Poaceae)

Insects represent most of the living things on Earth. The biological success of these organisms is in part related to associations with microorganisms that influence aspects of their bioecology, including relationships with the first and third trophic levels. Like insects, plants also have associations with microorganisms that may interfere in their nutrition and interactions to pathogens and herbivores. This work sought to assess the potential of symbionts associated with insects to act as plant endophytes and thus to influence plant growth and its utilization by the herbivory using the maize - *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) model system. Four insect symbionts were selected. Three of them (IIL-Sfm05, IILSfc-sus01 and IIL-Sfb05) associated with the digestive tract of *S. frugiperda* and another (IIL-ASP45) with the cuticle of *Acromyrmex coronatus* (IIL-ASP45). Additionally, an endophyte (IILzm-Idp03) from maize was added as a positive control. Experiments were conducted after inoculation of the different microorganisms via *bio-priming*, soil application and foliar application. Of the five isolates tested, three (IILSfc-sus01, IIL-Sfb05 and IILzm-Idp03) induced higher growth in maize plants; however, the inoculation of the seeds with the microorganisms influenced the plant response. The isolate IILzm-Idp03 induced the highest plant growth when inoculated via bio-priming; IILzm-Idp03 and IIL-Sfb05 via soil inoculation; and IILSfc-sus01 via foliar inoculation. Biological tests with *S. frugiperda* on maize plants inoculated or not with the selected microorganisms indicated that two of them (IIL-Sfb05 and IIL-ASP45 isolates) were highly pathogenic, inducing very high larval mortality. Our analysis indicated no changes in larval feeding preference. Comparative analysis of larval food consumption and utilization indicated that plants inoculated with IIL-ASP45 resulted in the lowest growth and larval development of *S. frugiperda*, corroborated by the lower consumption and nutritional indexes reached in this food source. Feeding in plants inoculated with IIL-Sfb05 caused 100% larval mortality, and it was not possible to evaluate the nutritional indexes. Our data demonstrate the potential for manipulation of the host plant by bacteria associated with the herbivore, as well as the biocidal potential of insect - associated microorganisms.

Keywords: Insect-plant interaction; Growth promoter; Pest control; Symbiont

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) da estrutura para cultivo protegido, no período dedicado aos ensaios (23 de março a 04 de maio de 2017). 25

Figura 2. Inoculação via foliar de isolados de bactérias em plantas de milho. Lixa usada para o ferimento e detalhe da folha do milho ferida e tratada com solução das bactérias selecionadas para avaliação..... 27

Figura 3. Imagem ilustrativa de ensaio de preferência alimentar de lagartas de segundo ínstar de *Spodoptera frugiperda* oferecidas folhas de milho de plantas tratadas com bactérias simbiontes de inseto e endofítica de milho. 29

Figura 4. Abundância de morfotipos de bactérias isoladas do trato intestinal (20) e das fezes (24) de lagartas de *Spodoptera frugiperda,* cultivadas em diferentes meios: Luria Bertani (LB), ágar nutriente (NA), ISP2, SM3 e ISP4. 35

Figura 5. Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-joining* a partir das sequências da região 16S rDNA (1400 pb) dos isolados obtidos do intestino de lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Os valores nos diferentes ramos correspondem aos valores de *bootstrap*. A barra de escala indica 0,02 substituição por posição de nucleotídeo. 37

Figura 6. Porcentagem de plântulas de milho emergidas após a semeadura. Plantas de milho inoculadas com diferentes bactérias via semente (*bio-priming*) (A) e solo (B). 39

Figura 7. Altura (a, b), diâmetro de colmo (c, d) e número de folhas (e, f) de plantas de milho tratadas com diferentes bactérias via *bio-priming* e disponibilização pela incorporação ao solo após diferentes períodos (dias) de avaliação após a emergência (DAE). 43

Figura 8. Altura, diâmetro de colmo e número de folha de plantas de milho inoculadas com bactérias via tratamento foliar. Avaliações realizadas a 12 e 30 dias após a emergência (DAE).44

Figura 9. Número médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* e área foliar consumida/lagarta (cm²) após 24 horas de exposição a discos foliares obtidos de plantas de milho tratadas com diferentes bactérias, em testes de livre chance de escolha. 45

Figura 10. Sobrevivência (%) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas folhas de plantas de milho inoculadas com diferentes bactérias. 46

Figura 11. Análise de componentes principais das variáveis relacionadas com o consumo e utilização de alimento de *Spodoptera frugiperda* alimentada com milho inoculadas via semente com as bactérias IIL-Sfm05, IILSfc-sus01, IILzm-Idp03, IIL-ASP45 e controle. (RCR=taxa de consumo relativo; RGR= taxa de crescimento relativo; RMR= taxa metabólica relativa; ECI= eficiência de conversão do alimento ingerido; ECD= eficiência de conversão do alimento digerido e DA= digestibilidade aproximada). Proporção da variação acumulada pelos componentes principais PC1 e PC2 de 87,47% e 98,82%, respectivamente. 48

Figura 12. Dendograma obtido a partir das distâncias euclidianas das variáveis RCR=taxa de consumo relativo; RGR= taxa de crescimento relativo; RMR= taxa metabólica relativa; ECI= eficiência de conversão do alimento ingerido; ECD= eficiência de conversão do alimento digerido e DA= digestibilidade aproximada, relacionadas com o consumo e utilização de alimento de *Spodoptera frugiperda* alimentada com milho inoculadas via semente com as bactérias IIL-Sfm05, IILSfc-sus01, IILzm-Idp03, IIL-ASP45 e controle. 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação por similaridade comparada com sequências depositadas no banco do NCBi e do EzTaxon-e das sequências do gene 16S rRNA de bactérias simbiontes de lagartas de *Spodoptera frugiperda*. 36

Tabela 2. Índice de velocidade de emergência (IVE) e emergência (%) de plântulas de milho inoculadas via semente (*bio-priming*) e via solo com diferentes bactérias 39

Tabela 3. Massa seca de parte aérea de plantas de milho tratadas com diferentes bactérias via *bio-priming*, disponibilização via solo ou foliar 41

Tabela 4. Massa seca da raiz de plantas de milho tratadas com diferentes bactérias via *bio-priming*, disponibilização via solo ou foliar 41

Tabela 5. Razão da massa seca da parte aérea e da massa seca da raiz de plantas de milho tratadas com diferentes bactérias via *bio-priming*, disponibilização via solo ou foliar 41

Tabela 6. Taxa de consumo relativo (RCR), taxa crescimento relativo (RGR), taxa metabólica relativa (RMR), eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI), eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) e digestibilidade aproximada (DA) para lagartas de *Spodoptera frugiperda* de segundo a quarto ínstar, alimentadas com folhas de plantas de milho tratadas com diferentes bactérias 47

1. INTRODUÇÃO

Os insetos representam a maioria da biodiversidade da Terra, tendo originado há pelo menos 400 milhões de anos (GRIMALDI; ENGEL, 2005). Uma das chaves para o sucesso biológico desse grupo de artrópodes é o estabelecimento de associações com microrganismos simbiontes (KIKUCHI et al., 2009). Associações de simbiose levam a mudanças que beneficiam o seu hospedeiro, melhorando a resposta do sistema imunológico do hospedeiro contra patógenos e parasitoides, por exemplo (FELDHAAR, 2011; FLÓREZ et al. 2015). As associações de simbiose mais evidentes são aquelas relacionadas à adaptação nutricional, que contribuem para a melhor aquisição de nutrientes e processamento da dieta, fornecendo, ao inseto, nutrientes que de outra forma estariam indisponíveis (DOUGLAS, 2009).

A associação insetos – simbiontes benéficos é comum àqueles insetos que utilizam recursos alimentares de composição nutricional restrita, como os sugadores de seiva, que contam com dieta pobre em aminoácidos essenciais, e os fitófagos e xilófagos, os quais fazem uso de alimentos ricos em compostos estruturais não digeríveis, tais como celulose e lignina, e/ou alimentos com alta diversidade de xenobióticos com ação anti-herbivoria (DOUGLAS, 1998; SCHOONHOVEN et al., 2005). Com isso, microrganismos associados a insetos podem ser importantes mediadores de interações diretas e indiretas de herbívoros com suas plantas hospedeiras (BARBOSA et al., 1991). Um exemplo clássico é o dos pulgões que se alimentam de floema e a bactéria obrigatória *Buchnera aphidicola*, a qual é responsável pela síntese de aminoácidos essenciais e vitaminas que complementam o valor nutricional do recurso alimentar explorado, de forma a atender as exigências nutricionais do inseto (BAUMANN et al., 1995; MORAN et al., 2005; VAN HAM et al., 2005).

Para sua sobrevivência, as plantas respondem ao ataque de insetos herbívoros e patógenos ativando suas vias de defesa (KESSLER; BALDWIN, 2002). Quando ocorrem danos no tecido vegetal, as plantas iniciam a produção de moléculas sinalizadoras que ativam suas vias de defesa, como o ácido jasmônico (JA) e o etileno (ET) (PIETERSE et al., 2009). Insetos herbívoros de sucesso conseguem desenvolver estratégias para superar estas e outras vias de defesa da planta (SUGIO et al., 2014). Recentemente, foi demonstrado que o contato de microrganismos da microbiota intestinal de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)

(Lepidoptera: Noctuidae), eliminados junto aos *pellets* fecais das lagartas, com o tecido danificado da planta de milho, induziu a ativação dos mecanismos de defesa da planta, tornando a mesma menos suscetível ao ataque por patógenos, demonstrando que a microbiota de insetos pode modificar as interações estabelecidas pela planta (RAY et al., 2015). Além do contato via fezes, a microbiota associada a insetos pode entrar em contato com a planta hospedeira através de secreções orais da larva e oviposição, induzindo assim alterações na resposta de defesa das plantas hospedeiras (CHUNG et al., 2013; HILKER; MEINERS, 2006; SARMENTO et al., 2011). Além de influenciar a resposta imunológica de plantas hospedeiras, a microbiota associada a insetos também pode afetar o crescimento de plantas devido à maior fixação de nitrogênio e produção de ácido indol 3-acético (IAA) e ácido salicílico (INDIRAGANDHI et al., 2008).

Com base em todos os aspectos que podem ser influenciados pela interação planta-inseto-microrganismos simbiontes, esse trabalho visa entender o papel de componentes da microbiota intestinal de *S. frugiperda* na modificação da interação herbívoro - planta e na capacidade de crescimento de plantas de milho. O melhor conhecimento dessas relações levará ao maior entendimento das interações inseto-simbionte-planta e à exploração racional de novas formas de controle dessa praga ou de promoção de crescimento de plantas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microbiota associada a insetos

O conceito de simbiose foi descrito pela primeira vez por De Barry, em 1789, em seu trabalho intitulado “Die Erscheinung der Symbiose”, no qual definiu simbiose como um fenômeno em que organismos diferentes vivem juntos, ocorrendo com frequência entre eucariotos e microrganismos (OULHEN et al., 2016). As associações de simbiose ocorrem em uma ampla gama de seres vivos, de organismos unicelulares a multicelulares, de procariotos a eucariotos, de plantas a animais e de invertebrados a vertebrados (LI et al., 2008; MARGULIS; FESTER, 1991; ZILBER-ROSENBERG; ROSENBERG, 2008). Rizobactérias são exemplos de microrganismos que vivem em simbiose com plantas, estabelecendo relação de mutualismo na qual induzem o crescimento das plantas, enquanto as mesmas fornecem carbono derivado da fotossíntese para o seu metabolismo (OLDROYD, 2013; VESSEY, 2003).

Relações de simbiose podem ser basicamente de parasitismo, mutualismo e comensalismo, na qual cada interação pode ser benéfica ou prejudicial para os indivíduos envolvidos, dependendo das diferentes fases de sua história de vida ou das condições ambientais em que se encontram. Quando um simbionte afeta negativamente seu hospedeiro, a relação é de parasitismo; comensalismo é quando uma das espécies se beneficia sem afetar a outra espécie; no mutualismo, o benefício é reciproco ao hospedeiro e simbionte (BOUCHER, 1982; KLEPZIG et al., 2009; PARMENTIER; MICHEL, 2013).

Os insetos são o grupo de organismos mais rico em espécies (GIL et al., 2004). Um dos fatores chave no sucesso evolutivo desse grupo é a associação com microrganismos simbiontes que oferecem o enriquecimento nutricional aos hospedeiros, levando à adaptação a uma grande variedade de dietas (DOUGLAS, 1989; DALE; MORAN, 2006; ISHIKAWA, 2003; MORAN; BAUMANN, 2000).

Os simbiontes de insetos podem ser vírus, fungos, protistas ou bactérias; podem estar localizados externamente, os ectossimbiontes, ou internamente ao corpo do hospedeiro, conhecidos como endossimbiontes (KIKUCHI, 2009; MORAN, 2006). Endossimbiontes associam-se normalmente ao lúmen intestinal, hemocele e espaços intracelulares de seus hospedeiros, podendo ser obrigatórios ou facultativos (HOSOKAWA et

al., 2006; KIKUCHI; HOSOKAWA; FUKATSU, 2007). Simbiontes localizados em estruturas celulares especializadas (bacteriócitos) e que apresentam papel nutricional são denominados de obrigatórios ou primários, já que se tornam fonte indispensável de nutrientes essenciais ao hospedeiro (BOUTZIS; MILLER, 2003; PONTES; DALE, 2006; WERNEGREEN, 2002). Simbiontes facultativos ocorrem intra ou extracelularmente e têm associação esporádica com seus hospedeiros. Esses simbiontes podem estabelecer relações diversas, visto que em alguns casos atuam como mutualistas, enquanto que em outros como patógenos (CHEN; PURCELL, 1997; FUKATSU et al., 2000; PONTES; DALE, 2006; FUKATSU et al., 2000; PONTES; DALE, 2006; OLIVER et al., 2003)

2.2. Interações inseto-simbionte-planta

As bactérias simbiontes representam elementos fundamentais nas interações inseto-planta, já que podem influenciar aspectos da fisiologia, ecologia, reprodução e comportamento de seus hospedeiros, o inseto (LEUNG; POULIN, 2008; MORAN, 2006). Um grande número de insetos herbívoros abrigam bactérias simbiontes e, como consequência, são capazes de prosperar em fontes de alimento de valor nutricional limitado, ou seja, dieta pobre em nutrientes para seu desenvolvimento e sobrevivência (CLARK et al., 2010).

Na presença da herbivoria ou de danos mecânicos, os níveis de compostos de defesa da planta aumentam, começando, assim, uma batalha entre planta e herbívoro. Essas defesas induzidas consistem em três principais componentes: I) de percepção; II) de regulação; e III) de defesa (WU; BALDWIN, 2010). Um desses sistemas de reconhecimento ou percepção do herbívoro envolve a presença de moléculas exógenas que são fornecidas às células de plantas através de secreções do inseto herbívoro, provocando uma resposta de defesa no hospedeiro (HOWE; JANDER, 2008).

A resposta de defesa da planta depende da estrutura bucal do herbívoro (MITHOFER; BOLAND, 2008). Insetos mastigadores podem depositar pequenas quantidades de saliva ou secreções orais no tecido vegetal danificado, e os componentes ativos presentes na saliva/secreções orais, denominados de elicitores associados a herbívoros (Haes) ou padrões moleculares associados a herbívoros (Hamps) (ERB et al., 2012; SCHMELZ et al., 2009), que induzem respostas específicas de defesa à herbivoria (BONAVENTURE et al., 2011; BONAVENTURE, 2012). Essas respostas podem envolver alterações metabólicas, como

a ativação da via do ácido jasmônico (JA), que resulta na alteração da expressão gênica e no padrão de crescimento e desenvolvimento das plantas (BONAVENTURE et al., 2011; KESSLER; BALDWIN, 2002).

2.3. Microbiontes como promotores de crescimento de plantas

A procura de novas formas de produção de alimentos de maneira sustentável se faz urgente, dado o crescente aumento da população mundial, aliado ao uso intensivo da terra e dos recursos naturais, assim como o uso intensivo de adubos químicos e inseticidas (LIU et al., 2015). Na literatura há relatos que comprovam os efeitos benéficos de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BATISTA et al., 2018; EGAMBERDIYEVA, 2007; HAYAT et al., 2010) .

Um dos grupos mais estudados de bactérias promotoras de crescimento de plantas é o das rizobactérias. Rizobactérias podem ser definidas como bactérias indispensáveis presentes na rizosfera das raízes da planta que, quando associadas, podem estimular o crescimento da planta hospedeira (BHATTACHARYYA, 2012). Rizobactérias podem atuar como bioestimuladores, auxiliando na fixação biológica de nitrogênio e na mineralização do fósforo (VESSEY, 2003; HAYAT et al., 2010), fitoestimuladores, produzindo fitormônios (BATISTA et al., 2018; SOMERS et al., 2004), e biopesticidas (LEONG, 1986; CHATTERTON; PUNJA, 2009; CHANDLER et al., 2008).

A coevolução entre plantas, bactérias e insetos ocasionou uma elevada inter-relação entre eles (WIELKOPOLAN; OBRĘPALSKA-STĘPLOWSKA, 2016). Indiragandhi et al. (2008), em estudo com bactérias isoladas a partir do intestino de *Plutella xylostella,* observaram que os isolados eram capazes de produzir ácido indol-3-acético (IAA) e ácido salicílico, além de realizar fixação biológica de nitrogênio. Estes mesmos autores observaram a capacidade destas bactérias em estimular o crescimento de plantas de tomate e canola.

Esses estudos apontam para a capacidade de rizobactérias e de bactérias associadas a insetos de induzir i) o crescimento da planta e ii) a resistência a doenças e ao padrão de herbivoria de insetos praga.

2.4. Vias de sinalização de resposta de defesa da planta à herbivoria

Plantas são fontes de alimentos para diversas espécies de insetos. Sendo assim, os insetos utilizam-se de várias estratégias para obter o máximo de nutrientes necessário. Nas relações inseto-planta, ambas as partes enviam e recebem sinais químicos que determinam o resultado dessa interação. O contato dos quimiorreceptores dos insetos presentes no aparelho bucal, nas antenas e nos tarsos, por exemplo, servem para avaliar a adequação da planta como fonte de alimento. De forma semelhante, as células vegetais apresentam mecanismos de percepção que permitem reconhecer e responder ao movimento, ferimento pela alimentação e compostos presentes nas secreções orais de insetos, desencadeando, por fim, respostas do sistema imunológico (HOWE; JANDER, 2008). A ativação do sistema imunológico pode ocorrer em resposta a fitormônios, que são pequenas moléculas essenciais para a regulação do crescimento, desenvolvimento, reprodução e sobrevivência das plantas. Os fitormônios agem como moléculas de sinalização, ocorrendo em baixas concentrações. Fitormônios como o ácido jasmônico (JA), ácido salicílico (AS) e etileno (ET) desempenham papel fundamental na indução de respostas de defesa da planta (DICKE; POECKE, 2002; PIETERSE et al., 2009).

Howe e Jander (2008) mostraram que o ácido jasmônico possui função de sinalização de compostos de regulação endógena da resistência de plantas a herbívoros, promovendo a reprogramação do sistema de expressão de genes de defesa e a regulação dessa resposta. O ácido salicílico, por outro lado, interfere nas respostas mediadas pelo ácido jasmônico, envolvidas na defesa contra herbivoria por artrópodes, bloqueando a biossíntese do ácido jasmônico e induzindo a expressão de genes ligados à resposta antimicrobiana (DOARES et al., 1995). As vias JA e ET agem em conjunto, regulando os níveis um do outro, quando são causados ferimentos às plantas (DONNELL et al., 1996).

O envolvimento de fitormônios na imunidade da planta sugere que o controle do crescimento, desenvolvimento e defesa estão interligados em uma complexa rede de vias de sinalização cruzada. A grande importância da regulação dessa rede se dá pelo fato de permitir que as plantas se adaptem rapidamente ao seu ambiente, utilizando seus recursos de forma eficiente. Acredita-se que a regulação desses hormônios às respostas de defesa induzidas evoluiu para economizar energia em condições desfavoráveis, como a de danos

por patógenos ou insetos, envolvendo custos somente quando as defesas são ativadas (PIETERSE et al., 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Criação de *Spodoptera frugiperda*

Os insetos utilizados nos experimentos foram provenientes de criação estoque de *S. frugiperda* mantida em condições de laboratório. Lagartas recém-eclodidas foram mantidas em recipientes plásticos (100 mL) contendo dieta artificial à base de feijão, germe de trigo e levedura de cerveja, segundo Greene et al. (1976). Após atingirem o segundo instar, as larvas foram acondicionadas individualmente em recipientes de plástico (50 mL) contendo dieta artificial, onde permaneceram até a fase de pupa. Posteriormente, as pupas foram transferidas para recipientes de acrílico (13 x 13 x 3,5 cm) forrados com papel filtro levemente umedecido com água estéril para a emergência dos adultos. Adultos recém-emergidos foram transferidos para gaiolas de PVC (10 x 22 cm) revestidas com papel sulfite como substrato para a oviposição, contendo seis casais por gaiola, alimentados com solução de mel a 10%. Os insetos foram mantidos em condições controladas de criação (25±1°C; 70±10% U.R.; fotofase de 14 h).

3.2. Isolamento e cultivo de bactérias associadas ao trato digestivo de *Spodoptera frugiperda*

Lagartas de quinto ínstar de *S. frugiperda* foram esterilizadas superficialmente em banhos sucessivos em 5% de hipoclorito de sódio (1x - 5 min), 70% etanol (1x - 5 min) e enxague final em água deionizada estéril (3x - 1 min). As lagartas esterilizadas foram dissecadas em solução salina estéril (0,8 % NaCl) em capela de fluxo laminar para a obtenção do trato digestivo. O trato digestivo foi lavado em banhos sucessivos em solução salina estéril e armazenados em recipientes plásticos estéreis contendo 1 mL de solução salina para posterior cultivo da microbiota obtida. Também foram coletados *pellets* fecais de lagartas de último ínstar de *S. frugiperda* contidos no recipiente de sua criação, sendo 500 mg adicionado a 10 mL de solução salina. Tanto o intestino quanto as fezes foram macerados com auxílio de pistilo estéril em condições assépticas até a completa homogeneização das amostras.

As amostras obtidas foram utilizadas para o plaqueamento dos meios de cultura utilizados, seguindo a proporção de 1 inseto equivalente/mL de solução salina. Diluições

seriadas (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000), para cada amostra obtida, foram preparadas e 50 µL de cada solução foram inoculados nos seguintes meios de cultivo: ágar nutriente - NA (Acumedia®), Luria Bertani - LB (Acumedia®), SM3 (TAN et al., 2006), ISP2 e ISP4 (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966). O material foi incubado a 28°C para o crescimento das colônias, sendo as placas monitoradas diariamente até a observação de crescimento de colônias. As colônias foram isoladas de acordo com suas características morfológicas (tamanho, cor e formato) em cada meio de cultura testado. Cada morfotipo/meio de cultura foi amostrado (3 isolados para cada morfotipo/meio) e cultivado em meio líquido (o mesmo utilizado para o isolamento inicial, exceto para o meio NA que foi substituído por LB) para posterior extração do DNA genômico e identificação putativa pela análise do gene 16S do RNA risobossomal (16S rRNA).

3.3. Identificação putativa das bactérias cultiváveis associadas ao trato digestivo de *Spodoptera frugiperda*

Os morfotipos selecionados foram cultivados a 28°C, por 24 h, sob agitação constante (120 rpm), em 2 mL do mesmo meio de cultivo líquido em que a bactéria foi isolada, sendo que uma alíquota de 1 mL foi utilizada para a extração de DNA genômico (gDNA). O gDNA obtido foi utilizado para a identificação putativa e análise sistemática dos isolados obtidos. O restante das células obtidas no cultivo foi preservado em solução de 20% glicerol. Os microrganismos preservados foram depositados na Coleção de Simbiontes de Insetos, mantidos a -80°C. Todos os isolados também foram mantidos em meio sólido e utilizados nos ensaios propostos.

Os isolados foram caracterizados e identificados putativamente por análises de PCR-RFLP do gene 16S do RNA ribossomal como marcador molecular. Para essas análises, o gDNA dos isolados foi extraído segundo Sunnucks e Hales (1996). A qualidade do material genético extraído foi verificada em espectrofotômetro Epoch™ e por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (w/v) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, em tampão 1x TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH=7,2), sob voltagem constante de 100 V. A visualização das bandas foi feita em transluminador UV acoplado a fotodocumentador (DNR Bioimaging Systems).

O gDNA obtido foi utilizado para a amplificação do gene 16S do rRNA por meio de reação de PCR utilizando 10-20 ng de amostra do gDNA, tampão da enzima (1x), 2 mM

$MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 0,32 µM de cada iniciador de um dos dois conjuntos utilizados, 8f e 1491r (8f - 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1491r - 5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3') ou 27f e 1525r (27f - 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; 1525r 5' -AAGGAGGTGWTCARCC-3') (WEISBURG et al., 1991) e 0,625 U Taq DNA polimerase (Promega), em reação com volume final de 25 µL. As amplificações para os iniciadores 8f e 1491r foram conduzidas em termociclador programado a 95°C por 4 min (1 ciclo); 95°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min (35 ciclos); e 72°C por 10 min (1 ciclo). Para os iniciadores 27f e 1525r, o termociclador foi programado a 95°C por 5 min (1 ciclo); 94°C por 15 s, 52°C por 30 s, 72°C por 2 min (35 ciclos); e 72°C por 5 min (1 ciclo). O produto da reação foi analisado em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, em voltagem constante de 100 V em tampão TAE 1x (40 mM tris-acetato, 1 mM EDTA, pH= 7,2) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A visualização das bandas foi feita em transluminador UV acoplado a fotodocumentador (DNR Bioimaging Systems).

Os amplicons obtidos foram submetidos à análise de polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*) via digestão com quatro enzimas de restrição informativas *Eco*RI, *Hinf*I, *Mse*I e *Dde*I (Promega). Uma alíquota de cada amostra de PCR foi digerida em mistura de reação (enzima, tampão e água), de acordo com as instruções do fabricante (Promega). Os produtos de digestão foram resolvidos via eletroforese em gel de agarose a 1,5%. O tamanho dos fragmentos de restrição foi estimado graficamente usando o programa GelQuant (DNR Bio-Imaging Systems Ltd.) e marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen) como referência. As amostras que compartilharam os mesmos perfis morfológicos, de crescimento e de RFLP foram agrupadas e um amplicon de referência foi selecionado para sequenciamento completo.

Os amplicons obtidos foram tratados com enzimas (exonuclease e fosfatase alcalina) para a eliminação de resíduos de iniciadores e dNTPs. Dez µL do produto de PCR foram misturados a 1 U de exonuclease (Promega) e 1 U de fosfatase alcalina (Promega). As amostras foram incubadas em termociclador programado a 37°C por 30 min e depois a 80°C por 15 min. Os amplicons purificados foram submetidos ao sequenciamento bidirecional pelo método de Sanger junto ao Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), da Universidade de São Paulo, utilizando os iniciadores originalmente empregados. Foram obtidos, aproximadamente, 1500 pb do gene 16S rRNA via sequenciamento com os iniciadores empregados na reação original de amplificação (TURNER et al., 1999).

As sequências de 16S rDNA obtidas foram visualizadas e editadas manualmente no programa FinchTV v1.4.0 (Geospiza Inc.) e montadas com auxílio da ferramenta BLAST. As sequências completas (≈ 1.500 pb) de bactérias mais próximas aos isolados foram obtidas e comparadas àquelas disponíveis junto aos bancos de dados do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) e do EzTaxon-e (http://www.ezbiocloud.net/identify; KIM et al., 2012). Em seguida, as sequências foram alinhadas com a ferramenta ClustalW disponível no programa MEGA 7.0 (KUMAR et al., 2016). Com a análise de distância por alinhamento par-a-par foi obtida os diferentes padrões de restrição para melhor selecionar as sequências para a árvore filogenética, onde sequências que compartilhavam acima de 99% de similaridade foram agrupadas e uma das sequências foi aleatoriamente selecionada como representativa do grupo. As sequências alinhadas foram submetidas ao processo de seleção do melhor modelo para a análise filogenética, utilizando das ferramentas disponíveis no MEGA7.0. Relações filogenéticas foram inferidas através do teste de *Neighbor-joining* para a obtenção da árvore filogenética, utilizando-se o modelo de distância Kimura 2- parâmetros, com 1.000 interações e valor do parâmetro gama de 0,22 (SAITOU; NEI, 1987).

3.4. Efeito de isolados da microbiota de *Spodoptera frugiperda* na germinação e crescimento do milho

3.4.1. Cultivo e manutenção das plantas

Sementes do híbrido 30F53 (Dupont Pioneer - híbrido convencional) foram semeadas em vasos de 1,5 L (12 x 14 x 8 cm) contendo terra vegetal (Fert Solo) autoclavada para eliminar a presença de microrganismos que pudessem interferir nos experimentos. Foram semeadas quatro sementes por vaso. O desbaste manual foi realizado seis dias após a semeadura, sendo mantida apenas uma planta por vaso, de tamanho padronizado, de aproximadamente 15 cm de altura. A adubação foi feita juntamente com a irrigação de forma a suprir as necessidades hídricas e nutricionais das plantas. Cada vaso recebeu, semanalmente, 100 mL de solução mineral (0,83 g/L de $MgSO_4$, 0,36 g/L de KNO_3, 0,14 g/L de MAP, 0,02 g/L de Zn, 0,03 g/L de Cu e 0,09 g/L de Fe) e 200 mL de solução nutritiva [0,08 g/L de NH_4NO_3 e 0,91 g/L de $Ca(NO_3)_2$] (RAIJ, 1991). Os vasos foram mantidos em condições

de cultivo protegido, com registro de temperatura e umidade relativa do ar com Data logger (Tinytag ultra 2) (Figura 1).

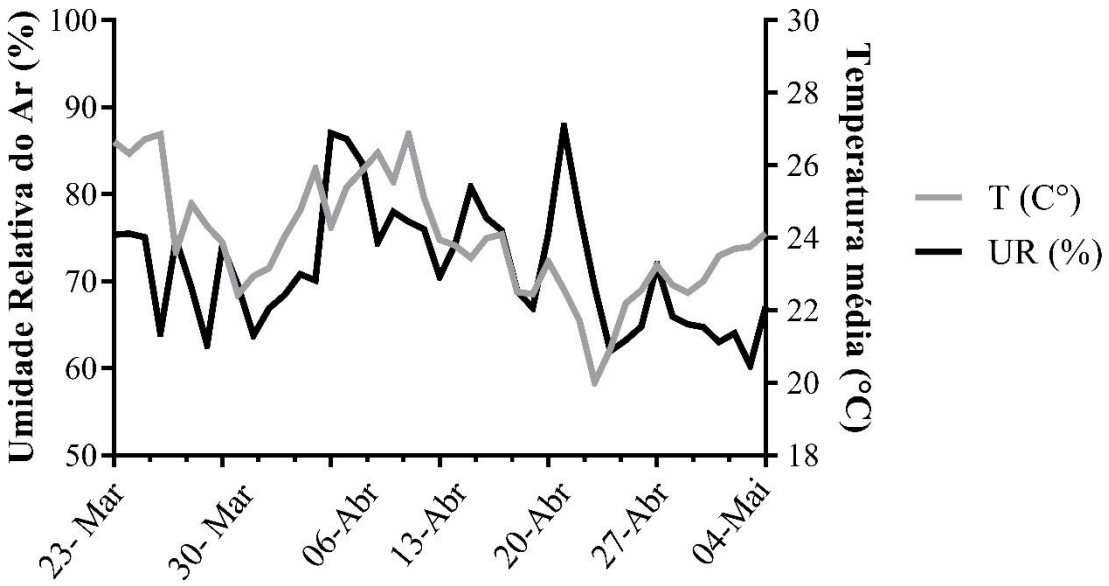

Figura 1. Temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) da estrutura para cultivo protegido, no período dedicado aos ensaios (23 de março a 04 de maio de 2017).

3.4.2. Preparação do inóculo

Cinco isolados foram selecionados para a verificação do potencial de indução de crescimento e de interferência na relação planta – herbívoro em plantas de milho. Assim, três isolados comuns à microbiota intestinal de lagartas de *S. frugiperda* foram selecionados. Dois deles isolados nesse trabalho (IIL-Sfm05 e IIL-Sfb05), sendo o terceiro (IILSfc-sus01) adicionado ao conjunto de microrganismos por ter sido isolado de *S. frugiperda* em trabalhos anteriores (ALMEIDA et al., 2017). O efeito da microbiota intestinal de *S. frugiperda* no crescimento de plantas de milho e na relação planta - herbívoro foi comparado àquele induzido por bactéria endofítica isolada de plantas de milho (IILzm-Idp03) e bactéria associada externamente à cutícula da formiga *Acromyrmex coronatus* (IIL-ASP45).

O pré-inóculo e crescimento dos isolados selecionados foram obtidos em meio de cultura TSB (Tryptone Soya Broth, Acumedia®). As bactérias foram cultivadas a 28°C, sob agitação constante (120 rpm), sendo a curva de crescimento determinada pela tomada de leituras da absorbância a 600 nm em espectrofotômetro para a determinação da densidade óptica (O.D.). Em cada tomada de leitura de absorbância do meio, alíquotas de 100 µL dos meios de cultivo foram submetidas a diluições seriadas para a determinação do número de

células viáveis pelo teste de microcolônias. Assim, 10 µL de cada diluição, na forma de gotas, foram inoculadas em triplicata em placas contendo meio TSA. As placas foram incubadas em estufa biológica a 28°C, observando, a cada 8 h, o número de unidades formadoras de colônias (UFC). Após o crescimento e determinação da concentração de células viáveis no meio, as células foram sedimentadas via centrifugação e ressuspensas em meio mínimo M9 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) para atingir concentração final de 10^8 UFC/mL, para testes posteriores.

3.4.3. Disponibilização dos microrganismos selecionados às plantas de milho

Os isolados selecionados foram disponibilizados às plantas de milho seguindo três procedimentos: I) inoculação via semente ou *bio-priming*, II) aplicação junto ao solo e III) aplicação foliar. As sementes utilizadas em todas as formas de aplicação foram desinfectadas superficialmente em 70% etanol e 5% hipoclorito de sódio, com posterior enxague em água deionizada estéril.

O método de *bio-priming* (MÜLLER; BERG, 2008) foi utilizado no tratamento de sementes e consistiu da incubação de 150 sementes de milho em 250 mL de suspensão de 10^8 UFC/mL, sob agitação constante (12 h x 20°C x 100 rpm). Posteriormente, as sementes foram secas por 24h em papel filtro a temperatura de 20°C e semeadas na sequência. Para a disponibilização das bactérias via tratamento do solo, 10 mL de inóculo a 10^8 UFC/mL foram adicionados a 150 mL de água deionizada. Essa suspensão de bactérias foi então utilizada na umidificação do substrato contido em cada vaso de 1,5 L (12 x 14 x 8 cm). A aplicação foi feita com a semente já semeada no sulco e coberta com 3 cm de solo. A aplicação foliar de suspensões de bactérias foi realizada em plantas no estágio de desenvolvimento V4-V5. A última folha completamente expandida da planta teve sua superfície levemente danificada pelo contato abrasivo com uma lixa de 15 mm de diâmetro. Sobre o local danificado foram imediatamente depositados 50 µL da solução inóculo a 10^8 UFC/mL das diferentes bactérias (RAY et al., 2015) (Figura 2). As plantas controles foram inoculadas com o meio mínimo M9, conforme cada forma de aplicação.

A terra vegetal utilizada nos ensaios foi autoclavada para a eliminação da influência de microrganismos contaminantes. Em seguida, os vasos foram preenchidos com 1200 g de

solo, etiquetados e semeados, assim como descrito anteriormente para cada forma de inoculação.

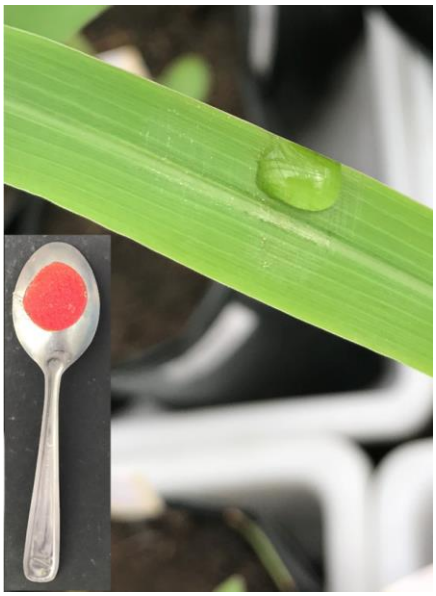

Figura 2. Inoculação via foliar de isolados de bactérias em plantas de milho. Lixa usada para o ferimento e detalhe da folha do milho ferida e tratada com solução das bactérias selecionadas para avaliação.

3.4.4. Avaliação do papel de isolados de bactérias no crescimento da planta

Para os tratamentos realizados nas sementes, *bio-priming* e tratamento de solo, o efeito das diferentes bactérias na germinação das sementes foi verificado pela determinação do Índice de Velocidade de Emergência (IVE), pelo cálculo proposto por Maguire (1962).

$$IVE = \frac{E1}{N1} + \frac{E2}{N2} + \ldots \frac{En}{Nn}$$

Em que:

E1, E2 e En= Número de plântulas normais computadas da primeira à última contagem;

N1, E2 e En= Número de dias da semeadura da primeira à última contagem.

O efeito dos tratamentos de sementes via *bio-priming* e solo com soluções de bactérias no crescimento inicial das plantas foi determinado aos 12, 17, 22, 27 e 30 DAE. Para a inoculação via foliar, os tratamentos foram avaliados aos 12 e 30 DAE devido ao contato com as bactérias ter sido iniciado após o estágio de desenvolvimento V4-V5. Em

cada um desses períodos amostrais foram coletados dados de altura de planta (cm), diâmetro do colmo (mm) e número de folhas por planta. A altura da planta foi avaliada da superfície do solo até a ponta da última folha expandida. O diâmetro do caule foi determinado com auxílio de paquímetro digital, realizando a medida junto à base do colmo. Após atingirem o estágio V8, as plantas foram removidas do vaso e separadas do sistema radicular. O sistema radicular foi retirado e lavado em água corrente com ajuda de peneira de metal. As partes aérea e radicular das plantas foram acondicionadas em sacos de papel separadamente e mantidas em estufa de secagem com circulação forçada de ar a 65°C, até atingirem peso constante, para a quantificação da massa de matéria seca com o auxílio de balança analítica (Mettler, precisão 0,0001 g).

Os ensaios foram compostos pelas diferentes formas de aplicação: I) semente ou *bio-priming*; II) solo e III) foliar. O experimento foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado, com 8 repetições em triplicata, totalizando em 24 vasos. Cada unidade experimental foi composta por três vasos, contendo uma planta de milho cada. Para a análise utilizou-se a média dos valores observados nas triplicatas. Para testar os pressupostos da análise de variância (ANOVA), foram empregados os testes de normalidade (SHAPIRO; WILK, 1965) e homogeneidade das variâncias (HARTLEY, 1950) para todas as análises. Os dados referentes ao IVE foram submetidos à análise de variância em arranjo fatorial 2 x 6 (inoculação via *bio-priming* e solo x bactérias). Nas análises de matéria seca das partes aérea e radicular e da razão da parte aérea e radicular das plantas, os experimentos seguiram arranjo fatorial 3 x 6 (inoculação via *bio-priming*, solo e foliar x bactérias). Em ambos os experimentos, as variáveis foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando os recursos disponíveis no programa estatístico R (CORE TEAM, 2016). Para as variáveis de altura de planta, diâmetro do colmo e número de folhas, os dados de inoculação via *bio-priming* e tratamento de solo foram analisados utilizando-se de regressão linear conjunta, quando as diferenças entre os coeficientes angulares e de intersecção (intercepto) foram analisadas quanto a sua significância, utilizando-se dos recursos de análise disponíveis no software GraphPad PRISM (GraphPad Software, Inc.). Para a inoculação via foliar foi utilizada análise de variância para as avaliações a 12 e 30 DAE, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico R (CORE TEAM, 2016).

3.5. Resposta à herbivoria

3.5.1. Preferência alimentar e área foliar consumida por *Spodoptera frugiperda*

Para o teste de preferência alimentar foram utilizadas larvas de segundo ínstar, seguindo os procedimentos descritos por Nava e Parra (2002). Os insetos foram individualizados e mantidos sem dieta por 12 horas antes do início do ensaio. Discos foliares de 22 mm de diâmetro, obtidos da última folha completamente expandida de plantas de milho no estágio V8, submetidas aos tratamentos com os isolados IIL-Sfm05, IILSfc-sus01, IIL-Sfb05, IILzm-Idp03 e IIL-ASP45, via inoculação de sementes por *bio-priming*, assim como descrito no item 3.4.3. Para os testes de herbivoria apenas o tratamento via inoculação de sementes por *bio-priming* foi utilizado, por ser esse aquele que resultou no crescimento inicial de plantas mais promissor, quando comparado às diferentes formas de inoculação testadas.

Os discos foliares (22 mm de diâmetro) foram obtidos de folhas novas e imersos em água deionizada por uma hora para manter a turgescência. Os discos foram distribuídos de forma equidistante em placas de acrílico (150 mm de diâmetro x 15 mm de altura) forradas com papel de filtro umedecido com água deionizada. Em seguida, cinco lagartas de segundo instar foram liberadas no centro de cada placa (Figura 3).

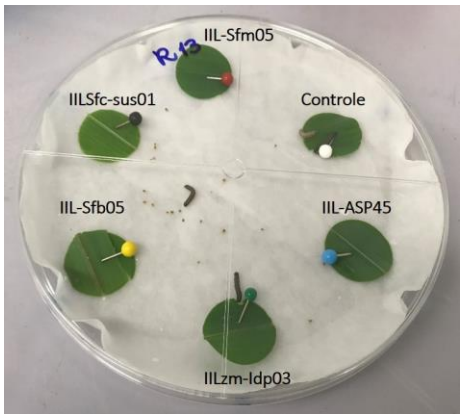

Figura 3. Imagem ilustrativa de ensaio de preferência alimentar de lagartas de segundo ínstar de *Spodoptera frugiperda* oferecidas folhas de milho de plantas tratadas com bactérias simbiontes de inseto e endofítica de milho.

A avaliação de preferência alimentar foi realizada após 24 horas do início da exposição das lagartas aos discos foliares, observando o número de lagartas que se encontravam em cada disco foliar. Em seguida foi medida a área foliar restante dos discos foliares utilizando dispositivo portátil de medição de área foliar LI-COR (Li-3000C) para cálculo da área foliar consumida. A área foliar consumida foi encontrada pela diferença entre a área inicial e área final do círculo da folha.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 30 repetições para cada tratamento. Cada unidade experimental foi composta por uma placa de acrílico, com seis discos de folhas (cinco bactérias e controle) de milho e cinco lagartas (Figura 3). Os dados de área foliar consumida foram transformados $(x + 05)^{0,5}$ para atender aos pressupostos da análise de variância (ANOVA), sendo empregados os testes de normalidade (SHAPIRO; WILK, 1965) e homogeneidade das variâncias (HARTLEY, 1950). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a análise do número de lagartas se alimentando em cada disco foliar (preferência alimentar), foi utilizado o teste de significância de Kruskal-Wallis, conforme descrito por Pimentel-Gomes (2009). As análises foram realizadas utilizando os recursos disponíveis no programa estatístico R (CORE TEAM, 2016).

3.5.2. Sobrevivência de *Spodoptera frugiperda*

Para os ensaios de sobrevivência, lagartas recém-eclodidas foram individualizadas em recipientes plásticos (50 mL) com tampas de acrílico, forrados com algodão e umedecidos com água deionizada. Para a alimentação, foram oferecidas folhas de milho dos diferentes tratamentos, utilizando folhas novas deixadas em água deionizada por uma hora para manter a turgescência. As avaliações foram feitas diariamente, observando a mortalidade dos insetos, sendo adicionado alimento novo, sempre que necessário, até o estágio de pré-pupa. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 30 repetições. Cada repetição foi composta por um recipiente, contendo uma única lagarta. Os dados de sobrevivência foram analisados utilizando-se dos recursos disponíveis no software GraphPad PRISM (GraphPad Software, Inc.).

3.5.3. Consumo e utilização do alimento por *Spodoptera frugiperda*

Para o ensaio de consumo e utilização do alimento, lagartas de segundo ínstar foram individualizadas em recipientes plásticos de 50 mL fechados com tampas de acrílico e forrados com algodão levemente embebido em água deionizada. No interior de cada recipiente foram adicionadas folhas de milho representativas de cada tratamento analisado.

As folhas foram coletadas diariamente e seções de sua parte mediana foram imersas por uma hora em água para manter a turgescência. Tanto o alimento inicial, como o adicionado durante o ensaio foi pesado, bem como as lagartas. Após pesados, o alimento, as lagartas e as fezes produzidas durante o período de alimentação foram secos em estufa a 55-60°C até atingir peso constante, quando tiveram a sua massa determinada em balança eletrônica de precisão (aproximação de 0,1 mg). Alíquotas de 15 lagartas e 15 discos foliares foram amostradas, tiveram seu peso fresco determinado, foram colocados para secar até atingirem peso seco constante, e novamente pesadas para a determinação do peso seco inicial (PARRA et al., 2009). Para determinação dos índices nutricionais quantitativos da fase larval do segundo ao quarto ínstar, foram utilizados os métodos propostos por Waldbauer (1968), modificados por Scriber e Slansky Jr. (1981) e descritos por Parra et al. (2009). Esses índices são os seguintes:

I) Taxa de consumo relativo (mg/mg/dia) - RCR= $\frac{I}{\underline{B} \times T}$

II) Taxa metabólica relativa (mg/mg/dia) - RMR= $\frac{M}{\underline{B} \times T}$

III) Taxa de crescimento relativo (mg/mg/dia) - RGR= $\frac{B}{\underline{B} \times T}$

IV) Eficiência de conversão do alimento ingerido (%) - ECI= $\left(\frac{B}{I}\right) x100$

V) Eficiência de conversão do alimento digerido (%) - ECD= $\left(\frac{B}{I-F}\right) x100$

VI) Digestibilidade aproximada (%) - DA= $\left(\frac{I-F}{I}\right) x100$

Em que:

T= tempo de duração do período de alimentação;

I= alimento consumido durante T;

F= fezes produzidas durante T;

B = ganho de peso pelas lagartas durante T;

B̲= peso médio das lagartas durante T;

I - F = alimento assimilado durante T;

M = (I - F) - B = alimento metabolizado durante o período de alimentação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 20 repetições. Cada repetição consistiu de um recipiente, com uma lagarta alimentada com folhas de plantas de milho tratadas com as diferentes bactérias testadas. Os testes de normalidade (SHAPIRO; WILK 1965) e homogeneidade das variâncias (HARTLEY, 1950) foram empregados para testar os pressupostos da análise de variância (ANOVA). Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa R (CORE TEAM, 2016) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os dados dos índices nutricionais também foram utilizados para a realização de análises multivariadas de componentes principais (PCA) e de agrupamentos hierárquicos. A primeira possui o objetivo de simplificar o conjunto de dados, originalmente contidas em um grupo “n” de variáveis, em poucos componentes, utilizando informações de correlações entre as medidas (CRUZ et al., 2014). A segunda possui o objetivo de agrupar os tratamentos similares.

Para as análises multivariadas, os dados foram padronizados, com média zero e variância 1, a partir da seguinte equação:

$$Z_i = \frac{X_i - \dot{X}}{S}$$

Em que:

Z_i = variável padronizada;

X_1 = valor observado da variável;

$\dot{X}$ = média da variável;

S= desvio-padrão.

A análise de agrupamentos hierárquicos foi realizada a partir das distâncias euclidianas das variáveis e a conexão entre os grupos foi obtida pelo método de Ward (CRUZ et al., 2014).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização molecular de bactérias associadas ao trato digestivo de *Spodoptera frugiperda*

Os meios NA, LB, ISP2 e SM3 foram os mais adequados ao cultivo de bactérias da microbiota intestinal de *S. frugiperda,* dentre os meios de cultivo testados. ISP4 foi o único que não resultou no crescimento de bactérias. O cultivo da microbiota do intestino e das fezes produziu, respectivamente, 20 e 24 morfotipos. Os meios NA e LB foram os que resultaram no maior crescimento de bactérias e produção de morfotipos (Figura 4).

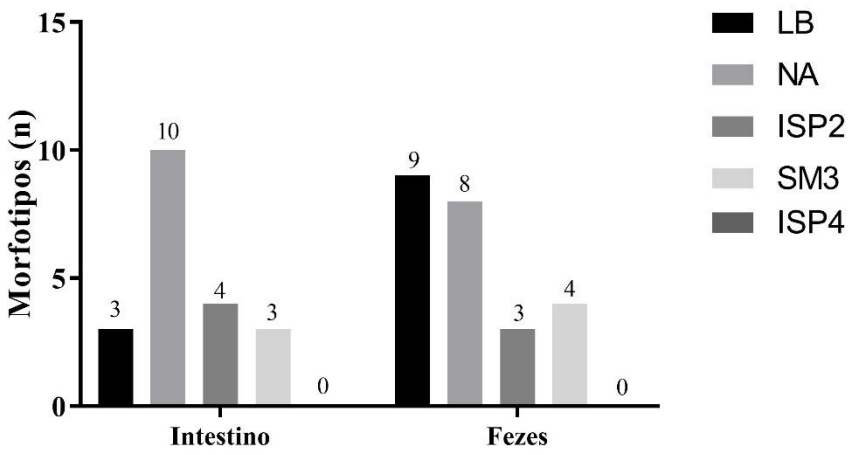

Figura 4. Abundância de morfotipos de bactérias isoladas do trato intestinal (20) e das fezes (24) de lagartas de *Spodoptera frugiperda,* cultivadas em diferentes meios: Luria Bertani (LB), ágar nutriente (NA), ISP2, SM3 e ISP4.

Porém, após análises de PCR-RFLP, foram encontrados apenas nove padrões distintos de restrição para os 20 morfotipos selecionados do intestino e 14 para os 24 morfotipos selecionados das fezes de lagartas de *S. frugiperda*. Análises adicionais de sequenciamento do gene do 16S rRNA de pelo menos três isolados para cada padrão de PCR-RFLP, permitiu a identificação de 7 filotipos, sendo aquele semelhante a *Enterococcus mundtii* o mais abundante (Tabela 1; Figura 5).

Tabela 1. Identificação por similaridade comparada com sequências depositadas no banco do NCBi e do EzTaxon-e das sequências do gene 16S rRNA de bactérias simbiontes de lagartas de *Spodoptera frugiperda*

Isolados	Similaridade		
	Identidade %	Hit mais próximo	Acesso GenBank
IIL- Sfm05	99,30	*Enterococcus mundtii*	JXKV01000056
IIL- SfmF5.3	98,30	*Enterococcus mundtii*	JXKV01000056
IIL- SfmF22	97,79	*Enterococcus mundtii*	JXKV01000056
IIL-SfmI16	97,65	*Enterococcus mundtii*	JXKV01000056
IIL-SfmI10	97,93	*Enterococcus mundtii*	JXKV01000056
IIL-SfmI11	98,00	*Enterococcus mundtii*	JXKV01000056
IIL- Sfb05	97,09	*Bacillus xiamenensis*	AMSH01000114

A árvore filogenética construída com os filotipos isolados e as sequências de linhagens tipos mais próximas foi composta principalmente por representantes das Classes *Bacilli* e *Firmicutes*. Os filotipos obtidos resolveram em subclados próximos àqueles das sequências-tipo que produziram os maiores valores de similaridade em buscas heurísticas contra os bancos de dados. No entanto, esses subclados apresentaram valores elevados de *bootstrap*, demonstrando que os isolados em questão carregam significativa diversidade em relação às sequências tipo utilizadas, indicando que os mesmos possam representar novas entidades taxonômicas. Entre *Enterococcaceae,* os isolados mais divergentes foram os IIL-SfmI11, IIL-SfmI10, IIL-SfmI16 e IIL-SfmF22, que se agruparam em clado contendo bactérias do gênero *Enteroccocus* (Figura 5).

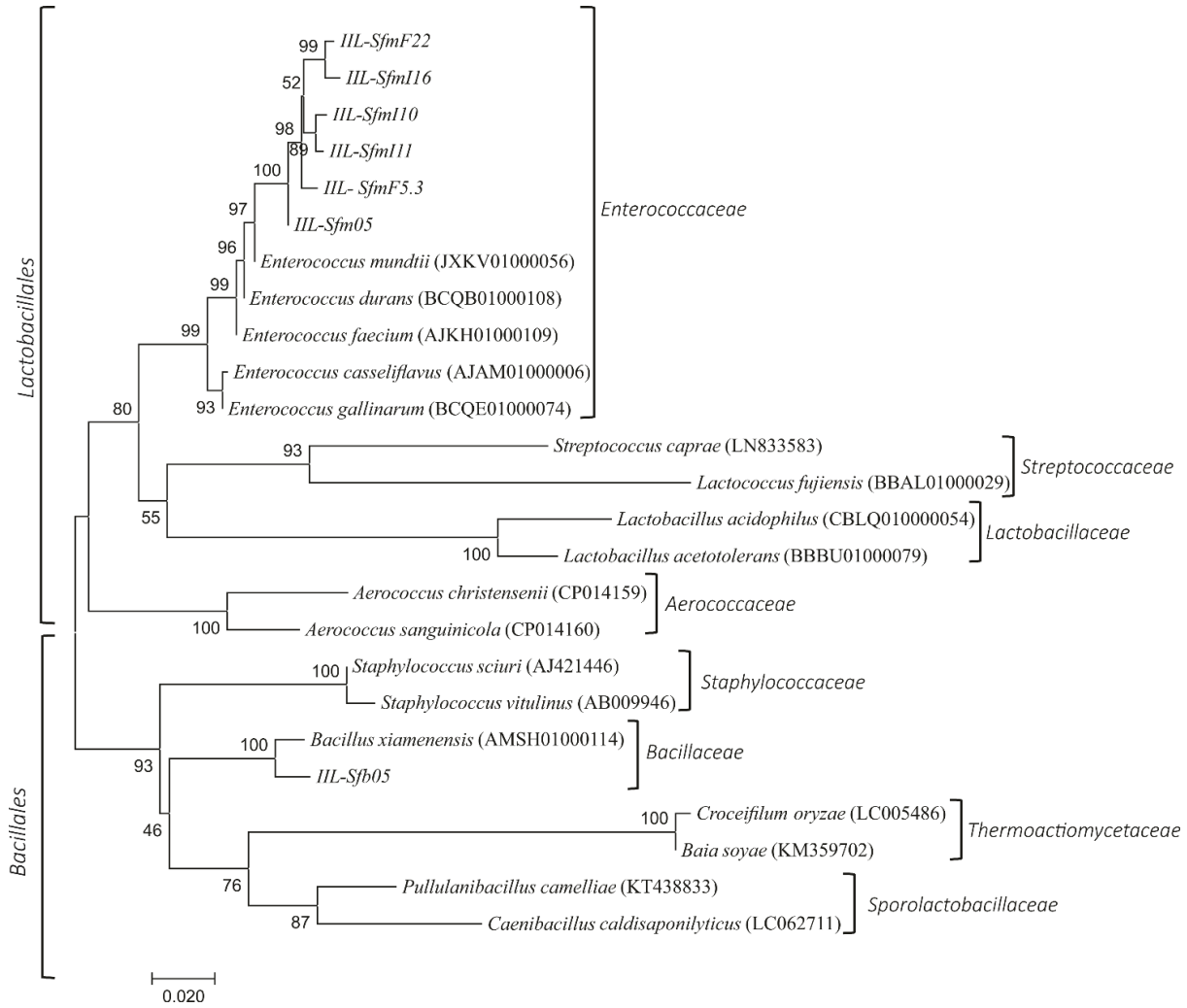

Figura 5. Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-joining* a partir das sequências da região 16S rDNA (1400 pb) dos isolados obtidos do intestino de lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Os valores nos diferentes ramos correspondem aos valores de *bootstrap*. A barra de escala indica 0,02 substituição por posição de nucleotídeo.

4.2. Efeito da microbiota de *Spodoptera frugiperda* no crescimento inicial de plantas de milho

Os microrganismos selecionados e a forma de sua disponibilização, *bio-priming* e aplicação no solo, influenciaram, no geral, negativamente a emergência e o índice de velocidade de emergência (IVE) das plântulas de milho (Tabela 2). Com exceção do isolado IIL-Sfm05, obtido do trato digestivo de lagartas de *S. frugiperda,* todos os demais isolados reduziram significativamente a emergência das plântulas de milho, independentemente da forma de disponibilização (Tabela 2).

As análises demonstraram também que o efeito das bactérias nos parâmetros analisados foi influenciado pela forma de disponibilização das mesmas. Esse fato pode ser claramente visto quando analisados os dados de IVE. Para o IVE só foi verificada ausência de efeito negativo das bactérias quando as mesmas foram disponibilizadas via solo, visto que todos os microrganismos quando disponibilizados via *bio-priming* reduziram significativamente o IVE se comparados ao controle. Apenas os isolados IIL-Sfm05 e IILSfc-sus01, ambas isoladas do intestino de *S. frugiperda*, apresentaram IVE semelhantes ao do controle (Tabela 2). De forma geral, os valores de emergência e IVE obtidos para sementes que foram submetidas ao tratamento por *bio-priming* foram sempre superiores àqueles em que as sementes foram expostas aos microrganismos testados via tratamento direto do solo (Tabela 2).

Os dados de IVE e emergência (%) observados para sementes inoculadas via *bio-priming* são corroborados pela observação da porcentagem de emergência das plântulas de milho ao longo do tempo, sendo clara a emergência antecipada das sementes tratadas via *bio-priming* quando comparada àquelas tratadas pela aplicação de bactérias no solo (Figura 6). Além disso, a quase totalidade das plântulas de sementes tratadas via *bio-priming* já haviam emergido aos 7 dias após a semeadura, sendo que sementes inoculadas pela disponibilização de bactérias via solo, ainda apresentavam baixa taxa de emergência 9 dias após a sua semeadura (Figura 6).

Tabela 2. Índice de velocidade de emergência (IVE) e emergência (%) de plântulas de milho inoculadas via semente (*bio-priming*) e via solo com diferentes bactérias

Tratamento	Emergência (%)		IVE	
	Semente (*bio-priming*)	Solo	Semente (*bio-priming*)	Solo
IIL-Sfm05	60,9 ± 1,35 Aab	35,9 ± 1,34 Ba	1,07 ± 0,076 Ab	0,35 ± 0,018 Ba
IILSfc-sus01	51,8 ± 1,21 Ac	22,9 ± 1,36 Bb	1,05 ± 0,065 Ab	0,26 ± 0,015 Bab
IIL-Sfb05	10,7 ± 1,55 Ad	10,7 ± 1,54 Acd	0,13 ± 0,018 Ac	0,11 ± 0,014 Ac
IILzm-Idp03	59,9 ± 1,10 Ab	16,1 ± 0,52 Bc	1,20 ± 0,073 Ab	0,15 ± 0,014 Bbc
IIL-ASP45	9,3 ± 1,10 Ad	9,9 ± 1,09 Ad	0,18 ± 0,044 Ac	0,10 ± 0,012 Ac
Controle	66,4 ± 0,61 Aa	33,4 ± 2,02 Ba	1,61 ± 0,094 Aa	0,38 ± 0,027 Ba
CV (%)	12,23		5,78	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas linhas, ou letras minúsculas, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

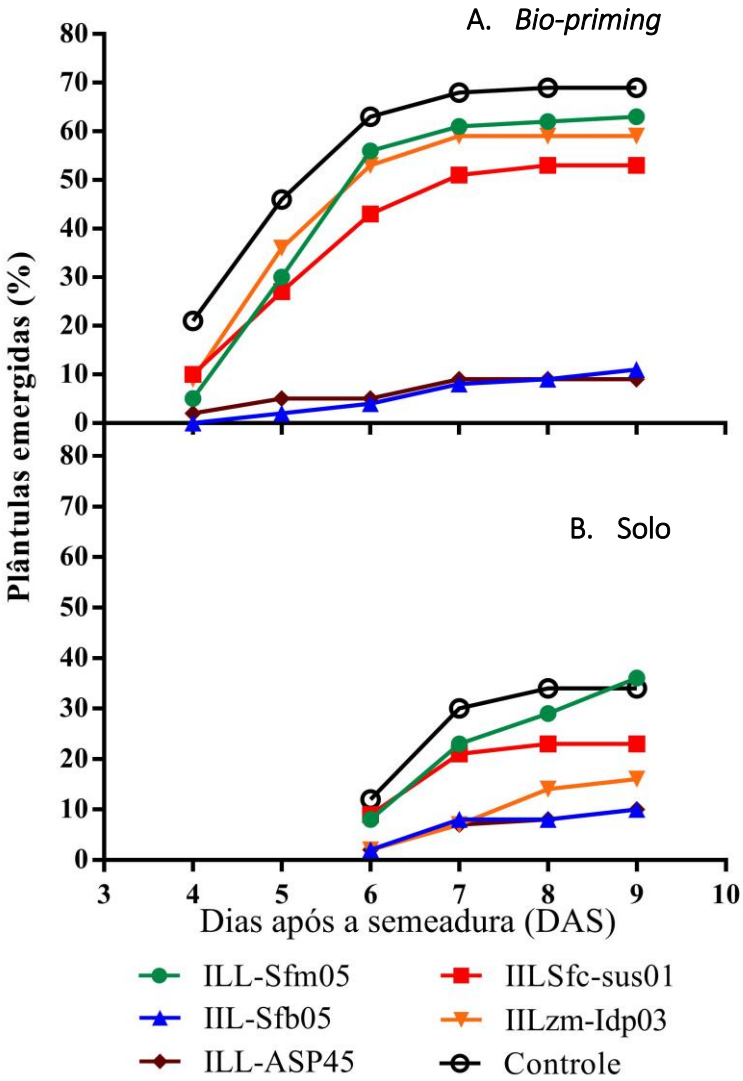

Figura 6. Porcentagem de plântulas de milho emergidas após a semeadura. Plantas de milho inoculadas com diferentes bactérias via semente (*bio-priming*) (A) e solo (B).

Os isolados bacterianos testados e a sua forma de disponibilização influenciaram no desenvolvimento da parte aérea de plantas de milho, enquanto o desenvolvimento de raízes foi influenciado apenas pela forma de disponibilização (Tabela 3 e Tabela 4).

Os isolados IIL-Sfb05 e IILSfc-sus01, obtidos do trato digestivo de *S. frugiperda,* foram os únicos a influenciarem positivamente o crescimento da parte aérea de plantas de milho, quando essas bactérias foram oferecidas via tratamento de solo (IIL-Sfb05) ou tratamento foliar (IILSfc-sus01) (Tabela 3). A única das bactérias testadas que influenciou negativamente o desenvolvimento da parte aérea do milho foi o isolado IIL-Sfb05; porém, apenas quando disponibilizado via *bio-priming* (Tabela 3). A disponibilização do microrganismo à planta de milho também afetou a resposta da planta ao isolado IILzm-Idp03, sendo o desenvolvimento da parte aérea bem superiores àqueles obtidos via tratamento de solo e foliar (Tabela 3).

O desenvolvimento das raízes de plantas de milho inoculadas com os diferentes microrganismos testados só foi influenciado pela forma de disponibilização das bactérias, sendo o tratamento de sementes por *bio-priming* o que apresentou o melhor resultado (Tabela 4).

A razão da massa seca da parte aérea e da massa seca da raiz resultou em comportamento similar àquele observado na massa seca da parte aérea (Tabela 5). O desempenho da planta obtido com o tratamento com as bactérias IIL-Sfm05, IILSfc-sus01 e IIL-ASP45, não foi alterado pela forma com a qual esses microrganismos foram disponibilizados às plantas. Para as plantas tratadas com os isolados IIL-Sfb05 e IILzm-Idp03, a inoculação via solo proporcionou o melhor rendimento (Tabela 5).

Considerando a inoculação da semente por *bio-priming*, todas as bactérias resultaram em valores semelhantes ao do controle. Diferenças na razão massa seca da parte aérea/massa seca da raiz só foram encontradas entre os tratamentos com as bactérias IIL-ASP45 (maior valor) e IIL-Sfb05 (menor valor) (Tabela 5). Também não foram encontradas diferenças entre o controle e as plantas tratadas via solo; porém, o isolado IILzm-Idp03 resultou em razão massa seca da parte aérea/massa seca da raiz superior àquele de plantas tratadas com o isolado IILSfc-sus01 (Tabela 5). Para a inoculação via foliar, as plantas tratadas com os microrganismos não diferiram do controle; porém, plantas tratados com isolado IILSfc-sus01 apresentaram razão massa seca da parte aérea/massa seca da raiz superior àquela de plantas tratadas com o isolado IIL-Sfb05 (Tabela 5).

Tabela 3. Massa seca de parte aérea de plantas de milho tratadas com diferentes bactérias via *bio-priming*, disponibilização via solo ou foliar

Tratamentos	Massa seca de parte aérea		
	bio-priming	Solo	Foliar
		----g----	
IIL-Sfm05	5,60 ± 0,03 Aab	4,90 ± 0,04 Abc	4,63 ± 0,01 Abc
IILSfc-sus01	5,30 ± 0,03 Ab	5,65 ± 0,05 Aab	5,71 ± 0,01 Aa
IIL-Sfb05	3,73 ± 0,04 Bc	6,63 ± 0,04 Aa	3,54 ± 0,09 Bc
IILzm-Idp03	6,74 ± 0,01 Aa	4,62 ± 0,03 Bbc	4,94 ± 0,01 Bab
IIL-ASP45	5,10 ± 0,06 Ab	4,61 ± 0,02 Abc	4,15 ± 0,02 Abc
Controle	5,85 ± 0,04 Aab	4,28 ± 0,03 Bc	3,58 ± 0,08 Bbc
CV (%)		18,90	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas linhas, ou letras minúsculas, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Tabela 4. Massa seca da raiz de plantas de milho tratadas com diferentes bactérias via *bio-priming*, disponibilização via solo ou foliar

Tratamentos	Massa seca de raiz		
	bio-priming	Solo	Foliar
		----g----	
IIL-Sfm05	0,812 ± 0,02	0,518 ± 0,04	0,676 ± 0,01
IILSfc-sus01	0,791 ± 0,02	0,665 ± 0,03	0,637 ± 0,08
IIL-Sfb05	0,656 ± 0,02	0,601 ± 0,05	0,683 ± 0,01
IILzm-Idp03	0,806 ± 0,03	0,412 ± 0,04	0,631 ± 0,09
IIL-ASP45	0,575 ± 0,04	0,499 ± 0,05	0,572 ± 0,01
Controle	0,757 ± 0,02	0,471 ± 0,04	0,528 ± 0,01
Média	0,828 ± 0,01 A	0,527 ± 0,02 B	0,621 ± 0,09 B
CV (%)		14,27	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Tabela 5. Razão da massa seca da parte aérea e da massa seca da raiz de plantas de milho tratadas com diferentes bactérias via *bio-priming*, disponibilização via solo ou foliar

Tratamentos	Razão Massa seca de parte aérea/ Massa seca de raiz		
	bio-priming	Solo	Foliar
IIL-Sfm05	6,9 ± 0,35 Aab	9,5 ± 0,57 Aab	6,9 ± 0,25 Aab
IILSfc-sus01	6,7 ± 0,32 Aab	8,7 ± 0,89 Ab	8,9 ± 0,22 Aa
IIL-Sfb05	5,8 ± 0,72 Bb	11,9 ± 1,70 Aab	5,2 ± 0,20 Bb
IILzm-Idp03	8,5 ± 0,44 Bab	12,2 ± 1,61 Aa	7,8 ± 0,21 Bab
IIL-ASP45	9,3 ± 1,31 Aa	9,5 ± 0,53 Aab	7,3 ± 0,44 Aab
Controle	7,9 ± 0,73 ABab	9,7 ± 1,38 Aab	6,8 ± 0,26 Bab
CV (%)		28,20	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas linhas, ou letras minúsculas, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

O efeito das diferentes bactérias testadas no crescimento da parte aérea das plantas de milho foi observado avaliando-se a massa seca da parte aérea, podendo ser verificado a dinâmica do crescimento das plantas. Análises da altura, do diâmetro do colmo e do número de folhas, em relação ao tempo de desenvolvimento após a emergência (DAE), de plantas de milho inoculadas com bactérias via *bio-priming* ou tratamento do solo, resultaram em curvas de crescimento que apresentaram, em sua grande maioria, coeficientes angulares muito semelhantes (Figura 7). No tratamento via *bio-priming* e solo, respectivamente, o comportamento dos seis tratamentos em resposta aos DAE, tanto para altura, diâmetro e número de folhas por planta, ajustou-se a uma função linear (Figura 7).

Para a altura da planta, os tratamentos inoculados via *bio-priming* diferiram significativamente entre si, quando comparados pelo coeficiente angular ($F_{5,\ 47}$=3,67; p=0,018), sendo que plantas tratadas com a bactéria IILzm-Idp03 foram mais altas do que as dos demais tratamentos (Figura 7a). No entanto, para o diâmetro ($F_{5,\ 47}$= 22,26; p=0,0001) e o número de folhas por plantas ($F_{5,\ 47}$=7,018; p= <0,01) houve diferença estatística entre os tratamentos apenas para o coeficiente de intersecção (Figura 7c, e).

Para as plantas em que os isolados foram disponibilizados via tratamento do solo, foi observado o inverso. Foi verificada diferença apenas no coeficiente de intersecção ($F_{5,\ 47}$= 3,572; p= 0,015) para a variável altura das plantas; porém, o diâmetro do colmo ($F_{5,\ 47}$= 9,224; p= <0,01) e o número de folhas por plantas ($F_{5,\ 47}$=3,07; p=0,035) resultaram em respostas com diferentes coeficientes angulares (Figura 7b,d,f). Em plantas de milho tratadas com os isolados IILSfc-sus01 e IIL-Sfb05, ocorreu influência positiva no diâmetro de colmo e no número de folhas por planta, respectivamente (Figura 7 d).

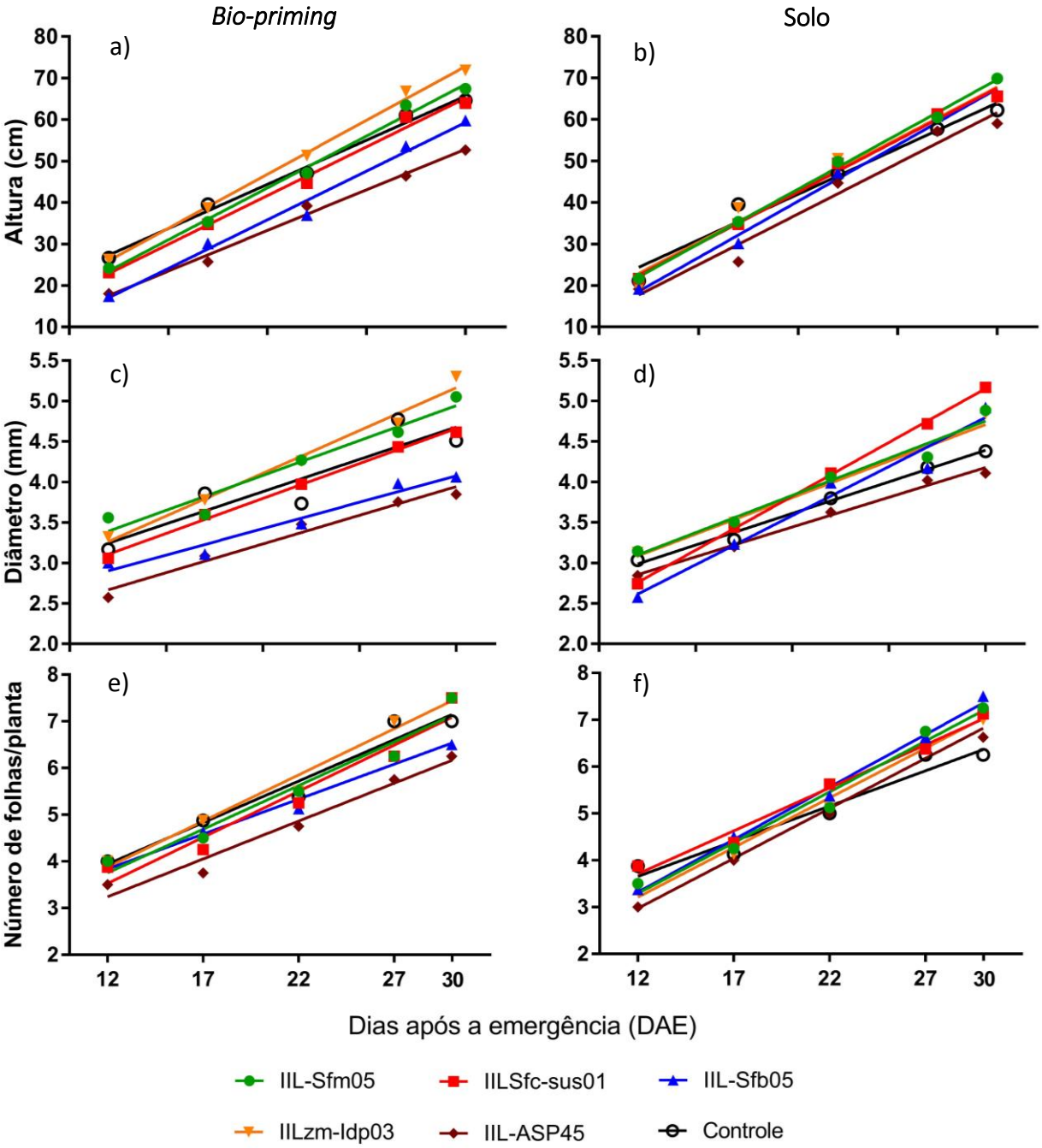

Figura 7. Altura (a, b), diâmetro de colmo (c, d) e número de folhas (e, f) de plantas de milho tratadas com diferentes bactérias via *bio-priming* e disponibilização pela incorporação ao solo após diferentes períodos (dias) de avaliação após a emergência (DAE).

Apenas o isolado IILSfc-sus01, quando inoculado via aplicação na folha, influenciou positivamente à altura das plantas ($F_{5,\ 47}$ = 6,093; p= <0,01). Já os isolados IILSfc-sus01 e IILSfb05 influenciaram positivamente o diâmetro de colmos das plantas de milho em relação ao controle ($F_{5,47}$ = 6,906; p= <0,01). Nenhum dos tratamentos alterou o número de folhas/planta ($F_{5,47}$ = 1.334; p=0,269) (Figura 8).

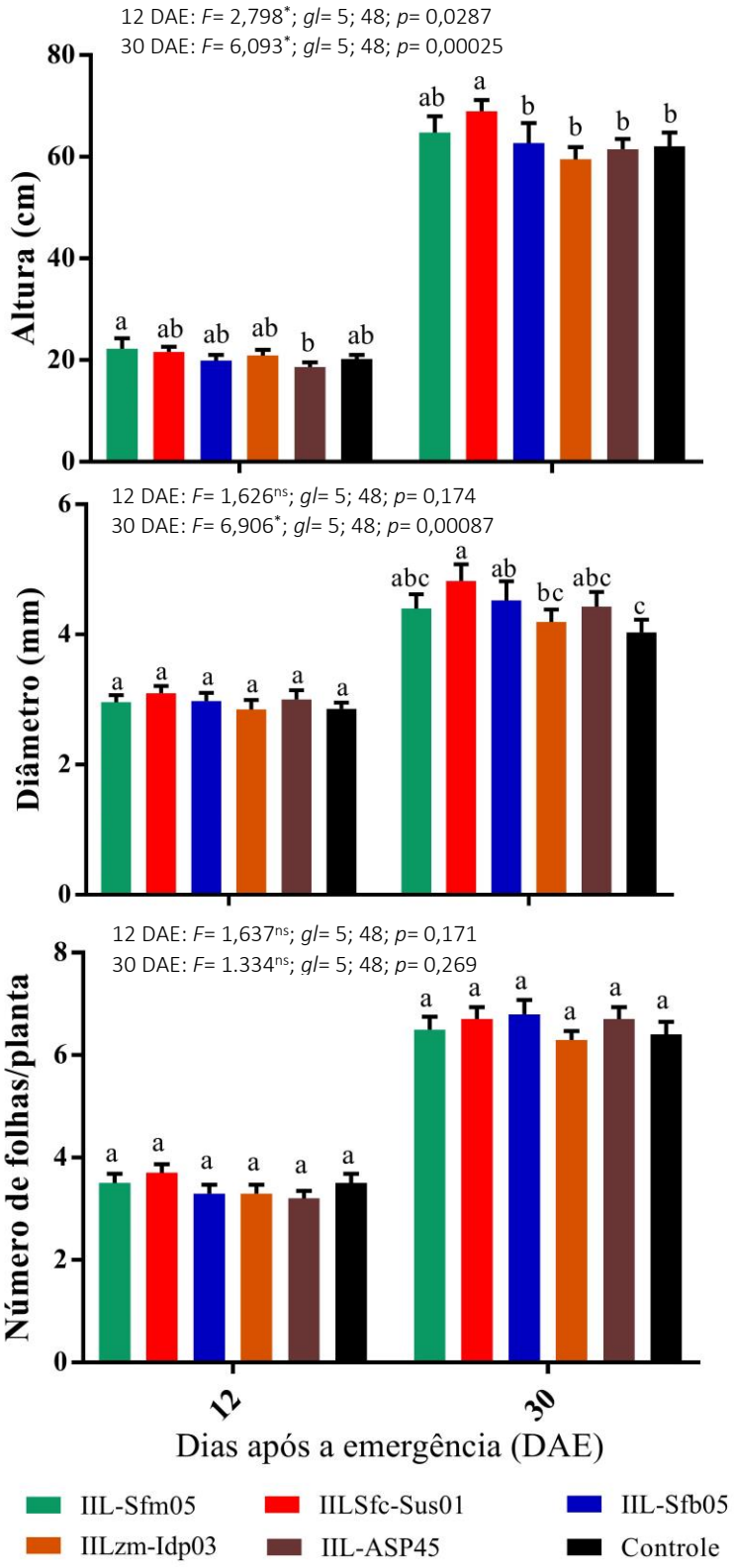

Figura 8. Altura, diâmetro de colmo e número de folha de plantas de milho inoculadas com bactérias via tratamento foliar. Avaliações realizadas a 12 e 30 dias após a emergência (DAE).

4.3. Avaliação da preferência alimentar de *Spodoptera frugiperda* e da área foliar consumida de folhas de plantas tratadas com diferentes bactérias

Não houve diferença significativa para o teste de preferência alimentar com lagartas de *S. frugiperda* de segundo ínstar alimentadas por 24 horas com plantas de milho tratadas com diferentes bactérias via *bio-priming*, seja pela contagem do número de lagartas se alimentando de folhas oriundas dos diferentes tratamentos (χ^2=3,761; *gl*=5; *p*=0,5843), ou pelo consumo preferencial de folhas de determinado tratamento, avaliado pela área foliar consumida ($F_{5, 179}$= 0,542; *p*= 0,813) (Figura 9).

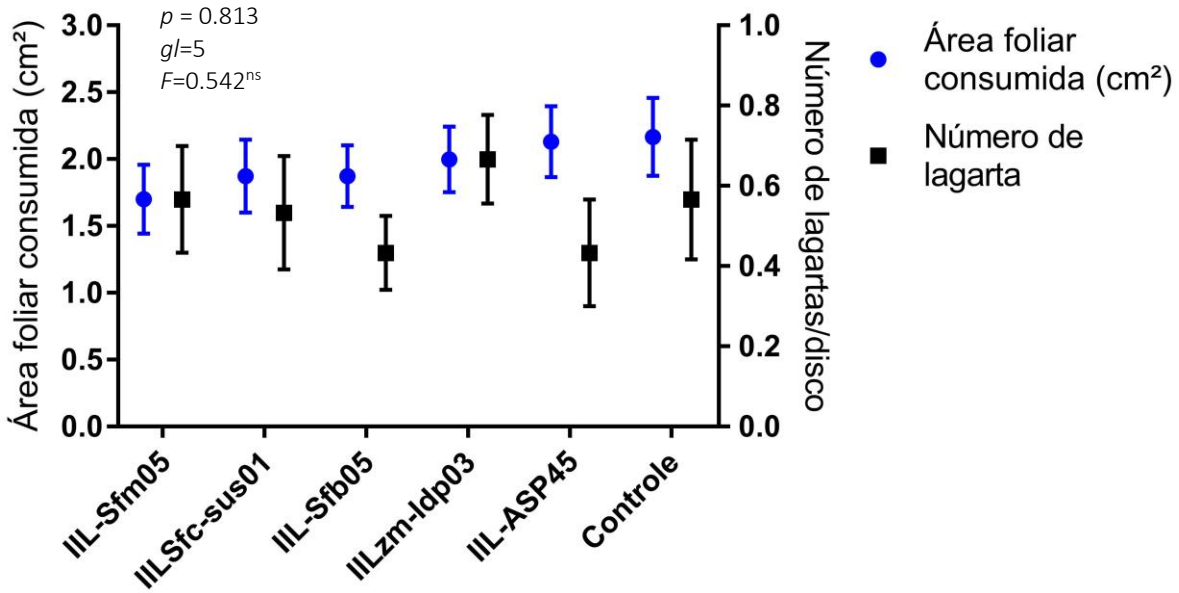

Figura 9. Número médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* e área foliar consumida/lagarta (cm²) após 24 horas de exposição a discos foliares obtidos de plantas de milho tratadas com diferentes bactérias, em testes de livre chance de escolha.

4.4. Sobrevivência

Os testes de sobrevivência larval conduzidos do primeiro ínstar até a pré-pupa, mantendo as lagartas durante toda a sua fase larval se alimentando de folhas das plantas tratadas com as diferentes bactérias via *bio-priming*, demonstraram sobrevivência semelhante a de lagartas se alimentado de plantas controle (55%) e de plantas tratadas com o isolado IIL-Sfc-sus01 (50%) (Figura 10). Os tratamentos IIL-Sfm05 e IILzm-Idp03 resultaram em valores intermediários de sobrevivência, enquanto IIL-ASP45 resultou no menor valor de

sobrevivência (5%). O isolado IIL-Sfb05 foi letal ao desenvolvimento larval de *S. frugiperda,* levando à completa mortalidade desse inseto em sua fase larval (Figura 10).

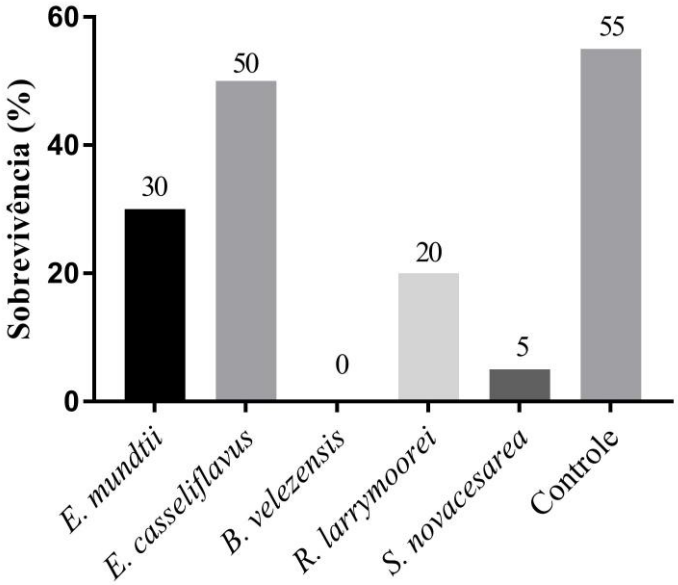

Figura 10. Sobrevivência (%) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas folhas de plantas de milho inoculadas com diferentes bactérias.

4.5. Avaliação de consumo e utilização de alimentos

A taxa de consumo relativo (RCR), que representa a quantidade de alimento ingerido por miligrama de peso corpóreo do inseto por dia, foi significativamente inferior para lagartas alimentadas com plantas inoculadas com o isolado IIL-ASP45. Todos os isolados afetaram negativamente a taxa de crescimento relativo (RGR) de lagartas de *S. frugiperda* quando comparados ao controle (Tabela 6). Lagartas alimentadas em plantas inoculadas com os isolados IILzm-Idp03 e IIL-ASP45, que apresentaram os menores valores de RGR, foram as que apresentaram as maiores taxas metabólicas relativa (RMR), a qual representa a quantidade de alimento gasto em metabolismo por miligrama de peso corpóreo. Também nesses tratamentos foram encontradas as menores eficiências de conversão do alimento ingerido (ECI), que mostra a porcentagem de alimento ingerido transformada em biomassa, assim como os menores valores de conversão do alimento digerido (ECD), variável essa que estima a conversão dos nutrientes assimilados. Finalmente, a digestibilidade aproximada (DA), que estima a porcentagem de alimento ingerido efetivamente assimilado pelos insetos, de lagartas de *S. frugiperda* foi influenciada negativamente por todos os tratamentos com microrganismos (Tabela 6).

De modo geral, os insetos alimentados com plantas inoculadas com IIL-ASP45 tiveram menor crescimento e desenvolvimento, observado através das medidas de consumo e utilização de alimento, quando comparados aos insetos alimentados com folhas da planta controle e as dos demais tratamentos. Vale salientar que os insetos alimentados com folhas oriundas de plantas tratadas com o isolado IIL-Sfb05, apresentaram mortalidade total antes da finalização do bioensaio, não permitindo a avaliação desse tratamento.

Tabela 6. Taxa de consumo relativo (RCR), taxa crescimento relativo (RGR), taxa metabólica relativa (RMR), eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI), eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) e digestibilidade aproximada (DA) para lagartas de *Spodoptera frugiperda* de segundo a quarto ínstar, alimentadas com folhas de plantas de milho tratadas com diferentes bactérias

Tratamento	**RCR**	**RGR**	**RMR**	**ECI**	**ECD**	**DA**
		mg/mg/d			**%**	
IIL-Sfm05	0,2553 ab	0,1610 b	0,0514 c	63,6893 a	76,4450 a	72,5443 ab
IILSfc-sus01	0,2568 ab	0,1088 c	0,1125 b	42,7907 b	49,9083 b	66,1898 b
IILzm-Idp03	0,2757 ab	0,0626 d	0,1802 a	24,0668 c	28,0183 c	40,7787 c
IIL-ASP45	0,2418 b	0,0357 d	0,1778 a	14,9389 c	16,9906 c	22,0460 d
Controle	0,3152 a	0,2190 a	0,0598 bc	70,6285 a	79,9925 a	83,3467 a
C.V. %	19,4001	21,5626	39,5126	21,1918	22,0952	22,8076

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

A partir dos resultados relacionados com consumo e utilização de alimento foram realizadas as análises de componentes principais. As variáveis ECD, ECI, DA e RGR estão associadas positivamente entre si, assim como observado pela baixa angulação dos vetores. Já a variável RMR está associada negativamente com ECD, ECI, DA e RGT devido a sua angulação próxima de 180° (Figura 11). A RCR, por sua vez, apresentou baixa associação com as outras variáveis, assim como indicado pela sua angulação em relação às demais variáveis ser próxima de 90°. O comprimento do vetor associada a cada variável está relacionado com o quanto que os tratamentos variaram; sendo assim, pode-se observar que ocorreram maior variabilidade para RCR e RMR (Figura 11). As lagartas alimentadas com folhas de plantas tratadas com os isolados IIL-Sfm05 e IILSfc-sus01 estão mais associadas as variáveis ECD, ECI, DA, enquanto que o controle com RGR. Entretanto, os tratamentos IILzm-Idp03 e IIL-ASP45 estão associados com a variável RMR, agrupando-se no quadrando direito do gráfico. Esses resultados são confirmados com o dendograma obtidos a partir das distâncias euclidianas, que agrupam no mesmo clado esses mesmos tratamentos, demonstrando que os isolados

obtidos do trato digestivo de *S. frugiperda* são os que se agrupam mais proximamente de lagartas alimentadas com folhas de plantas controle (Figura 12).

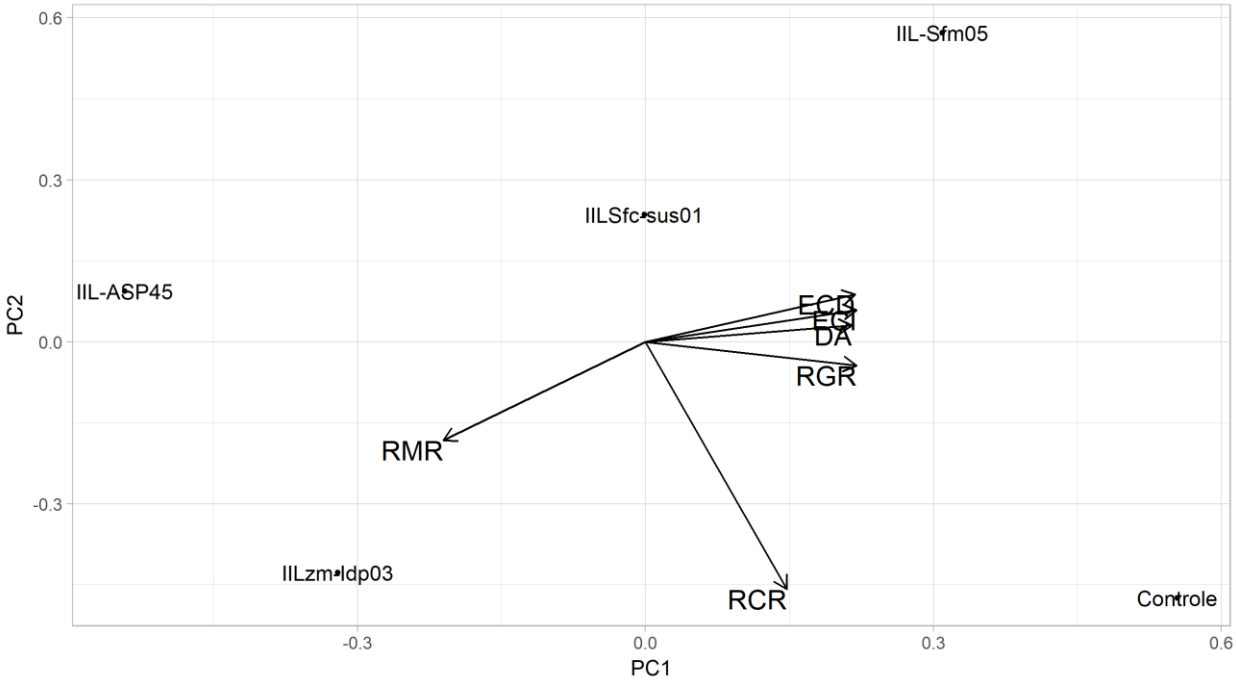

Figura 11. Análise de componentes principais das variáveis relacionadas com o consumo e utilização de alimento de *Spodoptera frugiperda* alimentada com milho inoculadas via semente com as bactérias IIL-Sfm05, IILSfc-sus01, IILzm-Idp03, IIL-ASP45 e controle. (RCR=taxa de consumo relativo; RGR= taxa de crescimento relativo; RMR= taxa metabólica relativa; ECI= eficiência de conversão do alimento ingerido; ECD= eficiência de conversão do alimento digerido e DA= digestibilidade aproximada). Proporção da variação acumulada pelos componentes principais PC1 e PC2 de 87,47% e 98,82%, respectivamente.

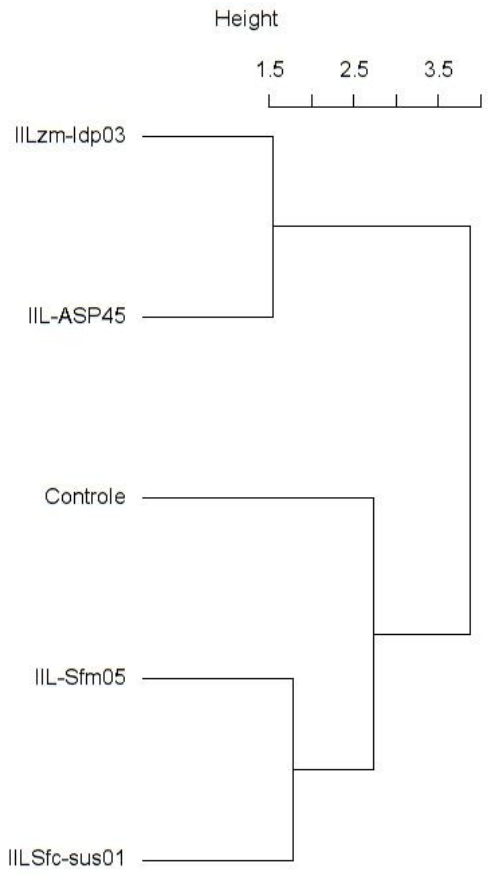

Figura 12. Dendograma obtido a partir das distâncias euclidianas das variáveis RCR=taxa de consumo relativo; RGR= taxa de crescimento relativo; RMR= taxa metabólica relativa; ECI= eficiência de conversão do alimento ingerido; ECD= eficiência de conversão do alimento digerido e DA= digestibilidade aproximada, relacionadas com o consumo e utilização de alimento de *Spodoptera frugiperda* alimentada com milho inoculadas via semente com as bactérias IIL-Sfm05, IILSfc-sus01, IILzm-Idp03, IIL-ASP45 e controle.

5. DISCUSSÃO

Simbiontes de isolados de insetos demonstraram afetar de forma diferencial a resposta de crescimento da planta de milho, o comportamento de utilização do alimento pelo herbívoro, assim como a sua sobrevivência, comprovando o potencial para a exploração desses microrganismos como endofíticos de plantas, seja o uso voltado à estimulação do crescimento da planta ou na proteção da planta contra a herbivoria. Duas *Enterococcaceae* isoladas do trato intestinal de *S. frugiperda* apresentaram capacidade de influenciar positivamente a resposta de crescimento da planta, enquanto uma *Bacillaceae*, também oriunda do ambiente luminal do trato digestivo de *S. frugiperda*, e uma *Actinobacteria*, associada à cutícula de formigas cortadeiras, apresentaram potencial biotecnológico voltado ao controle do herbívoro.

Membros de *Enterococcaceae* são abundantes na microbiota associada ao trato intestinal de Lepidoptera (ALMEIDA et al., 2017; BRODERICK et al., 2004; MARTIN; MUNDT, 1972; RAJAGOPAL, 2009; VISÔTTO et al., 2009; XIANGI et al. 2006) e de muitos outros insetos, como Orthoptera (DILLON et al., 2008, 2010), Coleoptera (SCHMID et al., 2014), Diptera (COX; GILMORE, 2007), Isoptera (HIGASHIGUCHI et al., 2006) e Hymenoptera (MARTIN; MUNDT, 1972), entre outros. *Enterococcaceae* são extremamente adaptáveis, pois suportam uma ampla faixa de variação de pH, bem como condições hipotônicas e hipertônicas, características essas que provavelmente contribuem para a sua associação ao ambiente intestinal de um grande número de espécies de insetos. *Enterococcus* se destaca como um dos representantes de *Enterococcaceae* no trato digestivo de insetos. Em *Drosophila*, *Enterococcus* habita diferentes regiões do trato digestivo, variando de regiões com pH ácido (divertículos) a regiões com pH extremamente alcalino (mesêntero), incluindo também regiões com pH variável, de neutro a ácido, como é o caso do proctodeu (CLARK, 1999; COX; GILMORE, 2007). *Enterococcus* também tem sido relatado como o membro mais abundante da microbiota intestinal associada a espécies de *Spodoptera,* incluindo *S. frugiperda* (ALMEIDA et al., 2017; CHEN e al., 2016; TANG et al., 2012). Adicionalmente, a plasticidade fisiológica apresentada por essas bactérias para se adaptar ao ambiente luminal do intestino corroboram os dados de isolamento, quase que exclusivo, dessas bactérias tanto no intestino médio como nas fezes produzidas pelo inseto, visto que o pH do intestino

médio de lagartas de Lepidoptera é alcalino, cerca de pH=10, enquanto nas fezes o pH é ácido, cerca de pH= 5,0 (BERENBAUM, 1980; DOW; HARVEY, 1988).

Em lepidópteros, as bactérias Enterococcaceae possuem diversas funções, sendo uma delas a proteção contra agentes patogênicos, utilizando mecanismos de exclusão competitiva, atenuação por antagonismo direto e indução de respostas imunes protetoras do hospedeiro (JOHNSTON; CRICKMORE, 2009; JOHNSTON; ROLFF, 2015; RAYMOND et al., 2009, 2010). A função de proteção de *Enterococcus* é influenciado pela sua concentração e localização no corpo do hospedeiro. A migração dessas bactérias do lúmen intestinal para outras partes do corpo e/ou hemocele podem levar ao desenvolvimento de quadros patológicos, ocasionando a morte do inseto (CAPPELLOZZA et al., 2011; CHIBEBE JUNIOR et al., 2013; HANIN et al., 2010; MASON et al., 2011; NWIBO et al., 2015; ROMOLI et al., 2017). Porém, os isolados de *Enterococcus* testados nesse trabalho não estabeleceram relação negativa com *S. frugiperda.*

No entanto, bactérias isoladas de insetos saudáveis podem induzir quadro patológicos em seu hospedeiro original, assim como demonstrado para diversos gêneros de bactérias isoladas de larvas de lepidópteros, incluindo bactérias dos gêneros *Enterococcus*, *Pseudomonas, Proteus* e *Bacillus*, entre outros (HALOI et al., 2016; OSBORN et al., 2002; THAKUR et al., 2015). Esses dados corroboram a alta patogenicidade encontrada nos ensaios de sobrevivência com alguns dos simbiontes testados, principalmente o isolado Sfb05, um representante do gênero *Bacillus*. O gênero *Bacillus* é diverso e o seu potencial entomopatogênico é bastante difundido entre os diferentes grupos de insetos (STAHLY et al., 2006). Porém, há também relatos de espécies de *Bacillus* que auxiliam o processamento de néctar em mel, a digestão e fermentação de pólen, na proteção de alimentos contra a degradação microbiana e proteção de abelhas contra patógenos (CANO et al., 1994; WANG et al., 2015). Espécies de *Bacillus* vêm se tornando cada vez mais importantes para a microbiologia aplicada, sendo algumas de grande importância para a indústria, produção de antibióticos, enzimas, controle de pragas das plantas cultivadas (BATTAN et al., 2007; BORGES et al., 2010; CHEN et al., 2008; GAVRILESCU; CHISTI, 2005; ROMEIS et al., 2006). Diversas espécies de *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* e *B. velezensis*) já foram relatadas como agentes de controle biológico de fungos fitopatogênicos (ALVAREZ et al., 2012; HOU et al., 2006; MARTINEZ et al., 2013; ROH et al., 2009, TENDULKAR et al., 2007), mas nenhuma recebeu tanto destaque quanto o entomopatógeno *Bacillus*

thuringiensis, seja pelo seu uso como agente de controle biológico de insetos ou da exploração de seus genes via transgenia de plantas (BRAVO et al., 2008; STAHLY et al., 2006).

Mas o interessante da atividade entomotóxica do isolado IIL-Sfb05 foi decorrente do fato dela ter ocorrido após associação endofítica dessa bactéria com a planta de milho. Outras bactérias do gênero *Bacillus*, como *B. subtilis,* são relatados como endofíticos de diversas espécies vegetais, desempenhando papel fundamental no controle de doenças das plantas (JI et al., 2008; REN et al., 2013; SUN et al., 2006). Adicionalmente, as associações de simbiose de *Bacillus* com plantas parece ser comum, visto a diversidade de associações estabelecidas e o número de espécies que são relatadas como endofíticos de plantas, incluindo o milho (FIGUEIREDO et al., 2009, GOND et al., 2015).

O isolado IIL-ASP45, putativamente identificado como *Streptomyces hydrogenans,* obtido da associação com formigas cortadeiras, também diminiu significativamente a sobrevivência de larvas de *S. frugiperda* se alimentando de plantas tratadas com essa bactéria. Espécies de *Streptomyces,* assim como outros gêneros de *Actinobacteria*, são conhecidas por produzirem uma alta diversidade de metabólitos com atividade biológica (TADDEI et al., 2006; ARASU et al., 2013). *Streptomyces hydrogenans*, por exemplo, foi demonstrado produzir extrato bruto com atividade entomotóxica a larvas de *Spodoptera litura*, resultando em mortalidade superior a 70% (KAUR et al., 2014).

Adicionalmente, alguns dos isolados testados, mesmo que não apresentando atividade entomotóxica, influenciaram negativamente o consumo e a utilização do alimento por lagartas de *S. frugiperda.* Tais efeitos negativos, principalmente a alta taxa metabólica apresentada por lagartas que se alimentaram de folhas de plantas tratadas com os isolados IILzm-Idp03 e ASP-45, podem estar associados aos custos da manutenção da associação do inseto com essas bactérias, principalmente devido ao investimento em processos de defesa imunológica, assim como demonstrado para simbiontes associados a *S. litura* (THAKUR et al., 2015).

Os isolados IIL-Sfsus1 e IIL-Sfb05 foram os únicos entre os isolados testados a influenciar positivamente, pelo menos um dos parâmetros de crescimento da planta analisados. A interação do de *Bacillus* (IIL-Sfb05) com a planta de milho resultou no estímulo do crescimento das plantas, apesar de ter influenciado negativamente a emergência de plântulas. Resultados semelhantes foram obtidos para *B. velezensis* e o seu efeito negativo na germinação tem dificultado a sua aplicação comercial como estimuladores do

crescimento de plantas (MENG et al., 2016). Ao contrário do isolado IIL-Sfb05, o isolado IIL-Sfsus1, uma espécie de *Enterococcus*, auxiliou no desenvolvimento da planta sem, no entanto, afetar a germinação das plântulas. A inoculação foliar da bactéria IILSfc-sus01 proporcionou o maior desenvolvimento da parte aérea da planta, não havendo relatos na literatura a respeito da capacidade de *Enterococcus* induzirem o crescimento de plantas. Assim, estudos adicionais devem ser realizados para a compreensão dos fatores biológicos que expliquem a interação bactéria-planta.

Os benefícios das bactérias como indutoras de crescimento já são conhecidos na literatura, como é o caso da interação *Rhizobium* - leguminosas e *Azospirillum* - gramíneas, talvez os exemplos mais conhecidos e usados comercialmente (BASHAN, 1998; PERRIG et al., 2007; VESSEY, 2003). Microrganismos endofíticos podem estimular o crescimento da planta indiretamente, induzindo a produção de hormônios pela planta, como as auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico (HAYAT et al., 2010). Em contrapartida, microrganismos associados à rizosfera podem estimular diretamente o crescimento da planta pela solubilização de nutrientes, como fosforo, e a fixação de nitrogênio, sendo este efeito mais pronunciado em solos com baixa quantidade de nutrientes (EGAMBERDIYEVA, 2007).

Os efeitos indiretos estão relacionados com a capacidade de prevenção de organismos fitopatogênicos que possam prejudicar o hospedeiro. Este fato ocorre devido à produção de componentes como hidróxido de cianeto (HCN) (LEONG, 1986) e enzimas degradadores de parede celular de fungos (CHATTERTON; PUNJA, 2009).

Foi observado que não houve diferenças estatísticas na produção de massa seca de raiz para os diferentes tratamentos, de modo que as diferenças na relação são devido ao acúmulo de massa seca de parte aérea. As bactérias que apresentaram maiores relações de matéria seca de parte aérea e massa seca de raiz, proporcionaram os maiores desenvolvimento da parte aérea, sem que ocorresse incremento na raiz, proporcionando uma relação de fonte:dreno mais eficiente. Indicando que para as bactérias estudadas, estas tiveram efeitos diretos, podendo ter alterado a absorção de nutrientes ou o balanço hormonal das plantas, proporcionando maior crescimento da parte aérea.

Essa promoção de crescimento de planta através da IIL-Sfb05 pode estar relacionada com a produção de ácido indol-3-acetico (IAA ou auxina), amônia (NH_3) e atividade 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase (IDRIS et al., 2007; MENG et

al., 2016). O IAA está associado a todos os aspectos de crescimento e desenvolvimento, bem como nas respostas de defesa, sendo fundamental para a estrutura e funcionamento das plantas (SANTNER et al., 2009; TEALE et al., 2006). A produção de amônio está associada ao acúmulo e fornecimento de nitrogênio para a planta, promovendo o alongamento das raízes e, consequentemente, a produção de biomassa vegetal (MARQUES et al., 2010; RASHID et al., 2012). A enzima desmaseína ACC facilita o crescimento e desenvolvimento da planta, diminuindo a concentração de etileno. Sabe-se que níveis altos de etileno inibem o alongamento da raiz após a germinação das sementes; logo, a redução de etileno na planta resulta na indução do crescimento da raiz e com isso da planta toda (GLICK et al., 2007; HARDOIM et al., 2008; PENROSE; GLICK, 2003; RASHID et al., 2012).

Como já descrito, as bactérias do gênero *Rhizobium* são consideradas de grande importância, já que muitas delas são consideradas promotoras de crescimento de plantas (GLICK, 2012). Em nosso trabalho foi observado que houve crescimento de plantas de milho inoculadas com a *Rhizobacterium* IILzm-Idp03*,* antes identificada como *Agrobacterium larrymoorei* (BOUZAR; JONES, 2001; YOUNG, 2004). Esse crescimento foi encontrado nas três formas de inoculação: semente, solo e foliar, sendo que as plantas inoculas via solo tiveram crescimento mais pronunciado. O uso de bactérias desse gênero é mais associado às plantas leguminosas devido a nodulação e fixação de nitrogênio, sendo poucos os registros com gramíneas. Höflich (1999) observou que a inoculação de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* em plantas de milho, trigo, colza e mostrada, estimulou o crescimento das plantas, devido a fatores como produção de fitormônios (citocinina e auxina) e fixação de N_2. Essa mesma bactéria induziu ao crescimento de plantas de arroz em trabalho de Vargas et al. (2009), e foi relacionado a presença de ácido indolacético ou auxina e solubilização do fosfato.

Em resumo, os simbiontes associados a insetos demonstraram potencial de utilização como endofíticos de plantas para a proteção contra herbívoros e/ou estimulação do crescimento de plantas. Esses resultados são extremamente promissores quanto ao potencial que os microrganismos testados apresentam para a sua exploração biotecnológica. Os resultados aqui apresentados ainda exigirão estudos adicionais, principalmente aqueles voltados à identificação dos mecanismos de indução de crescimento das plantas e de patogenicidade ao inseto.

6. CONCLUSÕES

- ✓ *Enterococcus* predomina na microbiota intestinal cultivável de *S. frugiperda;*

- ✓ A forma de inoculação de microrganismos influencia a interação bactéria simbionte - planta de milho;

- ✓ O isolado IILzm-Idp03 induz o maior crescimento da planta quando inoculado via *bio-priming;*

- ✓ Na inoculação via solo, os isolados IILzm-Idp03 e IIL-Sfb05 proporcionaram o melhor desenvolvimento das plantas, enquanto que o isolado IILSfc-sus01 foi o mais adequado para inoculação via foliar;

- ✓ Os isolados IIL-Sfb05 e IIL-ASP45 são altamente patogênicos a lagartas de *S. frugiperda* quando inoculados em plantas via *bio-priming*;

- ✓ Os isolados testados não influenciam a preferência alimentar de *S. frugiperda*;

- ✓ O isolado IIL-ASP45 foi o que mais afetou a utilização do alimento por lagartas de *S. frugiperda*.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. G.; DE MORAES, L. A. B.; TRIGO, J. R.; OMOTO, C.; CÔNSOLI, F. L. The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: A potential source for biotechnological exploitation. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–19, 2017.

ALVAREZ, F.; CASTRO, M.; PRÍNCIPE, A.; BORIOLI, G.; FISCHER, S.; MORI, G.; JOFRÉ, E. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains $MEP_2$18 and $ARP_2$3 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 1, p. 159–174, 2012.

ARASU, M. V.; AL-DHABI, N. A.; SARITHA, V.; DURAIPANDIYAN, V.; MUTHUKUMAR, C.; KIM, S. -J. Antifeedant, larvicidal and growth inhibitory bioactivities of novel polyketide metabolite isolated from *Streptomyces* sp. AP-123 against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **BMC microbiology**, v. 13, n. 105, p. 1-6, 2013.

BARBOSA, P.; KRISCHIK, V. A.; JONES, C. G. **Microbial Mediation of Plant-Herbivore Interactions**. New York: John Wiley & Sons, p. 535, 1991.

BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; RUBERSON, J. R.; OLIVEIRA, M. D. Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 137, n. 3, p. 237–245, 2010.

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 4, p. 729–770, 1998.

BATISTA, B. D.; LACAVA, P. T.; FERRARI, A.; TEIXEIRA-SILVA, N. S.; BONATELLI, M. L.; TSUI, S.; MONDIN, M.; KITAJIMA, E. W.; PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth- promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, v. 206, p. 33–42, 2018.

BATTAN, B.; SHARMA, J.; DHIMAN, S. S.; KUHAD, R. C. Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 6, p. 733–739, 2007.

BAUMANN, P.; BAUMANN, L.; LAI, C.-Y.; ROUHBAKHSH, D. Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the Genus *Buchnera*: Intracellular symbionts of aphids. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 55–94, 1995.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.

BERENBAUM, M. Adaptive Significance of Midgut pH in Larval Lepidoptera. **The American Naturalist**, v. 115, n. 1, p. 138-146, 1980.

BONAVENTURE, G. Perception of insect feeding by plants. **Plant Biology**, v. 14, n. 6, p. 872–880, 2012.

BONAVENTURE, G.; SCHUCK, S.; BALDWIN, I. T. Revealing complexity and specificity in the activation of lipase-mediated oxylipin biosynthesis: A specific role of the *Nicotiana attenuata* GLA1 lipase in the activation of jasmonic acid biosynthesis in leaves and roots. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, n. 9, p. 1507–1520, 2011.

BOUCHER, D. H. The Ecology of Mutualism. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 13, p. 315–347, 1982.

BOUTZIS, KOSTAS; MILLER, T. A. **Insect Symbiosis**. Flórida: CRC Press, p. 347, 2003.

BOUZAR, H.; JONES, J. B. *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n.3 p. 1023–1026, 2001.

BRAVO, A.; GILL, S.; SOBERON, M. Mode of action of *bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxin and their potential for insect control. **National Institutes Acess**, v. 49, n. 4, p. 423–435, 2008.

BRINKMANN, N.; MARTENS, R.; TEBBE, C. C. Origin and diversity of metabolically active gut bacteria from laboratory-bred larvae of *Manduca sexta* (Sphingidae, Lepidoptera, Insecta). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 23, p. 7189–7196, 2008.

BRODERICK, N. A.; RAFFA, K. F.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 293–300, 2004.

CANO, R. J.; BORUCKI, M. K.; HIGBY-SCHWEITZER, M.; POINAR, H. N.; POINAR JUNIOR, G. O.; POLLARD, K. J. *Bacillus* DNA in fossil bees: An ancient symbiosis? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 2164–2167, 1994.

CAPPELLOZZA, S.; SAVIANE, A.; TETTAMANTI, G.; SQUADRIN, M.; VENDRAMIN, E.; PAOLUCCI, P.; FRANZETTI, E.; SQUARTINI, A. Identification of *Enterococcus mundtii* as a pathogenic agent involved in the “flacherie” disease in *Bombyx mori* L. larvae reared on artificial diet. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, n. 3, p. 386–393, 2011.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; GRANT, W. P.; GREAVES, J.; TATCHELL, G. M. Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, n. 5, p. 275–283, 2008.

CHATTERTON, S.; PUNJA, Z. K. Chitinase and β-1, 3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f . *catenulata* against fungal plant pathogens. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 356–367, 2009.

CHEN, B.; TEH, B. S.; SUN, C.; HU, S.; LU, X.; BOLAND, W.; SHAO, Y. Biodiversity and activity of the gut microbiota across the life history of the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. **Scientific.** Reports, v. 6, n. 29505, p. 1-14, 2016.

CHEN, D. Q.; PURCELL, A. H. Occurrence and transmission of facultative endosymbionts in aphids. **Current Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 220–225, 1997.

CHEN, X. H.; KOUMOUTSI, A.; SCHOLZ, R.; BORRISS, R. More than anticipated - Production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 1–2, p. 14–24, 2008.

CHIBEBE JUNIOR, J.; FUCHS, B. B.; SABINO, C. P.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C.; RIBEIRO, M. S.; GILMORE, M. S.; RICE, L. B.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R.; MYLONAKIS, E. Photodynamic and antibiotic therapy impair the pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a whole animal insect model. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1-10, 2013.

CHUNG, S. H.; ROSA, C.; SCULLY, E. D.; PPEIFFER, M.; TOOKER, J. F.; HOOVER, K.; LUTHE, D. S.; FELTON, G. W. Herbivore exploits orally secreted bacteria to suppress plant defenses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 39, p. 15728–15733, 2013.

CLARK, E. L.; KARLEY, A. J.; HUBBARD, S. F. Insect endosymbionts: Manipulators of insect herbivore trophic interactions? **Protoplasma**, v. 244, n. 1-4, p. 25–51, 2010.

CLARK, T. M. Evolution and adaptive significance of larval midgut alkalinization in the insect superorder Mecopterida. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 8, p. 1945–1960, 1999.

CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. , 2016. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

COX, C. R.; GILMORE, M. S. Native microbial colonization of *Drosophila melanogaster* and its use as a model of *Enterococcus faecalis* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 4, p. 1565–1576, 2007.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, J. A.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicado ao melhoramento genético**. 4ª ed. Viçosa:Editora UFV, p. 668, 2014.

DALE, C.; MORAN, N. A. Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. **Cell**, v. 126, n. 3, p. 453–465, 2006.

DICKE, M.; VAN POECKE, R. M. P. Signaling in plant-insect interactions : signal transduction in direct and indirect plant defence. **Plant Signal Transduction**, v. 3, p. 289–316, 2002.

DILLON, R. J.; WEBSTER, G.; WEIGHTMAN, A. J.; DILLON, V. M.; BLANFORD, S.; CHARNLEY, A. K. Composition of Acridid gut bacterial communities as revealed by 16S rRNA gene analysis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, n. 3, p. 265–272, 2008.

DILLON, R. J.; WEBSTER, G.; WEIGHTMAN, A. J.; KEITH CHARNLEY, A. Diversity of gut microbiota increases with aging and starvation in the desert locust. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 97, p. 69–77, 2010.

DOARES, S. H.; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J.; CONCONI, A.; RYAN, C. A. Salicylic-acid inhibits synthesis of proteinase-inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. **Plant Physiology**, v. 108, n. 4, p. 1741–1746, 1995.

O'DONNELL, P. J.; CALVERT, C.; ATZORN, R.; WASTERNACK, C.; LEYSER, H. M. O; BOWLES, D. J. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. **American Association for the Advancement of Science**, v. 274, n. 5294, p. 1914–1917, 1996.

STAHLY, D. P.; ANDREWS, R. E.; YOUSTEN, A. A. The genus Bacillus – Insect Pathogens. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. -H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes: A handbook on the biology of bactéria.** New York: Springer, p. 563- 608, 2006.

DOUGLAS, A. E. Mycetocyte symbiosis in insects. **Biological Reviews**, v. 64, n. 4, p. 409–434, 1989.

DOUGLAS, A. E. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. **Annual Reviews in Entomology**, v. 43, p. 17–37, 1998.

DOUGLAS, A. E. The microbial dimension in insect nutritional ecology. **Functional Ecology**, v. 23, p. 38–47, 2009.

DOW, J. A; HARVEY, W. R. Role of midgut electrogenic K^+ pump potential difference in regulating lumen K^+ and pH in larval lepidoptera. **The Journal of experimental biology**, v. 140, p. 455–63, 1988.

EGAMBERDIYEVA, D. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. **Applied Soil Ecology**, v. 36, n. 2-3, p. 184–189, 2007.

ENGEL, P.; MORAN, N. A. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. **Federation of European Microbiological Societies- Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 699–735, 2013.

ERB, M.; MELDAU, S.; HOWE, G. A. Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 5, p. 250–259, 2012.

FELDHAAR, H. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. **Ecological Entomology**, v. 36, n. 5, p. 533–543, 2011.

FIGUEIREDO, J. E. F.; GOMES, E. A.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. P.; TEIXEIRA, M. A.; LIMA, G. V. C.; BRESSAN, W. Molecular analysis of endophytic bacteria from the genus *Bacillus* isolated from tropical maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 522-534, 2009.

FLÓREZ, L. V.; BIEDERMANN, P. H. W.; ENGL, T.; KALTENPOTH, M. Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 7, p. 904–936, 2015.

FUKATSU, T.; NIKOH, N.; KAWAI, R.; KOGA, R. The secondary endosymbiotic bacterium of the Pea Aphid *Acyrthosiphon pisum* (Insecta : Homoptera). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 2748–2758, 2000.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology - A sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 7–8, p. 471–499, 2005.

GIL, R.; LATORRE, A.; MOYA, A. Bacterial endosymbionts of insects: Insights from comparative genomics. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 11, p. 1109–1122, 2004.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria : Mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 15, 2012.

GLICK, B. R.; CHENG, Z.; CZARNY, J.; DUAN, J. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 329–339, 2007.

GOND, S. K.; BERGEN, M. S.; TORRES, M. S.; WHITE JR, J. F. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize**. Microbiological Research**, v. 172, p. 79-87, 2015.

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean Caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n. 4, p. 487–488, 1976.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. **Evolution of the Insects**, New York: Cambridge University Press, p. 755, 2005.

HALOI, K.; KALITA, M.; NATH, R.; DEVI, D. Characterization and pathogenicity assessment of gut-associated microbes of muga silkworm *Antheraea assamensis* Helfer (Lepidoptera: Saturniidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 138, p. 73-85, 2016.

HANIN, A.; SAVA, I.; BAO, Y. Y.; HEBNER, J.; HARTKE, A.; AUFFRAY, Y.; SAUVAGEOT, N. Screening of *in vivo* activated genes in *Enterococcus faecalis* during insect and mouse infections and growth in urine. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. 1-12, 2010.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463–471, 2008.

HARTLEY, H. O. The maximum *F*-Ratio as a short-cut test for heterogeneity of variance. **Oxford University Press on behalf of Biometrika Trust**, v. 37, n. 3, p. 308–312, 1950.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion : a review. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 579–598, 2010.

HIGASHIGUCHI, D. T.; HUSSENEDER, C.; GRACE, J. K.; BERESTECKY, J. M. *Pilibacter termitis* gen. nov., sp. nov., a lactic acid bacterium from the hindgut of the Formosan subterranean termite (*Coptotermes formosanus*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 15–20, 2006.

HILKER, M.; MEINERS, T. Early herbivore alert: Insect eggs induce plant defense. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 7, p. 1379–1397, 2006.

HÖFLICH, G. Colonization and growth promotion of non-legumes by Rhizobium bacteria. **Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology**, p. 39–42, 1999.

HOSOKAWA, T.; KIKUCHI, Y.; NIKOH, N.; SHIMADA, M.; FUKATSU, T. Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. **PLoS Biology**, v. 4, n. 10, p. 1841–1851, 2006.

HOU, X.; BOYETCHKO, S. M.; BRKIC, M.; OLSON, D.; ROSS, A.; HEGEDUS, D. Characterization of the anti-fungal activity of a *Bacillus* spp. associated with sclerotia from *Sclerotinia sclerotiorum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 4, p. 644–653, 2006.

HOWE, G. A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 41–66, 2008.

IDRIS, E. E.; IGLESIAS, D. J.; TALON, M.; BORRISS, R. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (iaa) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 6, p. 619–626, 2007.

INDIRAGANDHI, P.; ANANDHAM, R.; MADHAIYAN, M.; SA, T. M. Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of Diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Current Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 327–333, 2008.

ISHIKAWA, H. Insect Symbiosis: An Introduction. In: BOURTZIS, K. M.; MILLER, A. **Insect Symbiosis**. Flórida: CRC press, p. 638, 2003.

JI, X.; LU, G.; GAI, Y.; ZHENG, C.; MU, Z. Biological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic *Bacillus subtilis* strain. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology**, v. 65, n. 3, p. 565-573, 2008.

JOHNSTON, P. R.; CRICKMORE, N. Gut bacteria are not required for the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* toward the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 15, p. 5094–5099, 2009.

JOHNSTON, P. R.; ROLFF, J. Host and symbiont jointly control gut microbiota during complete metamorphosis. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 11, p. 1–11, 2015.

KAUR, T.; VASUDEV, A.; SOHAL, S. K.; MANHAS, R. K. Insecticidal and growth inhibitory potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16 on major pest of India, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Microbiology**, v. 14, n. 227, p. 1-9, 2014.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 299–328, 2002.

KIKUCHI, Y. Endosymbiotic bacteria in insects: Their diversity and culturability. **Microbes and Environments**, v. 24, n. 3, p. 195–204, 2009.

KIKUCHI, Y.; HOSOKAWA, T.; FUKATSU, T. Insect-microbe mutualism without vertical transmission: A stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 13, p. 4308–4316, 2007.

KIKUCHI, Y.; HOSOKAWA, T.; NIKOH, N.; MENG, X. -Y.; KAMAGATA, Y.; FUKATSU, T. Host-symbiont co-speciation and reductive genome evolution in gut symbiotic bacteria of acanthosomatid stinkbugs. **BMC Biology**, v. 7, n. 2, p. 1-22, 2009.

KIM, O. -S.; CHO, Y. -J.; LEE, K.; YOON, S. -.H; KIM, M.; NA, H.; PARK, S. -C.; JEON, Y. S.; LEE, J. -H.; YI, H.; WON, S.; CHUN, J. Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16s rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 716–721, 2012.

KLEPZIG, K. D.; ADAMS, A S.; HANDELSMAN, J.; RAFFA, K. F. Symbioses: A key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. **Environmental entomology**, v. 38, n. 1, p. 67–77, 2009.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

LEONG, J. Siderophores : Their role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 187–209, 1986.

LEUNG, T. L. F; POULIN, R. Parasitism, commensalism, and mutualism: Exploring the many shades of symbioses. **Vie et Milieu- Life and Environment**, v. 58, n. 2, p. 107–115, 2008.

LI, M.; WANG, B.; ZHANG, M.; RANTALAINEN, M.; WANG, S.; ZHOU, H.; ZHANG, Y.; SHEN, J.; PANG, X; ZHANG, M.; et al. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. , v. 105, n. 6, p. 2117–2122, 2008.

LIU, Y.; PAN, X.; LI, J. Current agricultural practices threaten future global food production. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, v. 28, n. 2, p. 203–216, 2015.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176–177, 1962.

MARGULIS, L.; FESTER, R. **Symbiosis as a source of evolutionary innovation**. Cambridge: Massachusetts Institute of Technology Press, p. 459, 1991.

MARQUES, A. P. G. C.; PIRES, C.; MOREIRA, H.; RANGEL, A. O. S. S.; CASTRO, P. M. L. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 8, p. 1229–1235, 2010.

MARTIN, J. D.; MUNDT, J. O. Enterococci in insects. **Applied microbiology**, v. 24, n. 4, p. 575–580, 1972.

MARTINEZ, A. I. F.; FERNANDEZ, M. J. V.; ROCA, J. A. C.; LOPEZ-ROMAN, J. M.; MARTINEZ, J. A. N.; PICÓ, I. B. Pure culture of strain AH2 of the *Bacillus velezensis* species and a product for the biological control of phytopathogenic fungi. **United States Patent**, v. 2, n. 12, p. 1-3, 2013.

MASON, K. L.; STEPIEN, T. A; BLUM, J. E.; HOLT, J. F.; LABBE, N. H.; RUSH, J. S.; RAFFA, F.; HANDELSMAN, J. From commensal to pathogen: Translocation of *Enterococcus faecalis* from the midgut to the hemocoel of *Manduca sexta*. **mBio**, v. 2, n. 3, p. 1–7, 2011.

MENG, Q.; JIANG, H.; HAO, J. J. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth. **Biological Control**, v. 98, p. 18–26, 2016.

MITHOFER, A.; BOLAND, W. Recognition of herbivory-associated molecular patterns. **Plant Physiology**, v. 146, n. 3, p. 825–831, 2008.

MORAN, N. A. Symbiosis. **Current Biology**, v. 16, n. 20, p. 866-871, 2006.

MORAN, N. A.; DUNBAR, H. E.; WILCOX, J. L. Regulation in a reduced bacterial, genome: Nutrient-provisioning genes of the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 2, p. 4229-4237, 2005.

MORAN, N. A.; BAUMANN, P. Bacterial endosymbionts in animals. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 270–275, 2000.

MÜLLER, H.; BERG, G. Impact of formulation procedures on the effect of the biocontrol agent *Serratia plymuthica* HRO-C48 on Verticillium wilt in oilseed rape. **BioControl**, v. 53, n. 6, p. 905–916, 2008.

NAVA, D. E.; PARRA, J. R. P. Development and soybean leaf consumption by *Urbanus proteus proteus* (L.). **Scientia Agricola**, v. 59, n. 4, p. 661–663, 2002.

NWIBO, D. D. ANIEL; MATSUMOTO, Y.; SEKIMIZU, K. Identification and methods for prevention of *Enterococcus mundtii* infection in silkworm larvae, *Bombyx mori*, reared on artificial diet. **Drug discoveries & therapeutics**, v. 9, n. 3, p. 184–190, 2015.

OLDROYD, G. E. D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 252–263, 2013.

OLIVER, K. M.; RUSSELL, J. A.; MORAN, N. A.; HUNTER, M. S. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 4, p. 1803–1807, 2003.

OSBORN, F.; BERLIOZ, L.; VITELLI- FLORES, J.; MONSALVE, W.; DORTA, B.; LEMOINE, V. R. Pathogenic effects of bacteria isolated from larvae of *Hylesia metabus* Crammer (Lepidoptera: Saturniidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 80, n. 1, p. 7-12, 2002.

OULHEN, N.; SCHULZ, B. J.; CARRIER, T. J. English translation of Heinrich Anton de Bary's 1878 speech, "*Die Erscheinung der Symbiose*" ("*De la symbiose*"). **Symbiosis**, v. 69, n. 3, p. 131–139, 2016.

PARMENTIER, E.; MICHEL, L. Boundary lines in symbiosis forms. **Symbiosis**, v. 60, n. 1, p. 1–5, 2013.

PARRA, J. R.; PANIZZI, A. R.; M. L. HADDAD. Índices nutricionais para medir consumo e utilização de alimentos por insetos. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. **Ecologia nuticional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole/CNPq, p.37–90, 2009.

PENROSE, D. M.; GLICK, B. R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiologia Plantarum**, v. 118, n. 1, p. 10–15, 2003.

PERRIG, D.; BOIERO, M. L.; MASCIARELLI, O. A.; PENNA, C.; RUIZ, O. A.; CASSÁN, F. D.; LUNA. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 5, p. 1143–1150, 2007.

PIETERSE, C. M. J.; LEON-REYES, A.; VAN DER ENT, S.; VAN WEES, S. C. M. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 308–316, 2009.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz- FEALQ, p. 451, 2009.

PONTES, M. H.; DALE, C. Culture and manipulation of insect facultative symbionts. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 406–412, 2006.

RAIJ, B. V. **Fertilidade do solo e adubação**. São Paulo: Ceres, p. 343, 1991.

RAJAGOPAL, R. Beneficial interactions between insects and gut bacteria. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 114–119, 2009.

RASHID, S.; CHARLES, T. C.; GLICK, B. R. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 217–224, 2012.

RAY, S.; GAFFOR, I.; ACEVEDO, F. E.; et al. Maize Plants recognize herbivore-associated cues from caterpillar frass. **Journal of Chemical Ecology**, v. 41, n. 9, p. 781–792, 2015.

RAYMOND, B.; JOHNSTON, P. R.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D.; CRICKMORE, N. Bacillus thuringiensis: An impotent pathogen? **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 189–194, 2010.

RAYMOND, B.; JOHNSTON, P. R.; WRIGHT, D. J.; ELLIS, R. J.; CRICKMORE, N.; BONSALL, M. B. A mid-gut microbiota is not required for the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* to diamondback moth larvae. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 2556–2563, 2009.

REN, J. –H.; LI, H.; WANG, Y. –F.; YE, J. –R.; YAN, A. –Q.; WU, X. –Q. Biocontrol potential of an endophytic *Bacillus pumilus* JK-SX001 against poplar canker. **Biological Controle**, v. 67, n. 3, p. 421-430, 2013.

ROH, J. Y.; LIU, Q.; CHOI, J. Y.; WANG, Y.; SHIM, H. J.; XU, H. G.; CHOI, G. J.; KIM, J. -C.; JE, Y. H. Construction of a recombinant *Bacillus velezensis* strain as an integrated control agent against plant diseases and insect pests. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 10, p. 1223–1229, 2009.

ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 63–71, 2006.

ROMOLI, O.; SAVIANE, A.; BOZZATO, A.; D'ANTONA, P.; TETTAMANTI, G.; SQUARTINI, A.; CAPPELLOZA, S.; SANDRELLI, F. Differential sensitivity to infections and antimicrobial peptide-mediated immune response in four silkworm strains with different geographical origin. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1048, p. 1–16, 2017.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor- joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.

SAMBROOK, J. J.; RUSSELL, D. D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 2344, 2001.

SANTNER, A.; CALDERON-VILLALOBOS, L. I. A.; ESTELLE, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 301–307, 2009.

SARMENTO, R. A.; LEMOS, F.; BLEEKER, P. M.; SCHUURINK, R. C.; PALLINI, A.; OLIVEIRA, M. G. A.; LIMA, E. R.; KANT, M.; SABELIS, M. W.; JANSSEN, A. A herbivore that manipulates plant defence. **Ecology Letters**, v. 14, n. 3, p. 229–236, 2011.

SCHMELZ, E. A; ENGELBERTH, J.; ALBORN, H. T.; TUMLINSON, J. H.; TEAL, P. E. A. Phytohormone-based activity mapping of insect herbivore-produced elicitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 2, p. 653–657, 2009.

SCHMID, R. B.; LEHMAN, R. M.; BRÖZEL, V. S.; LUNDGREN, J. G. An indigenous gut bacterium , *Enterococcus faecalis* (Lactobacillales : Enterococcaceae), increases seed consumption by *Harpalus pensylvanicus* (Coleoptera : Carabidae). **Florida entomologist**, v. 97, n. 2, p. 575–584, 2014.

SCHOONHOVEN, L. M.; JERMEY, T.; VAN LOON, J. J. A. **Insect-Plant Biology**. New York: Oxford University Press, p. 421, 2005.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Oxford University Press on behalf of Biometrika Trust**, v. 52, n. 3, p. 591–611, 1965.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* Species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, n. 3, p. 313–340, 1966.

SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J.; SRINIVASAN, M. Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 205–240, 2004.

SUGIO, A.; DUBREUIL, G.; GIRON, D.; SIMON, J. C. Plant-insect interactions under bacterial influence: Ecological implications and underlying mechanisms. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 2, p. 467–478, 2014.

SUN, l.; LU, Z.; BIE, X.; LU, F.; YANG, S. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1259-1266, 2006.

SUNNUCKS, P.; HALES, D. F. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). **Molecular biology and evolution**, v. 13, n. 3, p. 510–524, 1996.

TADDEI, A.; VALDERRAMA, M.; GIARRIZZO, J.; REY, M.; CASTELLI, C. Chemical screening: A simple approach to visualizing *Streptomyces* diversity for drug discovery and further research. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 3, p. 291-297, 2006.

TANG, X.; FREITAK, D.; VOGEL, H.; PING, L.; SHAO, Y.; CORDERO, E. A.; ANDERSEN, G.; WSTERMANN, M.; HECKEL, D. G.; BOLAND, W. Complexity and Variability of Gut Commensal Microbiota in Polyphagous Lepidopteran Larvae. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. 1-9, 2012.

TAN, G. Y. A.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Exploration of *Amycolatopsis* diversity in soil using genus-specific primers and novel selective media. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 7, p. 557–569, 2006.

TEALE, W. D.; PAPONOV, I. A.; PALME, K. Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 11, p. 847–859, 2006.

TENDULKAR, S. R.; SAIKUMARI, Y. K.; PATEL, V.; RAGHOTAMA, S.; MUNSHI, T. K.; BALARAM, P.; CHATTOO, B. B. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2331–2339, 2007.

THAKUR, A.; DHAMMI, P.; SAINI, H. S.; KAUR, S. Pathogenicity of bacteria isolated from gut of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and fitness costs of insect associated with consumption of bacteria. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 127, p. 38-46, 2015.

TURNER, S.; PRYER, K. M.; MIAO, V. P. W.; PALMER, J. D. Investigating deep phylogenetic relationships among Cyanobacteria and Plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 327–338, 1999.

VAN HAM, R. C. H. J.; KAMERBEEK, J.; PALACIOS, C.; RAUSELL, C.; ABASCAL, F.; BASTOLLA, U.; FERNÁNDEZ, J. M.; JIMÉNEZ, L.; POSTIGO, M.; SILVA, F. J.; TAMAMES, J.; VIGUERA, E.; LATORRE, A.; VALENCIA, A.; MORÁN, F.; MOYA, A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 2, p. 581-586, 2003.

VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SCHLINDWEIN, G.; GRANADA, C. E.; GIONGO, A.; BENEDUZI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Occurrence of plant growth-promoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul state. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 5, p. 1227–1235, 2009.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571–586, 2003.

VISÔTTO, L. E.; OLIVEIRA, M. G. A.; RIBON, A. O. B.; MARES-GUIA, T. R.; GUEDES, R. N. C. Characterization and identification of Proteolytic bacteria from the gut of the Velvetbean Caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, v. 38, n. 4, p. 1078–1085, 2009.

WANG, M.; ZHAO, W. Z.; XU, H.; WANG, Z. W.; HE, S. Y. *Bacillus* in the guts of honey bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae) mediate changes in amylase values. **European Journal of Entomology**, v. 112, n. 4, p. 619–624, 2015.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697–703, 1991.

WERNEGREEN, J. J. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 11, p. 850–861, 2002.

WIELKOPOLAN, B.; OBREPALSKA-STEPLOWSKA, A. Three-way interaction among plants, bacteria, and coleopteran insects. **Planta**, v. 244, n. 2, p. 313–332, 2016.

WU, J.; BALDWIN, I. T. New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. **Annual Review of Genetics**, v. 44, p. 1–24, 2010.

XIANG, H.; WEI, G. -F.; JIA, S.; HUANG, J.; MIAO, X. -X.; ZHOU, Z.; ZHAO, L. -P.; HUANG, Y. -P. Microbial communities in the larval midgut of laboratory and field populations of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, n.11, p. 1085-1092, 2006.

YOUNG, J. M. Renaming of *Agrobacterium larrymoorei* Bouzar and Jones 2001 as *Rhizobium larrymoorei* (Bouzar and Jones 2001) comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 149, 2004.

ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants : the hologenome theory of evolution. **Federation of European Microbiological Societies- Microbiology Reviews**, v. 32, n. 5, p. 723-735, 2008.

ANEXOS

ANEXO A. Valores dos coeficientes (β), erro padrão, R^2 e valor de P de altura de planta (cm) de milho inoculadas via semente (*bio-priming*) e solo com as bactérias IIL-Sfm05, IILSfc-sus01, IIL-Sfb05, IILzm-Idp03, IIL-ASP45 e controle em função da avaliação feita nos diferentes dias após a emergência (DAE), correspondente a Figura 7. ESALQ, Piracicaba-SP, 2017

Tratamentos	Altura de planta							
	Semente (*bio-priming*)				Solo			
	Coeficiente (β)	Erro padrão	R^2	*p*	Coeficiente (β)	Erro padrão	R^2	*p*
IIL-Sfm05	Y=2,500x -6,480	0,1241	0,9927	0,0003	Y=2,639x -9,575	0,0722	0,9978	<0,0001
IILSfc-sus01	Y=2,348x -5,294	0,1285	0,9911	0,0004	Y=2,503x -7,538	0,1247	0,9926	0,0003
IIL-Sfb05	Y= 2,346 x -11,080	0,1605	0,9862	0,0007	Y= 2,710x -13,910	0,1334	0,9928	0,0003
IILzm-Idp03	Y=2,601 x -5,199	0,0849	0,9968	<0,0001	Y=2,492x -6,960	0,2476	0,9712	0,0021
IIL-ASP45	Y=1,959 x -5,915	0,1069	0,9911	0,0004	Y=2,441x -11,590	0,2524	0,9689	0,0023
Controle	Y=2,129 x +1,801	0,1217	0,9903	0,0004	Y=2,22x -2,017	0,2216	0,9705	0,0022

ANEXO B. Valores dos coeficientes (β), erro padrão, R^2 e valor de P de diâmetro de colmo (mm) de milho inoculadas via semente (bio-priming) e solo com as bactérias IIL-Sfm05, IILSfc-sus01, IIL-Sfb05, IILzm-Idp03, IIL-ASP45 e controle em função da avaliação feita nos diferentes dias após a emergência (DAE), correspondente a Figura 7. ESALQ, Piracicaba-SP, 2017

Tratamentos	Diâmetro de colmo							
	Semente (*bio-priming*)				Solo			
	Coeficiente (β)	Erro padrão	R^2	*p*	Coeficiente (β)	Erro padrão	R^2	*p*
IIL-Sfm05	Y=0,086x +2,358	0,0122	0,9425	0,006	Y=0,092x +1,996	0,0090	0,9716	0,002
IILSfc-sus01	Y=0,086x +2,071	0,0037	0,9944	0,0002	Y=0,133x +1,164	0,0019	0,9993	<0,0001
IIL-Sfb05	Y= 0,065x +2,118	0,0078	0,9588	0,0036	Y=0,121x +1,159	0,0130	0,9662	0,0027
IILzm-Idp03	Y=0,105x +1,998	0,0081	0,9825	0,001	Y=0,090x +2,003	0,0088	0,9719	0,002
IIL-ASP45	Y=0,071x +1,818	0,0072	0,9698	0,0023	Y=0,073x +1,973	0,0041	0,9907	0,0004
Controle	Y=0,079x +2,283	0,0212	0,8239	0,0332	Y=0,078x +2,051	0,0043	0,9905	0,0004

ANEXO C. Valores dos coeficientes (β), erro padrão, R^2 e P de número de folha por planta de milho inoculadas via semente (*bio-priming*) e solo com as bactérias IIL-Sfm05, IILSfc-sus01, IIL-Sfb05, IILzm-Idp03, IIL-ASP45 e controle em função da avaliação feita nos diferentes dias após a emergência (DAE), correspondente a Figura 7. ESALQ, Piracicaba-SP, 2017

Tratamentos	Número de folha/ planta							
	Semente (*bio-priming*)				Solo			
	Coeficiente (β)	Erro padrão	R^2	*p*	Coeficiente (β)	Erro padrão	R^2	*p*
IIL-Sfm05	Y=0,186x +1,512	0,0234	0,9549	0,0041	Y=0,217x +0,689	0,0184	0,9788	0,0013
IILSfc-sus01	Y=0,197x +1,159	0,0275	0,9447	0,0056	Y=0,183x +1,504	0,0135	0,984	0,0009
IIL-Sfb05	Y=0,147x +2,041	0,0108	0,9844	0,0008	Y=0,224x +0,629	0,0101	0,9939	0,0002
IILzm-Idp03	Y=0,200x +1,502	0,0162	0,9801	0,0012	Y=0,212x +0,665	0,0151	0,985	0,0008
IIL-ASP45	Y=0,1623x +1,295	0,017	0,9681	0,0024	Y=0,213x +0,410	0,0156	0,9842	0,0008
Controle	Y=0,1779x +1,808	0,0215	0,9578	0,0037	Y=0,150x +1,850	0,0209	0,945	0,0056