



BIOINSUMOS NO BIOCONTROLE DE *Dalbulus maidis*: UMA REVISÃO BIBLIOMÉTRICA

Alana Sulzbaker (Graduação em Agronomia)

Engenheira Agrônoma formada pela Universidade de Passo Fundo (2022).

Mestranda pelo Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo (UPF).

E-mail: alanasulzbaker@gmail.com

Crislaine Sartori Suzana-Milan (Doutora em Agronomia)

Engenheira Agrônoma formada pela Universidade Federal de Santa Maria, campus Frederico Westphalen, RS (2/2012).

Mestra em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de Passo Fundo, RS (2015).

Doutora em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas pela mesma instituição (2018), com tese na área de Entomologia Agrícola.

E-mail: ssuzana@upf.br

Luciane Maria Colla (Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos)

Possui graduação em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande (1999), mestrado (2002) e doutorado (2009) em Engenharia e Ciência de Alimentos pela mesma universidade.

E-mail: lmcolla@upf.br

Resumo

Os danos diretos e indiretos causados por *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) no milho representam uma preocupação recorrente no Brasil. Este inseto vetor é altamente eficiente na propagação dos patógenos responsáveis pelos enfezamentos e pelo vírus rayado fino, ocasionando perdas significativas na produção da cultura. Diante da resistência das pragas aos inseticidas químicos e dos impactos que causam ao agroecossistema, o controle biológico surge como uma alternativa promissora. Fungos entomopatogênicos dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium*, assim como bactérias do gênero *Bacillus*, são utilizados em bioinsumos devido à sua virulência aos hospedeiros, facilidade de isolamento e produção através de processos fermentativos, além da possibilidade de serem utilizadas suas enzimas e metabólitos extracelulares

diretamente no controle de patógenos e pragas na agricultura. Porém, o desafio atual reside em compreender as condições ideais de cultivo e os nutrientes essenciais para a produção de bioinsumos à base de fungos entomopatogênicos e bactérias, utilizando meios de cultivo de baixo custo que permitam a manutenção da viabilidade celular. Esta revisão aborda as características de *D. maidis* e dos fitopatógenos transmitidos à cultura do milho, além de sintetizar as etapas dos processos fermentativos para a produção de bioinsumos, apresentando-os como uma alternativa de controle mais sustentável. Destaca-se que as informações fornecidas servirão como um guia para entender o cenário da produção de milho no Brasil e para a implementação de novas estratégias destinadas a reduzir as populações de *D. maidis* e conter a propagação da doença do atrofiamento do milho.

Palavras-chave: *Dalbulus maidis*. Biocontrole. Conídios. Bioinsumos. Agricultura sustentável.

Abstract

Direct and indirect injury caused by *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) to corn represents a recurring concern in Brazil. This vector is highly efficient in spreading the pathogens responsible for stunting and the rayado fine virus, causing significant losses in crop production. Given the resistance of pests to chemical insecticides and the impacts they cause to the agroecosystem, biological control appears as a promising alternative. Entomopathogenic fungi of the genera *Beauveria* and *Metarhizium*, as well as bacteria of the genus *Bacillus*, are used in bioinputs due to their virulence to hosts, ease of isolation and production through fermentative processes, in addition to the possibility of using their enzymes and extracellular metabolites directly to control pathogens and pests. However, the current challenge lies in understanding the ideal cultivation conditions and essential nutrients for the production of bioinputs based on entomopathogenic fungi and bacteria, using low-cost cultivation media that allow the maintenance of cell viability. This review addresses the characteristics of *D. maidis* and the phytopathogens transmitted to corn crops, in addition to summarizing the stages of the fermentative processes for the production of bioinputs, presenting them as a more sustainable control alternative. It is noteworthy that the information provided will serve as a guide to understanding the corn production scenario and implementing new strategies aimed at reducing *D. maidis* populations and containing the spread of corn stunting disease.

Keywords: *Dalbulus maidis*. Biocontrol. Conidia. Bioinputs. Sustainable Agriculture.

1. Introdução

A cultura do milho (*Zea mays* L.) pode ser utilizada em diversos setores, abrangendo desde a alimentação humana e animal até a indústria de alta tecnologia, atribuindo grande importância econômica a essa espécie vegetal. O aumento da ocorrência de *D. maidis*, especialmente em áreas temperadas do Brasil anteriormente não afetadas, pode ser explicado por mudanças ocorridas no sistema de produção de milho, tais como: o cultivo de lavouras de milho nas safras precoce e tardia, sobreposição de culturas suscetíveis e utilização generalizada de híbridos geneticamente modificados resistentes a insetos e herbicidas – o que levou a menos pulverizações de inseticidas e a uma maior sobrevivência de plantas voluntárias, respectivamente (MENDES et al., 2018; CUNHA, 2021).

Nesse cenário, a cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) é considerada uma das principais pragas do milho pela capacidade de transmitir com eficiência as bactérias pertencentes à classe Mollicutes, sendo espiroplasma (*Spiroplasma kunkelii* Withcomb et al.) e fitoplasma (Maize bushy stunt; MBSP), além do vírus (Maize rayado fino vírus; MRFV), agentes causais, respectivamente, das doenças sistêmicas denominadas enfezamento pálido, enfezamento vermelho e virose da risca (GASPARICH, 2010; COTA et al., 2021). Embora sejam taxonomicamente distintos, os três patógenos coabitam nos vasos do floema do milho, são transmitidos de forma semelhante e possuem distribuição geográfica comum (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006; MACLEAN; HOGENHOUT, 2012).

Ressalta-se que essas doenças do milho são capazes de provocar perdas significativas na produtividade a partir das desordens fisiológicas provocadas nas plantas. A severidade de ocorrência ainda é favorecida pelas condições do ambiente, suscetibilidade do híbrido utilizado e estágio em que as plantas de milho são infectadas (SÁBATO, 2017). Por isso, um conjunto de práticas agrícolas é recomendado para o controle das populações de *D. maidis*, fundamentado pelo Manejo Integrado de Pragas – MIP (COTA et al., 2021).

O controle biológico destaca-se por ser uma medida crescente para utilização na agricultura (AB RAHMAN et al, 2018; PARRA, 2019). Agentes de controle, como fungos e bactérias podem ser utilizados em bioinsumos visando o controle de *D.*

maidis. Entre os fungos entomopatogênicos, existem duas espécies mais empregadas em controle biológico no Brasil, sendo *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. A aplicabilidade desses fungos se deve ao alto nível de virulência, a fácil produção de estruturas de propagação via processos fermentativos e a facilidade no seu isolamento, seja a partir de amostras de solo ou de insetos hospedeiros (MORA et al., 2017).

Do mesmo modo, bactérias do gênero *Bacillus* spp. também são amplamente aplicadas no controle biológico de diversas pragas e patógenos de plantas, devido à capacidade de sintetizar toxinas ou substâncias inseticidas (SCHÜNEMANN et al., 2014). Além disso, são poderosas aliadas da produção agrícola sustentável, pois atuam como promotores de crescimento vegetal (KUMAR et al., 2011; BORRISS, 2015; SANSINENEA, 2019). Salienta-se a importância de serem conduzidos estudos para verificar efeitos de controle por *Bacillus* sobre *D. maidis* em milho.

Os bioinsumos são os produtos desenvolvidos a partir de microrganismos, plantas, invertebrados, substâncias químicas (de origem microbiana, vegetal ou de invertebrados, tais como: enzimas, extratos, metabólitos secundários, feromônios, entre outros), os quais se destinam ao controle biológico. Tratando-se das estruturas de propagação dos microrganismos, o conídio é o mais adequado para formulações de bioinsumos, por possuir maior resistência às condições adversas do meio onde se encontra (ROJAS, 2015). Esses conídios são produzidos a partir de bioprocessos fermentativos, seja por fermentação submersa (FSub), utilizando-se substratos líquidos, ou por fermentação em estado sólido (FES), a partir de substratos sólidos, nos biorreatores (POITEVIN, 2019; MONNERAT et al., 2020; BASSO et al., 2023).

Estudos sobre os bioinsumos baseados no uso de microrganismos como *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp. e *Bacillus* sp. para o controle de *D. maidis*, ainda necessitam ser realizados, para esclarecer as condições de cultivo e nutrientes limitantes, a fim de utilizar meios de cultivo alternativos e baratos para favorecer o uso em maior escala na agricultura (ROJAS, 2015; MEYER et al, 2022).

Esta revisão tem como objetivo apresentar a relevância de *D. maidis* e dos fitopatógenos transmitidos na cultura do milho e incentivar o uso de agentes biológicos para o controle de pragas. Também, discutir o modo de ação desses microrganismos no hospedeiro e os processos fermentativos utilizados para a multiplicação de propágulos e enzimas e produção de bioinsumos a partir destes

microrganismos.

2. Metodologia

A metodologia desta revisão foi realizada por meio de uma revisão bibliométrica em bases de dados internacionais encontradas no repositório da Scopus e ScienceDirect a partir de palavras chaves relacionadas ao tema do estudo. A busca foi realizada em junho de 2023. Alguns dos termos definidos para a busca nos bancos de dados foram “*Dalbulus maidis*” AND “biocontrol” OR “entomopathogenic fungi” e “bioinsecticide” AND “metharizium” OR “beauveria”. Para construir a revisão, foram selecionadas as publicações mais relevantes, resultando em 100 artigos na revisão.

3. *Dalbulus maidis*: distribuição, comportamento e biologia

Existem 13 espécies distintas que compõem o gênero *Dalbulus*, distribuídas principalmente no México e em alguns países da América Latina. No Brasil, a cigarrinha-do-milho *D. maidis* é a única espécie relatada desse gênero (OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA; FRIZZAS, 2022). Após um período de baixa relevância, *D. maidis* e os patógenos associados ao atrofiamento do milho retornaram e impactaram negativamente a produção na Argentina (CARLONI et al., 2013), México (PÉREZ-LÓPEZ et al., 2016), sul dos EUA (JONES et al., 2021), Brasil (OLIVEIRA; FRIZZAS, 2022) e outras áreas subtropicais/temperadas das Américas (CARLONI et al., 2013; JUNIOR SANTANA et al., 2019; POZEBON et al., 2022).

A produção de milho do Brasil durante a safra agrícola 2017/2018 sofreu com a infestação por *D. maidis*, forçando os produtores a aumentar o uso de inseticidas em 85%, resultando em restrições econômicas (GOTEMS, 2018). Embora *D. maidis* tenha sido relatado pela primeira vez no Brasil há mais de 80 anos (MENDES, 1938), os surtos epidêmicos tornaram-se mais frequentes após 2015 (OLIVEIRA et al., 2020, OLIVEIRA; FRIZZAS, 2022). As mudanças no sistema de cultivo brasileiro, passando de uma predominância de milho de safra precoce para milho de safra tardia a partir de 2011/2012 podem explicar parte do aumento populacional e da

distribuição geográfica da espécie. A maior parte do milho do Brasil é cultivado nas regiões centro-oeste (predomínio de safra tardia: semeadura em fevereiro) e sul (predomínio de safra precoce: semeadura entre o final de julho e setembro) do país. Em certas regiões, é cultivada até uma terceira safra (semeada em maio). Atualmente, o milho safrinha corresponde a 75% de todo o milho cultivado no Brasil (CONAB, 2021). Esse cenário permite maior disponibilidade de recursos para *D. maidis* e, considerando que não há hospedeiros reprodutores além das espécies *Zea* (milho e teosintos), *D. maidis* consegue atingir longas distâncias, migrando em busca de plantas de milho, sejam elas cultivadas ou espontâneas (SABATO; OLIVEIRA, 2018).

Outro fator associado ao recente aumento na ocorrência de *D. maidis* foi a introdução de híbridos de milho geneticamente modificados resistentes a insetos e herbicidas. Quanto ao milho resistente aos herbicidas, é provável que permaneça nas lavouras pós-colheita como plantas voluntárias, oriundas de sementes e espigas perdidas durante a colheita, que servem como hospedeiros durante o inverno para *D. maidis* (TSAI, 2008; POZEBON et al., 2022). Em relação ao milho resistente a insetos, sua adoção levou à redução do número de aplicações de inseticidas (BROOKES; BARFOOT, 2012) e, conseqüentemente, ao agravamento dos danos às espécies não alvo (CATARINO et al., 2015), incluindo *D. maidis* (VIRLA et al., 2013). Dessa maneira, as plantas de milho são encontradas nas lavouras brasileiras no decorrer do ano todo, aumentando os recursos alimentares e os criadouros disponíveis tanto para o inseto vetor quanto para seus fitopatógenos associados (POZEBON et al., 2022).

Quanto as características biológicas, *D. maidis* apresenta desenvolvimento hemimetábolo ou metamorfose incompleta: do ovo eclode a ninfa que se desenvolve até o inseto adulto. O período embrionário ocorre em cerca de 8 dias e as ninfas passam, em geral, por cinco instares com duração média de 17 dias à temperatura de 26 °C. A longevidade dos adultos varia de 30 a 78 dias para fêmeas e machos, respectivamente (COTA et al., 2021). As fêmeas maduras ovipositam em média 15 ovos por dia durante a maior parte de sua vida adulta, com fecundidade total variando de 128 a 611 ovos por fêmea. Os ovos são brancos e têm 1,3 mm de comprimento, sendo inseridos isoladamente no tecido vegetal, sob a camada epidérmica das folhas ou profundamente na nervura central da folha (TSAI, 2008).

As cigarrinhas são insetos sugadores, os adultos apresentam coloração amarelo-palha, medem de 3,7 a 4,3 mm de comprimento e apresentam duas manchas circulares negras facilmente visíveis na parte dorsal da cabeça, entre os olhos compostos, facilitando sua identificação no campo. Deslocam-se lateralmente sobre a planta quando perturbadas e podem ser encontradas preferencialmente no cartucho das plantas de milho (COTA et al., 2021).

Apesar de causar danos diretos na planta a partir da sucção de seiva e favorecer a dessecação das folhas devido à oviposição endofítica (LUFT-ALBARRACIN et al., 2017), o maior problema ocasionado por *D. maidis* consiste na transmissão de três agentes fitopatogênicos: espiroplasma (*Spiroplasma kunkelii*, CSS), fitoplasma (Maize bushy stunt, MBSP) e vírus (Maize rayado fino virus, MRFV), agentes causais, respectivamente, das doenças sistêmicas denominadas enfezamento pálido, enfezamento vermelho e virose da risca. O efeito combinado da transmissão do patógeno e da sucção da seiva pode reduzir a produtividade do milho em até 100% se as plantas forem infectadas na fase inicial de desenvolvimento (VAN NIEUWENHOVE et al., 2016; SABATO, 2017).

4. Transmissão dos fitopatógenos

As espécies de espiroplasmas e fitoplasmas são bactérias procarióticas gram-positivas, unicelulares e desprovidas de parede celular, ambas classificadas na classe Mollicutes (GASPARICH, 2010). Embora compartilhem uma proximidade filogenética, apresentam atributos que as diferenciam. Os espiroplasmas são bactérias móveis, com formato helicoidal e cultiváveis *in vitro*. Diferentemente dos fitoplasmas, que são todos fitopatogênicos, os espiroplasmas apresentam uma ampla gama de hospedeiros, incluindo plantas, vertebrados e invertebrados (BALLINGER; PERLMAN, 2019), com os quais estabelecem relações patogênicas, comensais ou mutualísticas (CACCIOLA et al., 2017). Dentre eles, apenas três espécies de espiroplasmas ocasionam doenças em plantas: *Spiroplasma kunkelii* (em milho), *S. citri* (em citros) e *S. phoeniceum* (em vinca). Por outro lado, os fitoplasmas são pleomórficos, não helicoidais e não cultiváveis *in vitro*, apesar de alguns progressos nessa tentativa (CONTALDO et al., 2016; 2019).

Devido à sua restrição ao floema, a transmissão dos mollicutes depende principalmente de insetos que se alimentam de seiva nutritiva (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006; MACLEAN; HOGENHOUT, 2012). *D. maidis* pode adquirir o patógeno *S. kunkelii* (CSS) em menos de uma hora de alimentação no floema de plantas de milho infectadas. Após a ingestão, o patógeno atinge a hemolinfa do inseto, iniciando a replicação antes de circular sistematicamente (ÖZBEK et al., 2003). O *S. kunkelii* apresenta um período de latência variando de 17 a 23 dias, após o qual pode migrar para as glândulas salivares do inseto e ser transmitido para plantas de milho saudáveis (SABATO, 2017).

O fitoplasma MBSP pode ser adquirido por *D. maidis* após duas horas de alimentação em plantas infectadas. O período latente varia de 22 a 28 dias, com a inoculação ocorrendo após 30 minutos de alimentação. A permanência no vetor varia de 29 a 48 dias. Para MRFV, é necessário um mínimo de 6 horas de alimentação em plantas infectadas para a aquisição do vírus. O período latente, de 8 a 22 dias, requer um tempo mínimo de 8 horas para a inoculação. A retenção no vetor pode chegar até 20 dias (DUARTE et al., 2021).

A transmissão de mollicutes por insetos vetores envolve três fases distintas: aquisição, latência e inoculação. O período de aquisição refere-se ao momento em que o vetor adquire o patógeno da fonte de inóculo, como do floema. O intervalo entre a aquisição e a capacidade do vetor de transmitir o patógeno é conhecido como período de latência. Por último, o tempo necessário para que o patógeno seja introduzido em uma planta saudável denomina-se de período de inoculação (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006).

Adicionalmente, *D. maidis* realiza a transmissão dos patógenos de forma persistente e propagativa, uma vez que, ao adquiri-los, permanece infectiva ao longo de sua vida e, propaga os patógenos ao multiplicá-los em seu corpo (FAJARDO; NICKEL, 2019; SABATO, 2017). Com essa colonização nas glândulas salivares, os insetos são capazes de inocular os fitopatógenos em plantas saudáveis durante a alimentação. A eficiência da transmissão também está sujeita ao estágio do vetor e da planta, bem como às condições ambientais, como temperatura (COTA et al., 2021; DUARTE et al., 2021).

5. Sintomas dos fitopatógenos em planta hospedeira

Após a inoculação nas plantas de milho, os patógenos que retardam seu crescimento colonizam os tubos crivados do floema e se deslocam com o fluxo do fotossintato (açúcares e outros compostos energéticos), concentrando-se em tecidos e órgãos em processo ativo de crescimento, como folhas jovens, raízes, flores e frutos (GUSSIE et al., 1995).

Plantas afetadas pelo enfezamento exibem sintomas como a redução no crescimento e desenvolvimento, entrenós mais curtos, proliferação e deformação de espigas, espigas improdutivas e fragilização dos colmos, favorecendo infecções fúngicas que podem levar ao tombamento. De maneira geral, quando a infecção ocorre precocemente, entre os estádios de emergência (VE) até o estágio vegetativo com 8 a 10 folhas (V8-V10), a planta exibe um porte reduzido, caracterizando o fenômeno denominado "enfezamento" (COTA et al., 2021).

Quanto ao enfezamento pálido, os sintomas incluem estrias cloróticas delimitadas, que se originam na base das folhas, plantas com altura reduzida, entrenós encurtados, brotos nas axilas foliares e folhas com coloração avermelhada. Além disso, pode haver enfraquecimento dos colmos e proliferação de espigas. Os sintomas do enfezamento vermelho consistem no amarelecimento e/ou avermelhamento das folhas, frequentemente começando pelas bordas, juntamente com o perfilhamento e a proliferação de espigas por planta (COTA et al., 2021; SABATO; OLIVEIRA, 2020).

O MRFV, membro do gênero Marafivirus e da família Tymoviridae, induz a formação de pequenos pontos cloróticos nas folhas, os quais podem coalescer à medida que a doença avança, formando linhas ao longo das nervuras (COTA et al., 2021). A infecção precoce por MRFV pode ocasionar redução de crescimento e aborto das gemas florais (COTA et al., 2021; SABATO et al., 2018).

6. Biocontrole a partir de microrganismos entomopatogênicos

As estratégias de controle para as doenças do milho têm se concentrado, em grande parte, na aplicação de inseticidas direcionados aos insetos vetores, uma vez que,

atualmente, não existem ferramentas curativas disponíveis para as próprias doenças (PÉREZ-LÓPEZ et al., 2018). Uma alternativa potencial para o controle de *D. maidis* pode ser a utilização de fungos entomopatogênicos, microrganismos que infectam e matam insetos. Os fungos dos gêneros *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp., *Isaria* (*Cordyceps*) sp., bem como as bactérias do gênero *Bacillus* spp., são espécies importantes no controle de pragas em diversos ambientes e, portanto, podem ser explorados como base para o desenvolvimento de produtos comerciais.

Em síntese, para iniciar o ciclo de infecção dos fungos mencionados nos corpos dos invertebrados, faz-se necessária a dispersão dos esporos assexuados (conídios) através do vento, chuva, respingos ou até mesmo por vetores artrópodes (ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI, 2013; MASCARIN; JARONSKI, 2016). A infecção no hospedeiro ocorre de modo semelhante entre os fungos entomopatogênicos, evidenciando-se etapas distintas: adesão, germinação, diferenciação, penetração, colonização, reprodução e disseminação (DANNON et al., 2020).

A etapa de adesão caracteriza-se pelo reconhecimento e compatibilidade dos mecanismos dos conídios às células da cutícula do hospedeiro. Enzimas como as proteases, esterases e N-acetilglicosidases, presentes na superfície do esporo não germinado, desempenham um efeito crucial na adesão, na obtenção inicial de nutrientes e na modificação superficial das camadas mais externas da cutícula do hospedeiro (ALMEIDA et al., 2007; ASSIS; COSTA, 2010). Os conídios fixam-se à cutícula do inseto por meio de forças eletrostáticas e químicas (MASCARIN; JARONSKI, 2016) e, através da produção de mucilagem, induzem modificações epicuticulares, levando à germinação dos conídios (DANNON et al., 2020).

Quando as condições são favoráveis, acontece a germinação dos conídios, marcada pela formação de tubos germinativos. Consequentemente, os conídios desenvolvem e expandem um tubo germinativo em resposta à reidratação e estímulos químicos. Posteriormente, ocorre a diferenciação, caracterizada pelos apressórios, uma estrutura especializada que facilita a penetração, estimulada pelo contato físico com a cutícula do hospedeiro. Os apressórios transportam enzimas hidrolíticas que degradam a cutícula, possibilitando o crescimento de hifas para romper o tegumento do hospedeiro (MASCARIN; JARONSKI, 2016). A partir do apressório, impulsionado pela ação hidrolítica de enzimas, como proteases, quitinases e lipases, com destaque para as proteases, combinado com pressão e

outros fatores, como oxalato, o fungo consegue penetrar nas camadas da cutícula até atingir a hemolinfa do inseto, um ambiente abundante em nutrientes (ASSIS; COSTA, 2010; DANNON et al., 2020; SANDEEP et al., 2022).

Na hemolinfa, o fungo sofre um processo morfo-genético, de diferenciação de crescimento filamentosos para corpos de hifas unicelulares, semelhantes a leveduras ou blastosporos, que exploram estrategicamente nutrientes, colonizam tecidos internos e perturbam o sistema imunológico do hospedeiro. Durante este estágio da infecção, o fungo também pode secretar substâncias tóxicas, metabólitos, que ajudam a superar o sistema imunológico do inseto (MASCARIN; JARONSKI, 2016; DANNON et al., 2020).

Na hemolinfa, o fungo passa por um processo morfo-genético, convertendo-se de crescimento filamentosos para corpos de hifas unicelulares, semelhantes a leveduras ou blastosporos, que exploram estrategicamente nutrientes, colonizam tecidos internos e desregulam o sistema imunológico do hospedeiro. Durante essa fase da infecção, o fungo também pode secretar metabólitos, os quais auxiliam na supressão do sistema imunológico do inseto (MASCARIN; JARONSKI, 2016; DANNON et al., 2020).

A morte do hospedeiro geralmente é associada aos danos mecânicos, à liberação de toxinas fúngicas ou ambos (ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI, 2013). Após alguns dias, os conidióforos são exteriorizados no corpo mumificado, possuindo conídios recém-infeccionados para dispersão (disseminação passiva) (DANNON et al., 2020). O processo de infecção e a subsequente mortalidade são mais prolongados em comparação com os inseticidas químicos de contato (ZHANG et al., 2021; HERRICK; CLOYD, 2023).

Ressalta-se que os fungos e as bactérias podem exercer diferentes funções na agricultura. Podem contribuir para a produção de enzimas, hormônios e metabólitos que estimulam o crescimento das plantas, além de estar associados a morte direta de insetos quando realizam contato com os inóculos desses microrganismos. Assim, uma alternativa promissora para enfrentar os desafios associados à aplicação de microrganismos vivos nas lavouras consiste na utilização de enzimas (glucanases, proteases, lipases, quitinases, entre outras) e metabólitos extracelulares como agentes diretos no controle de patógenos e pragas (PEREIRA et al., 2007; BERINI et al., 2018; AITA, 2020).

Vários estudos têm demonstrado a eficiência das enzimas produzidas por fungos no controle biológico. Por exemplo, as quitinases são enzimas produzidas por uma variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, insetos, plantas e animais, para diferentes finalidades, como nutrição, morfogênese e defesa contra patógenos (ADRANGI; FARAMARZI, 2013). O interesse nessas enzimas tem crescido em várias áreas da biotecnologia devido às suas capacidades de degradar a quitina presente nas paredes celulares dos fungos e no exoesqueleto dos insetos. Portanto, podem ser utilizadas como agentes antimicrobianos ou inseticidas para o biocontrole dos patógenos das plantas (KARTHIK et al., 2017; AITA, 2020).

Na literatura, encontra-se que a aplicação de quitinase e β -1,3-glucanase, produzidas pelo fungo *Trichoderma harzianum*, resultou na inibição do crescimento do fungo *Sclerotium rolfii* (EL-KATATNY et al., 2001). Em um estudo similar, o uso de quitinase purificada, produzida pelo fungo *Gliocladium catenulatum*, interrompeu a germinação de conídios e o desenvolvimento de hifas dos fungos patogênicos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Botrytis cinerea* (MA et al., 2012).

As quitinases originárias de *Talaromyces flavus* foram purificadas e aplicadas no controle biológico de vários fungos patogênicos, incluindo *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium moniliforme* e *Magnaporthe grisea*, demonstrando resultados positivos para essa finalidade (DUO-CHUAN et al., 2005; AITA, 2020). Além de exercer efeito sobre fungos patogênicos, as enzimas fúngicas também possuem potencial para controlar nematoides. Estudos mostraram que a aplicação de proteases e quitinases, produzidas pelo fungo *Paecilomyces lilacinus*, resultou na inibição do desenvolvimento de ovos do nematoide *Meloidogyne javanica* (KHAN et al., 2004; AITA, 2020).

Alguns estudos também mencionam a aplicação direta de enzimas fúngicas purificadas para controlar insetos. Exemplificando, a utilização de quitinase purificada do fungo *Myrothecium verrucaria* possibilitou o controle eficaz das larvas do mosquito *Aedes aegypti*, obtendo uma taxa de mortalidade de 100% em 24 horas após a aplicação (MENDONSA et al., 1996). A aplicação de quitinases provenientes de *Metarhizium rileyi* foi capaz de inibir o desenvolvimento de larvas de *Trichoplusia ni* (MATSUMOTO, 2006). Em outro estudo, o meio de cultura do fungo *Beauveria bassiana* foi purificado para obtenção de quitinase, a qual demonstrou elevada

atividade inseticida contra pulgões de algodão (KIM; Je, 2010).

Em um estudo experimental, o extrato filtrado da cultura de *Trichoderma harzianum*, contendo quitinase, demonstrou ter efeito adverso no crescimento (resultando em 70% de mortalidade) e na metamorfose (com 100% de inibição) das larvas de *Helicoverpa armigera* (BINOD et al., 2007). Foram isoladas e purificadas duas quitinases a partir do extrato enzimático produzido pelo fungo *Talaromyces flavus*, as quais exibiram atividade contra a parede celular dos fungos *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*. Além disso, essas quitinases inibiram a germinação de esporos e o alongamento do tubo germinativo dos fungos *Alternaria alternata*, *Fusarium moniliforme* e *Magnaporthe grisea* (DUO-CHUAN et al., 2005). Também, o extrato enzimático rico em quitinase, produzido pelo fungo *Trichoderma asperellum*, foi submetido a avaliações quanto à sua capacidade de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos do gênero *Fusarium*. Os resultados revelaram uma zona máxima de inibição do crescimento micelial em *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. solani* e *F. udum* (KUMAR et al., 2012; AITA, 2020).

Observa-se que as enzimas são produtos de grande sucesso na esfera comercial, especialmente quando produzidas através do processo de Fermentação em Estado Sólido (FES). Exemplos notáveis incluem amilases, celulasas, pectinases, proteases, glucoamilases e quitinases (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). Porém, a produção de enzimas hidrolíticas via processos fermentativos ainda é predominantemente realizada por Fermentação Submersa (FSub) (KARTHIK et al., 2014; AITA, 2020).

Por isso, considerando que fungos como *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *I. fumosorosea* e, bactérias do gênero *Bacillus*, como *B. methylotrophicus* e *B. amyloliquefasciens*, são microrganismos com habilidade para produzir enzimas e metabólitos secundários, torna-se importante investigar condições e meios de cultivo que favoreçam essa produção por bioprocessos fermentativos. Além disso, é relevante explorar aplicações para o controle de pragas potenciais, como *D. maidis* na cultura do milho.

7. Métodos para produção de bioinsumos

Os conídios aéreos representam os principais propágulos infecciosos de fungos entomopatogênicos. Para produzir esses propágulos, são utilizados biorreatores, os quais facilitam a multiplicação por meio de processos fermentativos (BASSO et al., 2023). A seleção da metodologia de produção deve levar em conta o custo do processo, a produtividade e a qualidade dos esporos (ROBL et al., 2009). Independentemente da técnica, uma etapa crucial é a otimização das condições químicas e físicas do processo. Por isso, é essencial que o meio de cultivo seja economicamente viável, promova o crescimento de micélio e, por conseguinte, a esporulação com alto rendimento (KUMAR et al., 2011). Ademais, os biorreatores têm por finalidade proporcionar condições ideais de temperatura, pH, concentração de substrato, tamanho de partículas, minerais, oxigênio, entre outros fatores, a fim de que os microrganismos e células produzam os metabólitos desejados (ALVES, 2010; MEYER et al., 2022).

A produção industrial em biorreatores segue as seguintes etapas: formulação do meio de cultura e preparação do inóculo; preparo do inóculo (cultura pura em quantidade suficiente para a inoculação do biorreator); esterilização do meio, fermentador e equipamentos; fermentação; extração e purificação do produto; tratamento dos resíduos; e armazenamento (IWANICKI et al., 2022). Assim, a produção das unidades infecciosas de fungos entomopatogênicos e bactérias pode ser feita basicamente por três processos fermentativos:

1. Fermentação líquida ou submersa (FSub): processo que ocorre em um meio líquido com agitação, sendo o substrato constituído por fontes de carbono e nitrogênio (MASCARIN et al., 2015; 2019).

2. Fermentação em estado sólido (FES): processo que ocorre em um meio sólido caracterizado pela baixa quantidade de água livre; a matriz sólida (arroz, farelo de milho, farelo de trigo, casca de soja, entre outros) serve de suporte para o desenvolvimento da reação e fornece os nutrientes necessários para o crescimento microbiano (MASCARIN et al., 2015; JARONSKI, 2016; CUNHA et al., 2019).

3. Fermentação bifásica: consiste em um processo de duas etapas, com uma FSub para produção inicial de micélio ou esporos, os quais são inoculados em um substrato sólido (MASCARIN et al., 2018).

A FES é a metodologia geralmente utilizada para o cultivo de agentes de controle biológico, tais como *Beauveria* e *Isaria* (SILVA et al., 2018), *Lecanicillium* (= *Akanthomyces*) (MASCARIN et al., 2015; 2018), *Clonostachys* (VICCINI et al., 2007), *Metarhizium* (PRAKASH et al., 2008) e *Paecilomyces* (= *Purpureocillium*) (ROBL et al., 2009). Devido à simulação das condições naturais para o crescimento fúngico, o substrato na FES resulta em esporos com propriedades aprimoradas, incluindo eficácia e estabilidade (JACKSON, 1997; VICCINI et al., 2007). No entanto, as desvantagens associadas à FES incluem um período de fermentação mais prolongado, maior risco de contaminação, dificuldades na recuperação do produto e desafios no escalonamento do processo (JACKSON, 1997; MASCARIN et al., 2014; MASCARIN et al., 2015).

Na FES, os substratos empregados são geralmente grãos de cereais esterilizados e umedecidos, com destaque para o arroz. Além disso, esses substratos podem ser obtidos a partir de resíduos da agroindústria, como mandioca, soja, açúcar de beterraba, batatas, sorgo, farelos de trigo e milho, bagaço de cana-de-açúcar, sobras do processamento da indústria do café, bagaço de frutas (como maçã, uva e abacaxi), e resíduos das indústrias de óleos (canola, soja, palma), entre outros (PANDEY et al., 2000; GANDARILLA-PACHECO et al., 2019; JARONSKI, 2013; GHOREISHI et al., 2023).

Durante a realização da FSub, assegura-se um controle mais preciso dos parâmetros importantes para o crescimento dos microrganismos, como temperatura, pH e homogeneidade do substrato. Isso facilita a produção de quantidades significativas de propágulos em espaços físicos reduzidos e em prazos curtos, permitindo sua aplicação em larga escala por meio de biorreatores de tanque agitado (MASCARIN et al., 2015; SANTOS, 2017). Nesse contexto, a maioria dos fungos entomopatogênicos exibe um crescimento dimórfico na FSub, semelhante ao padrão observado no ambiente da hemocele do inseto. Esses fungos também podem gerar propágulos hidrofílicos submersos, denominados blastosporos, além de hifas e conídios submersos através do processo de conidiação de microciclos (HOLDER; KEYHANI, 2005; MASCARIN; JARONSKI, 2016).

Para o cultivo das bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, são utilizados biorreatores de FSub. Para isso, é essencial fornecer um meio de cultura apropriado. Os meios de cultura para essas bactérias comumente incluem uma fonte de

nitrogênio (extrato de caseína, caseína hidrolisada, peptona), uma fonte de carbono (glicose, dextrose, amido) e sais minerais (com micro e macro elementos). O meio às vezes é complementado com tampões (fosfato) e antiespumantes para facilitar o processo. A fonte de carbono não apenas fornece matéria-prima para muitos compostos celulares, mas também serve como fonte de energia. O nitrogênio é essencialmente necessário para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos. Os sais minerais atuam como cofatores e desempenham funções no controle da osmolaridade celular (MONNERAT et al., 2020).

Dentro do biorreator, após a adição do substrato, deve-se monitorar os parâmetros essenciais para o crescimento bacteriano. O controle do pH é fundamental, sendo ideal manter-se entre 6,8 e 7,2 no início do processo. A temperatura também deve ser controlada, permanecendo entre 28° e 32°C. Além disso, é necessário garantir que o nível de oxigênio dissolvido não chegue a valores inferiores a 20%, sendo idealmente mantido em torno de 40%. Isso se deve ao aumento da demanda por oxigênio conforme o processo fermentativo avança, necessitando de um fornecimento progressivo para atender às necessidades de cada microrganismo (MONNERAT et al., 2020). À medida que as fontes nutritivas do meio de cultura se esgotam, as bactérias entram em uma fase estacionária, na qual não é mais justificável continuar o processo. Esse é o ponto em que a fermentação é concluída (MONNERAT et al., 2020).

8. Considerações finais

Longe de ser apenas uma questão temporária, os surtos recentes de *D. maidis* e da doença do enfezamento do milho provavelmente se tornarão mais comuns no Brasil e em outros países produtores de milho. Isso demandará uma colaboração entre autoridades governamentais, pesquisadores e produtores para enfrentar esse problema fitossanitário e prevenir perdas de produtividade. Uma estratégia viável é combinar o controle químico com o uso de agentes biológicos compatíveis em uma mesma aplicação.

Assim, salienta-se ser primordial realizar pesquisas que tragam novas biotecnologias aos produtores de milho, visando aprimorar o manejo integrado de

pragas e garantir o potencial produtivo da cultura, mesmo em safras consecutivas. Deve-se priorizar o estudo das condições de cultivo dos microrganismos entomopatogênicos, buscando reduzir os custos de produção, prolongar a viabilidade dos propágulos nos bioinsumos e realizar ensaios para avaliar a eficácia do uso de enzimas e outros metabólitos no controle direto dos vetores ou fitopatógenos.

Referências

- AB RAHMAN, S. F. S. et al. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, v. 267, p. 102-111, 2018.
- ADRANGI, S.; FARAMARZI, M. A. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnology Advances*, v. 31, p. 1786-1795, 2013.
- AITA, B. C. Produção de enzimas hidrolíticas por fermentação em estado sólido e secagem por *spay drying*. 2020. 152 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Santa Maria, 2020.
- ALVES, F. Modelagem e simulação de biorreator operando com fungos *Trametes versicolor* para produção de enzima lacase. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Engenharia Mauá, Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, São Paulo, 2010.
- ASSIS, J. M. F.; COSTA, P. H. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* SOROKIN no controle das cigarrinhas-das-pastagens: *Deois flavopicta* STAL. *Intercursos Revista Científica*, v. 9, n. 1, p. 51-71, 2010.
- BALLINGER, M. J.; PERLMAN, S. J. The defensive Spiroplasma. *Current Opinion in Insect Science*, v. 32, p. 36-41, 2019.
- BASSO, V. et al. High concentration of spores and colony forming units of the biocontrol agent *Beauveria bassiana* via optimization of submerged cultivation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 47, 2023.
- BERINI, F. et al. Microbial and viral chitinases: Attractive biopesticides for integrated pest management. *Biotechnology Advances*, v. 36, p. 818-838, 2018.
- BINOD, P. et al. Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against *Helicoverpa armigera*. *Journal Applied Microbiology*, v. 103, p. 1845-1852, 2007.
- BORRIS, R. *Bacillus*, plant beneficial bacterium. In: LUGTENBERG, B. Principles of plant-microbe interactions: microbes for sustainable agriculture. *Principles of Plant-Microbe Interactions*, p. 379-391. 2015.

- BROOKES, G.; BARFOOT, P. Global impact of biotech crops: Environmental effects, 1996-2010. *GM Crops Food*, v. 3, p. 129–137, 2012.
- CACCIOLA, S. O. et al. *Spiroplasma* spp.: A plant, arthropod, animal and human pathogen. In: *Citrus Pathology*, p. 31-54, 2017.
- CARLONI, E. et al. Presence of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) and of *Spiroplasma kunkelii* in the temperate region of Argentina. *Journal of Economic Entomology*, v. 106, n. 4, p. 1574-1581, 2013.
- CATARINO, R. et al. The impact of secondary pests on *Bacillus thuringiensis* (Bt) crops. *Plant Biotechnology Journal*, v. 13, n. 5, p. 601-612, 2015.
- CONAB. Série histórica das safras. 2021. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-dassafras?start=20>>. Acesso em: junho de 2023.
- CONTALDO, N. et al. Molecular and biological characterization of phytoplasmas from coconut palms affected by the lethal yellowing disease in Africa. *Microbiological Research*, v. 223-225, p. 51-57, 2019.
- CONTALDO, N. et al. Development and evaluation of different complex media for phytoplasma isolation and growth. *Journal of Microbiological Methods*, v. 127, p. 105-110, 2016.
- COTA, L. V. et al. Manejo da cigarrinha e enfezamentos na cultura do milho. 2021, 17 p. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/225303/1/Carilha-Manejo-cigarrinha-enfezamentos-milho.pdf>>. Acesso em: junho de 2023.
- CUNHA, L. P. et al. Production of conidia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* ICB 425 in a tray bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 42, p. 1757-1768, 2019.
- CUNHA, L. P. et al. Produção de esporos de *Metarhizium anisopliae* ICB425 por cultivo em estado sólido com uso de resíduos como substrato. *Revista de Engenharia e Tecnologia*, v. 12, n 1, p. 17-25, 2021.
- DANNON, H. F. et al. Toward the efficient use of *Beauveria bassiana* in integrated cotton insect pest management. *Journal of Cotton Research*, v. 3, n. 24, p. 1-21, 2020.
- POZEBON, H.; STÜRMER, G. R.; AMEMANN, J. A. Cor stunt pathosystem and its leafhopper vector in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, v. 115, n. 6, p. 1817-1833, 2022.
- DUARTE, J. O.; MATTOSO, M. J.; GARCIA, J. C. Importância socioeconômica do milho. *Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas*, 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/milho/pre-producao/socioeconomia/importancia-socioeconomica>>. Acesso em: junho de 2023.
- DUO-CHUAN, L. I.; CHEN, S.; JING, L. U. Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus*.

- Mycopathologia, v. 159, p. 223-229, 2005.
- EL-KATATNY, M. H. et al. Characterization of a chitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, p. 137-143, 2001.
- FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O. Transmissão de vírus e controle de viroses em plantas. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2019, 24 p. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/195251/1/Doc110.pdf>>. Acesso em: junho de 2023.
- GANDARILLA-PACHECO, F. L. et al. Conidia production of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) in organic substrates through two propagation techniques. *Bioscience Journal*, v. 35, n. 4, p. 1227-1236, 2019.
- GASPARICH, G. E. Spiroplasmas and phytoplasmas: microbes associated with plant hosts. *Biologicals*, v. 38, p. 193-203, 2010.
- GHOREISHI, G.; BARRENA, R.; FONT, X. Using green waste as substrate to produce biostimulant and biopesticide products through solid-state fermentation. *Waste Management*, v. 159, p. 84-92, 2023.
- GUSSIE, J. S.; FLETCHER, J.; CLAYPOOL, P. L. Movement and multiplication of *Spiroplasma kunkelii* in corn. *Phytopathology*, v. 85, p. 1093-1098, 1995.
- HERRICK, N. J.; CLOYD, R. A. Performance of Entomopathogenic Fungal-Based Insecticides against the Citrus Mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) on Coleus (Lamiales: Lamiaceae) Plants under Greenhouse Conditions. *Journal of Entomological Science*, v. 58, n. 2, p. 187-200, 2023.
- HOLDER, D. J.; KEYHANI, N. O. Adhesion of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrate. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 9, p. 5260-5266, 2005.
- IWANICKI, N. S. A. et al. Controle de qualidade de produtos microbiológicos. In: MEYER, M. C. et al. *Bioinsumos na cultura da soja*. Brasília-DF, 1ª Ed., Cap. 29, p. 507-533, 2022.
- JACKSON, M. A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.19, p.180-187, 1997.
- JARONSKI, S. T. Mass Production on Entomopathogenic Fungi: State of the Art. In: MICROBIAL CONTROL OF INSECT AND MITE PESTS: FROM THEORY TO PRACTICE. Copyright Elsevier, p. 357-415, 2013.
- JONES, T. K. L. et al. Re-emergence of corn leafhopper (*Dalbulus maidis*; Hemiptera: Cicadellidae), an exotic and invasive pest of maize in South Texas. *Southwestern Entomologist*, v. 46, n. 4, p. 807-812, 2021.
- KARTHIK, N.; AKANKSHA, K.; PANDEY, A. Production, purification and properties of fungal chitinases: A review. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 52, p. 1025-1035, 2014.

- KARTHIK, N.; BINOD, P.; PANDEY, A. Chapter 15 - Chitinases In: CURRENT DEVELOPMENTS IN BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING: PRODUCTION, ISOLATION AND PURIFICATION OF INDUSTRIAL PRODUCTS. Copyright Elsevier, p. 335-368, 2017.
- KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. *Biological Control*, v. 31, p. 346-352, 2004.
- KIM, J. S.; JE, Y. H. A novel biopesticide production: attagel-mediated precipitation of chitinase from *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant for thermotolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 87, p. 1639-1648, 2010.
- KUMAR, D. P. et al. Studies on Exo-Chitinase Production from *Trichoderma asperellum* UTP-16 and Its Characterization. *Indian Journal Microbiology*, v. 52, p. 388-395, 2012.
- KUMAR, S.; SHARMA, H. K.; SARKAR, B. C. Effect of Substrate and Fermentation Conditions on Pectinase and Cellulase Production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in Submerged (SmF) and Solid State Fermentation (SSF). *Food Science and Biotechnology*, v. 20, p. 1289-1298, 2011.
- LUFT-ALBARRACIN, E.; TRIAPITSYN, S. V.; VIRLA, E. G. Egg parasitoids of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (Delong) (Hemiptera: Cicadellidae), in Argentina. *Neotropical Entomology*, v. 46, p. 666-677, 2017.
- MA, G. Z. et al. Purification and characterization of chitinase from *Gliocladium catenulatum* strain HL-1-1. *African Journal of Microbiology Research*, v.6, p. 4377-4383, 2012.
- MACLEAN, A. M.; HOGENHOUT, S. A. Phytoplasmas and Spiroplasmas: The phytopathogenic mollicutes of the phloem. In: THOMPSON, G. A.; VAN BEL, A. J. E. Phloem: Molecular Cell Biology, Systemic Communication, Biotic Interactions. 2012. Disponível em: 10.1002/9781118382806.ch14. Acesso em: junho de 2023.
- MASCARIN, G. M. et al. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.127, p.11-20, 2015.
- MASCARIN, G. M. et al. Nitrogen sources affect productivity, desiccation tolerance and storage stability of *Beauveria bassiana* blastospores. *Journal of Applied Microbiology*, v. 124, p. 810-820, 2018.
- MASCARIN, G. M. et al. Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.30, p.1583-1590, 2014.
- MASCARIN, G. M. et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 165, p. 46-53, 2019.
- MASCARIN, M. G.; JARONSKI, T. S. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 32, p. 1-26, 2016.

- MATSUMOTO, K. S. Fungal chitinases. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, p. 289-304, 2006.
- MENDES, L. O. T. Observações sobre alguns insetos coletados sobre algodoeiro durante os anos de 1936 e 1937. *Jornal de Agronomia*, v. 1, n. 2, p. 149-163, 1938.
- MENDES, L. W. et al. Influence of resistance breeding in common bean on rhizosphere microbiome composition and function. *The ISME Journal*, v. 12, p. 212-224, 2018.
- MENDONSA, E. S. et al. An enzyme from *Myrothecium verrucaria* that degrades insect cuticles for biocontrol of *Aedes Aegypti* mosquito. *Biotechnology Letters*, v. 18, p.373-376, 1996.
- MEYER, M. C. et al. Bioinsumos na cultura da soja. Brasília-DF: Embrapa Soja, 2022. Disponível em: <file:///C:/Users/User/Downloads/Bioinsumos-na-cultura-da-soja.pdf>. Acesso em: junho de 2023.
- MONNERAT, R. et al. Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/213246/1/documentos-36916.pdf>>. Acesso em: junho de 2023.
- MORA, M. A. E.; CASTILHO, A. M. C.; FRAGA, M. E. Classification and infectio mechanism of entomopathogenic fungi. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 84, p. 1-10, 2017.
- OLIVEIRA, C. M.; FRIZZAS, M. R. Eight decades of *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera, Cicadellidae) in Brazil: what we know and what we need to know. *Neotropical Entomology*, v. 51, p. 1-17, 2022.
- OLIVEIRA, C. M.; FRIZZAS, M. R.; OLIVEIRA, E. Overwintering plants for *Dalbulus maidis* (DeLong and Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) adults during the maize off-season in central Brazil. *International Journal of Tropical Insect Science*, v. 40, n. 4, p. 1105-1111, 2020.
- OLIVEIRA, C. M. et al. Genetic diversity in populations of *Dalbulus maidis* (DeLong and Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) from distant localities in Brazil assessed by RAPD-PCR markers. *Environmental Entomology*, v. 36, n. 1, p. 204-212, 2007.
- OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R. S.; NAULT, L. R. Survival Strategies of *Dalbulus maidis* during maize off-season in Brazil. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 147, n. 2, p. 141-153, 2013.
- ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects*, v. 4, n. 3, p. 57-74, 2013.
- ÖZBEK, E. et al. Infection and replication sites of *Spiroplasma kunkelii* (Class: Mollicutes) in midgut and Malpighian tubules of the leafhopper *Dalbulus maidis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 82, n. 3, p. 167-175, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state

- fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1153-1169, 2000.
- PARRA, J. R. P. Controle biológico na agricultura brasileira. *Entomological Communications*, v. 1, p. 2675-1305, 2019.
- PEREIRA, J. L. et al. Novel insights in the use of hydrolytic enzymes secreted by fungi with biotechnological potential. *Letters in Applied Microbiology*, v. 44, p. 573-581, 2007.
- PÉREZ-LÓPEZ, E. et al. Maize bushy stunt phytoplasma affects native corn at high elevations in Southeast Mexico. *European Journal of Plant Pathology*, v. 145, p. 963-971, 2016.
- PÉREZ-LÓPEZ, E. et al. Maize bushy stunt in native corn: implications for Mexican “subsistence farmers”. *Environment, Development and Sustainability*, v. 20, p. 1797-1805, 2018.
- POITEVIN, C. G. Seleção de fungos entomopatogênicos e métodos de produção de esporos e metabólitos secundários no controle biológico de *Duponchelia fovealis* ZELLER (Lepidoptera: Crambidae). 2019. 88 f. Tese (Doutorado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.
- PRAKASH, G. V. S. B.; PADMAJA, V.; KIRAN, R. R. S. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 1530-1537, 2008.
- ROBL, D. et al. Spore production in *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson strains on agro-industrial residues. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40, p. 296-300, 2009.
- ROJAS, V. M. A. Caracterização do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* quanto à produção de conídios, efeitos da radiação ultravioleta-B, temperatura alta e persistência em formulações do tipo dispersão oleosa. 2015. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2015.
- SABATO, E. O. Enfezamentos do milho. In: Doenças em milho: insetos vetores, mollicutes e vírus. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 1ª Ed., p. 11-24, 2017.
- SABATO, E. O.; KARAM, D.; OLIVEIRA, C. M. Sobrevivência da cigarrinha *Dalbulus maidis* (Hemiptera Cicadellidae) em espécies de plantas da família Poaceae. Sete Lagoas: Embrapa Milho, 2018. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/191252/1/bol-175.pdf>>. Acesso em: junho de 2023.
- SANDEEP, A. et al. Field efficacy of *Isaria fumosorosea* alone and in combination with insecticides against *Aleurodicus rugioperculatus* on coconut. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, v. 32, n. 106, 2022.
- SANSINENEA, E. Applications and patents of *Bacillus* spp. in Agriculture. In: SINGH, H.; KESWANI, C.; SINGH, S. Intellectual property issues in microbiology.

- Singapore: Springer, p. 133-146, 2019.
- JUNIOR SANTANA, P. A. et al. Assessing the impact of climate change on the worldwide distribution of *Dalbulus maidis* (DeLong) using MaxEnt. *Pest Management Science*, v. 75, n. 10, p. 2706-2715, 2019.
- SANTOS, P. S. Adaptações no sistema de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales). 2017. 77 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.
- SCHÜNEMANN, R.; KNAAK, N., FIUZA, L. M. Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. *International Scholarly Research Notices*, v. 2014, p. 1-12, 2014.
- SILVA, J. N. et al. New cost-effective bioconversion process of palm kernel cake into bioinsecticides based on *Beauveria bassiana* and *Isaria javanica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 102, n. 6, p. 2595-2606, 2018.
- THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 81, p. 146-161, 2013.
- TSAI, J. H. Corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong and Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae). In: CAPINERA, J. L. *Encyclopedia of entomology*. Springer, Dordrecht, 2008.
- VAN NIEUWENHOVE, G. A.; FRÍAS, E. A.; VIRLA, E. G. Effects of temperature on the development, performance and fitness of the corn leafhopper *Dalbulus maidis* (DeLong) (Hemiptera: Cicadellidae): implications on its distribution under climate change. *Agricultural and Forest Entomology*, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2015.
- VICINI, G. et al. Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. *Process Biochemistry*, v.42, p.275-278, 2007.
- VIRLA, E. G.; MOYA-RAYGOZA, G.; LUFT-ALBARRACIN, E. Egg parasitoids of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis*, in the southernmost area of its distribution range. *Journal of Insect Science*, v. 13, n. 10, p. 1-7, 2013.
- WEINTRAUB, P. G.; BEANLAND, L. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, v. 51, p. 91-111, 2006.
- ZHANG, Z. et al. Infection of the Western Flower Thrips, *Frankliniella occidentalis*, by the Insect Pathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *Agronomy*, v. 11, p. 1910, 2021.