

[Trabalhos apresentados...]  
1996 PC-PP-1996.00326



CNPMA-11864-1

# Workshop

## Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas

---

---

### DIVERSIDADE MICROBIANA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

Diversidade Microbiana e Agricultura Sustentável

**Heitor L. C. Coutinho**  
CNPMA/EMBRAPA

0326  
1996  
PC-PP-1996.00326

---

---

Campinas, 29 de abril a 01 de maio de 1996

## **Workshop: Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas**

Campinas, 29 de abril a 01 de maio de 1996

### **Local:**

Novotel Campinas Norte. Estrada Municipal, 931 - Nova Aparecida  
13111-900 Campinas/SP. Fone: (019) 240-1166 Fax: (019) 240-1167

### **Apoio:**

Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Financiadora de Estudos e Projetos (PADCT/FINEP) Sub-Programa Biotecnologia Edital SBIO 02/94-3

### **Organização:**

Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello" (FTPTAT)

### **Colaboração:**

Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia/ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CENARGEN/EMBRAPA)

Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP)

**DIVERSIDADE MICROBIANA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL****Diversidade Microbiana e Agricultura Sustentável****Heitor L. C. Coutinho**

CNPMA/EMBRAPA

Rod. SP-340 Km 127 Bairro Tanquinho Velho

CP: 69 CEP: 13820-000 Jaguariúna/SP

Fone: (019) 867-5633 (r 2056)

Fax: (019) 867 - 5225

E mail: heitor@bdt.org.br

**ÍNDICE**

1. Introdução Geral.....	1
2. Microrganismos Fixadores de Nitrogênio.....	2
2.1. Bactérias Diazotróficas Simbióticas.....	4
2.2. Bactérias Diazotróficas Associativas.....	5
3. Agentes Microbianos para o Controle de Doenças e Pragas na Agricultura.....	6
3.1 Introdução.....	6
3.2. Agentes Microbianos para o Controle de Pragas na Agricultura.....	7
3.3. Agentes Microbianos para o Controle de Doenças das Plantas Cultivadas.....	12
3.4. Diversidade Microbiana e Controle Biológico.....	14
4. Referências Bibliográficas.....	15



## 1. Introdução Geral

Os sistemas de produção agrícola no Brasil, tal qual na maioria dos sistemas econômicos embasados no desenvolvimentismo capitalista, são caracterizados pela maximização da produção por unidade de área plantada (produtividade). Este paradigma da agricultura moderna aliada aos avanços tecnológicos deste século levaram ao que se costuma chamar de "Revolução Verde". Sistemas agrícolas anteriormente de baixa produtividade foram substituídos nos anos 60/70 por sistemas de alta produtividade e dependentes de insumos químicos, notadamente pesticidas e fertilizantes. A modernização da agricultura impulsionou o desenvolvimento de nações eminentemente agrícolas como o Brasil, capitalizando e modernizando a zona rural e aumentando a receita proveniente das exportações. Todavia, a preocupação meramente econômica dos novos modelos de produção desconsiderou os efeitos e consequências das novas práticas agrícolas no ambiente natural.

Ainda hoje, muitos economistas avaliam a performance do sistema agrícola brasileiro por meio de indicadores parciais quantitativos, como, por exemplo, a quantidade de pesticidas e fertilizantes aplicados em um ano. Esta visão equivocada do processo agrícola, aliada à eficiente tática de marketing da indústria de pesticidas, em sua maioria multinacionais na época descompromissadas com a conservação de nossos recursos naturais, levou o Brasil à condição de quinto maior aplicador de pesticidas do mundo. Como consequência podemos citar a crescente resistência de pragas e ervas daninhas aos pesticidas, aumentando a dependência de insumos químicos por parte dos produtores, e impulsionando a indústria à descoberta e formulação de novos princípios ativos, formando um ciclo vicioso de alto custo econômico e ambiental.

Este modelo de desenvolvimento agrícola tem como possíveis consequências a contaminação e degradação de solos e águas, desertificação, salinização, redução da biodiversidade, e desequilíbrios ecológicos, levando por fim à insustentabilidade dos sistemas de produção agrícola.

A comunidade científica internacional, em grande parte responsável pelo desenvolvimento tecnológico gerador dos atuais problemas ambientais, foi obrigada a rever os seus conceitos, o que levou a uma mudança dos paradigmas norteadores da pesquisa agropecuária. O conceito de sustentabilidade, com suas várias interpretações, está hoje bem arraigado tornando-se prioridade das políticas de pesquisa agropecuária de praticamente todo o mundo. No Brasil, o Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SINPA) é coordenado pela EMBRAPA, integrando seus centros de pesquisa com Instituições regionais. Em todos seus Programas de Pesquisa o conceito de sustentabilidade e qualidade ambiental está presente, com destaque para o Programa de Qualidade Ambiental, coordenado atualmente pelo Centro Nacional de Pesquisas de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (CNPMA), em Jaguariúna (SP).

Considera-se como agricultura sustentável aquela baseada na utilização racional dos recursos naturais visando o atendimento das necessidades das gerações presentes e futuras (setor agropecuário e florestal). Em termos práticos pretende-se que diminua a dependência que os sistemas de produção agrícola têm com respeito aos insumos químicos, aumentando a importância dos processos biológicos na ciclagem de nutrientes e no controle biológico de pragas e doenças de plantas e animais domésticos. Estes processos são em sua maioria mediados e dependentes da ação microbiana em solos, águas e até em tecidos das plantas e animais. Daí a grande importância do estudo da diversidade microbiana tanto nos ecossistemas "naturais" (na ausência do distúrbio pelo homem) como nos agroecossistemas.

A atividade agrícola sempre leva a uma redução da biodiversidade, a começar pela transição de terra nativa, com muitas espécies de plantas e animais em equilíbrio ecológico, para terra agrícola, onde predominam menos espécies e em desequilíbrio. Agroecossistemas necessitam de insumo energético para sua manutenção. Muito provavelmente ocorre também uma redução na biodiversidade nos solos, resultante da perda de espécies vegetais cujas raízes representam fonte de energia para microrganismos específicos da rizosfera que, por sua vez, seriam decompostos por outros organismos, formando a cadeia trófica. Esta perda de diversidade pode ser bastante acentuada em sistemas de monocultura com uso intenso de pesticidas, principalmente inseticidas de solo (nematicidas) e fungicidas. Processos vitais como a decomposição de matéria orgânica e as ciclagens de nitrogênio, fósforo e potássio, entre outras, podem sofrer um impacto muito elevado, levando à maior dependência por fertilizantes.

A perda da diversidade microbiana causada pelas atividades agrícolas pode resultar na extinção de espécies potencialmente úteis para a indústria, medicina, e para a própria agricultura. Daí a grande importância de estudarmos a diversidade microbiana de nossos ecossistemas em seu estado "natural", antes da ocupação humana. Estes microrganismos devem ser caracterizados, preservados em Coleções de Cultura especializadas e "screened" para possíveis usos tecnológicos. Esforços neste sentido feitos por grupos de pesquisa como o da Coleção de Culturas Tropical, na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, vêm resultando na descrição de um grande número de novas espécies de fungos, bactérias e leveduras isolados da Amazônia, Mata

Atlântica, Cerrados, etc. Este esforço deve ser ampliado e integrado, tornando as informações disponíveis em forma de bases de dados interligadas. A estrutura da rede de comunicação brasileira torna possível esta integração de dados através da Internet e de suas ferramentas.

Os agroecossistemas também devem ser palco de esforços de pesquisa no sentido de avaliar qual o impacto das diferentes práticas agrícolas na diversidade microbiana, particularmente das comunidades de microrganismos envolvidos em processos vitais, como a fixação de nitrogênio, degradação de compostos lignocelulolíticos, e solubilização de fosfatos. Práticas de menor impacto na biodiversidade oferecem um maior grau de sustentabilidade aos sistemas de produção agrícola.

Neste texto procuraremos fazer uma revisão crítica dos principais avanços no estudo da diversidade microbiana e sua aplicação tecnológica na agricultura brasileira, visando melhorar a qualidade dos nossos produtos. Na era de padrões de qualidade ambiental como a ISO14000, os chamados 'selos verdes' vão conferir maior valor agregado aos produtos agrícolas derivados de sistemas de produção sustentáveis.

## 2. Microrganismos Fixadores de Nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) talvez seja o processo microbiano relacionado à agricultura mais bem estudado e explorado tecnologicamente. A inoculação de sementes de leguminosas com bactérias diazotróficas é prática comum em vários países. No Brasil, a inoculação da soja com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* ou *B. elkanii* propicia uma economia da ordem de US\$1,3 bilhão anuais em fertilizantes nitrogenados (Siqueira e Franco, 1988). Além dos benefícios econômicos, a redução nas aplicações destes fertilizantes leva a uma melhoria da qualidade ambiental, com menor aporte de nitratos para as águas superficiais e subterrâneas. A maximização das contribuições da FBN nos agroecossistemas tornou-se, então, parte dos esforços de pesquisa visando a sustentabilidade das produções agrícolas.

A FBN é mediada por uma ampla gama de microrganismos procarióticos, incluindo cianobactérias e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os genes responsáveis pela produção do aparato enzimático que reduz o nitrogênio atmosférico a amônio (genes *nif*) têm sequências conservadas (F. Pedrosa, info.pess.). A observação de uma árvore filogenética contendo espécies procarióticas mostra que os microrganismos diazotróficos ocorrem em um grande número de taxa, sua distribuição não obedecendo a nenhum padrão lógico (G. Olsen, info.pess.). Conclui-se que a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico é um caráter bastante antigo, provavelmente presentes nos primeiros seres vivos. Na tabela 1 relacionam-se algumas das espécies conhecidas de microrganismos diazotróficos, sendo algumas delas sabidamente relevantes para a agricultura.

**Tabela 1.** Microrganismos capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio.

Gênero	Espécie	Subespécie	Relação com o hospedeiro	Referência
<i>Azotobacter</i>	<i>paspali</i>		Associação	Döbereiner, 1966
<i>Azospirillum</i>	<i>lipoferum</i>		Associação	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
	<i>brasiliense</i>		Associação	idem
	<i>amazonense</i>		Associação	Magalhães <i>et al.</i> , IJSB, 34:355-357, 1984
	<i>halopraeferans</i>		Associação	Reinhold <i>et al.</i> , 1987
	<i>irakense</i>		Associação	Khammas <i>et al.</i> , IJSB, 41:580-581, 1991
<i>Nostoc</i>	<i>verrucosum</i>		Cianobact.	
	<i>muscorum</i>		Cianobact.	
<i>Anabaena</i>	<i>variabilis</i>		Cianobact.	J. Bact. 136:682-687, 1978 <sup>1</sup>
	<i>flos-aquae</i>		Cianobact.	Brebisson, Am.J.Bot. 37:216-218, 1950 <sup>2</sup>
<i>Calothrix</i>			Cianobact.	J.Gen.Microbiol. 111:47, 1979 <sup>3</sup>
<i>Plectonema</i>	<i>boryanum</i>		Cianobact.	
<i>Cylindrospermum</i>			Cianobact.	J.Gen.Microbiol. 111:41, 1979
<i>Synechococcus</i>			Cianobact.	
<i>Acetobacter</i>	<i>diazotrophicus</i>		Endofítico	Gillis <i>et al.</i> , 1989
<i>Herbaspirillum</i>	<i>seropedicae</i>		Endofítico	Baldani <i>et al.</i> , 1986
	<i>rubrisobalbicans</i>		Endofítico	Döbereiner <i>et al.</i> , NHNF <sup>4</sup> , 671-676, 1993
<i>Azoarcus</i>	<i>communis</i>		Endofítico	Reinhold-Hurek <i>et al.</i> , 1993
	<i>indigenis</i>		Endofítico	idem
<i>Frankia</i>			Simbiose	Baker e Torrey, 1980
<i>Rhizobium</i>	<i>leguminosarum</i>	<i>bv. viciae</i>	Simbiose	Frank, 1889
		<i>bv. phaseoli</i>	Simbiose	idem
		<i>bv. trifolii</i>	Simbiose	idem
	<i>loti</i>		Simbiose	Jarvis <i>et al.</i> , 1982
	<i>tropici</i>		Simbiose	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
	<i>etli</i>		Simbiose	Segovia <i>et al.</i> , 1993
<i>Rhizobium</i>	<i>huakuii</i>		Simbiose	Chen <i>et al.</i> , 1991
	<i>ciceri</i>		Simbiose	Nour <i>et al.</i> , 1994
	<i>galegae</i>		Simbiose	Lindstrom, 1989
	<i>lupini</i>		Simbiose	Eckhardt <i>et al.</i> , 1931
	<i>tianshanense</i>		Simbiose	Chen <i>et al.</i> , 1995
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>		Simbiose	Jordan, 1982
	<i>elkanii</i>		Simbiose	Kuykendall <i>et al.</i> , 1992
	<i>liaoningense</i>		Simbiose	Xu <i>et al.</i> , 1995
<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>		Simbiose	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
<i>Sinorhizobium</i>	<i>fredii</i>		Simbiose	Chen <i>et al.</i> , 1988
	<i>melliloti</i>		Simbiose	De Lajudie <i>et al.</i> , 1994
	<i>saheli</i>		Simbiose	idem
	<i>teranga</i>		Simbiose	idem
<i>Azotobacter</i>	<i>vinelandii</i>		Vida livre	Lipman, 1903
	<i>chroococum</i>		Vida livre	Beijerinck, 1901
	<i>beijerinckii</i>		Vida livre	Lipman, 1904
<i>Beijerinckia</i>	<i>derxii</i>		Vida livre	Tchan, 1957
	<i>fluminensis</i>		Vida livre	Döbereiner e Ruschel, 1958
	<i>indica</i>	<i>lacticoogenes</i>	Vida livre	Thompson and Skerman, 1979
	<i>mobilis</i>		Vida livre	Derx, 1950.
<i>Derxia</i>	<i>gummosa</i>		Vida livre	Jensen <i>et al.</i> , 1960
<i>Paenibacillus</i>	<i>azotofixans</i>		Vida livre	(Seldin <i>et al.</i> , 1984) Ash <i>et al.</i> , 1993
<i>Streptomyces</i>			Vida livre	
<i>Pseudomonas</i>			Associação	Haahela <i>et al.</i> , 1983
<i>Xanthobacter</i>	<i>agilis</i>		Vida livre	Jenni e Aragno, 1987
<i>Campylobacter</i>	<i>nitrofigilis</i>		Associação	McClung <i>et al.</i> , 1983

<sup>1</sup> Journal of Bacteriology

<sup>2</sup> American Journal of Botany

<sup>3</sup> Journal of General Microbiology

<sup>4</sup> New Horizons in Nitrogen Fixation (R. Palacios *et al.*, eds.)

## 2.1. Bactérias Diazotróficas Simbióticas

Taxonomia. Bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, e *Azorhizobium*, coletivamente denominados de rizóbios, possuem genes (*nod*) que as possibilitam infectar pelos radiculares de espécies de leguminosas que por sua vez as abrigam em estruturas especiais chamadas nódulos. Esta associação planta - bactéria é tida como simbiótica, uma vez que o nitrogênio fixado pelos microrganismos é assimilado pelas plantas, enquanto estas fornecem esqueletos de carbono para o simbiote. Esta simbiose pode ser altamente específica, de parte de ambos os simbioses.

Os rizóbios eram classificados de acordo com as espécies de leguminosas com as quais fossem capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio. Portanto, *Rhizobium phaseoli* nodulava o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), *R. japonicum* a soja (*Glycine max* L.), *R. meliloti* a alfafa (*Medicago sativa*), *R. viciae* o feijão fava (*Vicia faba*) e *R. trifolii* o trevo (*Trifolium repens*).

A taxonomia rizobiana revolucionou-se com o advento de metodologias avançadas (sistemática molecular e quimiotaxonomia, por ex.) para a caracterização de microrganismos. Como primeira consequência o gênero *Bradyrhizobium* foi descrito (Jordan, 1982), incluindo como espécie-tipo *B. japonicum*. *Bradyrhizobium* se diferencia de *Rhizobium* pelo crescimento mais lento e alcalinização do meio de cultura, além da ausência do plasmídeo simbiótico (genes *nif* e *nod*), característico de *Rhizobium*. Em *Bradyrhizobium*, os genes simbióticos localizam-se no cromossoma.

Estudos da diversidade de *Bradyrhizobium* isolados de nódulos de soja, apontavam para a existência de dois grupos distintos, definidos de acordo com uma série de características, entre as quais o perfil de hibridização de genes *nod* (RFLP), conteúdo G+C% e homologia DNA:DNA (Stanley *et al.*, 1985; Minamisawa *et al.*, 1992). Tal discrepância levou à descrição de uma nova espécie neste gênero, *B. elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992).

As evidências de que a diversidade dos rizóbios era maior do que se pensava foram se acumulando. A diversidade de rizóbios de feijão é tão grande que nos últimos 4 anos a espécie (*R. phaseoli*) foi desmembrada em três (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. etli*, e *R. tropici*; ver tabela 1). No Brasil, a caracterização de rizóbios isolados de nódulos de feijão cultivados em campos de Goiás e Bahia indica uma grande diversidade, com possíveis novas espécies a serem descritas no futuro próximo (Avílio A. Franco, info. pessoal).

O gênero *Sinorhizobium* foi descrito recentemente (Chen *et al.*, 1988), incluindo nele o antigo *R. meliloti* (De Lajudie *et al.*, 1994). A razão de ser deste novo gênero é fortemente baseada em estudos filogenéticos, principalmente em análises de seqüências de rRNA 16S. A nova classificação dos microrganismos é fortemente baseada em suas relações filogenéticas (Woese, 1994). Alterações taxonômicas baseadas apenas (ou em grande parte) em seqüências ribossômicas são motivo de divergências entre taxonomistas. Com efeito, as classificações devem ser baseadas não apenas em características moleculares, mas também fisiológicas, e, no caso de rizóbios, simbióticas. É o que chamamos de classificação polifásica.

Potencial da Diversidade. Várias espécies novas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Sinorhizobium* vêm sendo descritas nos últimos anos (ver tabela 1), refletindo o número crescente de grupos de pesquisa envolvidos em estudos da diversidade de rizóbios, o avanço tecnológico que permite a detecção de características discriminantes entre as espécies, e, mais importante, a grande diversidade destes microrganismos. A maior parte das novas espécies de rizóbios foi isolada de regiões tropicais, realçando a importância dos trópicos com relação à biodiversidade. Se considerarmos os sistemas de agricultura sustentável como pré-requisito para a melhoria de qualidade de vida a curto, médio e longo prazos nos países tropicais, e a importância da fixação biológica de nitrogênio para a sustentabilidade dos agroecossistemas, percebe-se a grande relevância e potencial benefício do entendimento e exploração racional da diversidade de rizóbios.

A exploração efetiva da fixação biológica de nitrogênio em sistemas de agricultura sustentável envolve o uso de leguminosas com diversas finalidades. Sistemas agrofloretais consorciam leguminosas arbóreas para fornecimento de lenha, forragem e sombreamento com culturas anuais como o milho e sorgo. Leguminosas arbóreas também podem ser usadas como barreira ao vento e como cerca viva com grande eficiência e baixo custo. Em sistemas de rotação de culturas, já amplamente difundidos no Brasil, gramíneas como milho, trigo ou cana-de-açúcar são sucedidas por leguminosas como soja, feijão ou amendoim para fertilizar o solo com o nitrogênio fixado além de gerar renda com a comercialização dos grãos. Leguminosas também podem ser usadas como adubo verde, onde o nitrogênio fixado e translocado para as folhas retorna aos solos através da decomposição dos restos vegetais e mineralização do N-orgânico.

Além das espécies tradicionais de leguminosas reconhecidamente lucrativas para a agricultura, outras podem vir a ser economicamente atrativas no futuro. Em todas estas situações, para que os sistemas se beneficiem o máximo possível da fixação biológica de nitrogênio, estirpes de rizóbio com a maior eficiência simbiótica (nodulação e fixação de nitrogênio), competitividade por sítios de nodulação e adaptabilidade às



condições ambientais da região de produção devem estar presentes no solo. Caso contrário, elas podem ser introduzidas na forma de inoculantes.

Projetos de seleção de estirpes para inocular diversas leguminosas com diferentes finalidades agrônomicas necessitam de matéria-prima. Esta vem a ser a vasta diversidade dos rizóbios tropicais. Este potencial não pode ser menosprezado. As estirpes isoladas de nossos solos já são naturalmente adaptadas às nossas condições. Elas devem ser caracterizadas tanto a nível microbiológico quanto agrônômico e preservados em bancos de linhagens, que são as Coleções de Cultura.

Inoculantes. O sucesso de inoculações depende de uma série de fatores ambientais assim como os relacionados à fabricação dos inoculantes.

Os fatores de ordem ambiental devem ser analisados por critérios científicos. A começar pelas estirpes selecionadas para compor o inoculante. Estas devem ser previamente testadas quanto à sua eficiência simbiótica, competitividade e sobrevivência nos solos onde serão inoculadas. Uma estirpe pouco competitiva terá pouca chance de sucesso, com outras linhagens do solo dominando a nodulação. Por outro lado, deve-se assegurar os benefícios agrônômicos de uma estirpe de alta competitividade e capacidade saprofítica antes de introduzi-la ao solo. Em alguns estados dos EUA estirpes introduzidas pertencentes ao serogrupo USDA123, predominam nos nódulos de soja formados. Em razão disso, inoculações com estirpes de maior eficiência em fixação de nitrogênio são infrutíferas (Kramicker and Brill, 1986).

Em alguns casos a inoculação frequente de rizóbios não é viável, como em leguminosas perenes ou quando há necessidade de revestimento das sementes com produtos tóxicos ao rizóbio. Nestes casos a capacidade saprofítica e conseqüente persistência dos rizóbios no solo é extremamente importante (Howieson, 1995).

No Brasil, a decisão sobre quais estirpes devem compor os inoculantes para as leguminosas consideradas mais importantes (soja e feijão) cabe à RELARE. A recomendação tem abrangência nacional, ou seja, as mesmas estirpes inoculadas no Rio Grande do Sul são utilizadas em Goiás. Devido à heterogeneidade dos biomas brasileiros, é natural imaginar que a recomendação de estirpes deva ser feita a nível regional. Este é um assunto que necessita de amplo debate entre a comunidade científica nacional e espera-se que este documento contribua para isto.

O sucesso de uma inoculação depende também de como ele é fabricado, estocado e distribuído. São necessários padrões de qualidade, estabelecendo um número mínimo de células da estirpe recomendada por grama ou mililitro de material carreador, e padrões de pureza, minimizando as contaminações.

O material carreador mais utilizado nos inoculantes brasileiros é a turfa, que deveria ser previamente esterilizada por radiação gama (5 Mrads). A maioria dos fabricantes utiliza turfa sem esterilização, com aumento de contaminação e perda de qualidade do produto e conseqüente diminuição da probabilidade de sucesso da inoculação (Siqueira e Franco, 1988).

A nível internacional a preocupação com a qualidade dos inoculantes produzidos é grande, com um aumento nas restrições quanto à permissividade de células contaminantes e número mínimo de rizóbios (Olsen *et al.*, 1994). A pesquisa científica deve indicar estes padrões aos órgãos fiscalizadores.

## 2.2. Bactérias Diazotróficas Associativas

Histórico. As associações entre plantas e bactérias envolvem interações em que ao menos uma das partes se beneficia. A fixação de nitrogênio já foi verificada em diversas espécies isoladas de raízes e caules de gramíneas (milho, cana-de-açúcar, arroz, etc.), da superfície de raízes (rizoplano) e da rizosfera. Os avanços no estudo da diversidade das bactérias diazotróficas associativas devem-se em grande parte ao brilhante trabalho desenvolvido pelos pesquisadores da EMBRAPA-CNPAB, sob o comando da Dra. Johanna Döbereiner. Espécies dos gêneros *Beijerinckia* e *Azotobacter* foram descritas nos anos 60, sendo demonstrada sua ocorrência em rizosferas de cana-de-açúcar e *Paspalum notatum* cv batatais, respectivamente (Döbereiner, 1959 e 1966). Esta última apresenta um alto grau de especificidade, já que a espécie *Azotobacter paspali* não foi encontrada na rizosfera de nenhuma outra planta (Döbereiner, 1970).

Nos últimos anos novas espécies de bactérias diazotróficas associativas foram descritas. O gênero *Azospirillum* (Tarrand *et al.*, 1978) ocorre em grandes números nos nossos solos, já tendo sido encontrado em todos os continentes tropicais. As quatro espécies descritas (*A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense* e *A. halopraeferans*, ver tabela 1) ocorrem em maior número nas rizosferas de gramíneas e cereais do que em outras plantas (Döbereiner, 1992). Mais recentemente uma espécie de *Bacillus* foi descrita que ocorre em associação com diversas gramíneas e cereais, o *B. azotofixans* (Seldin *et al.*, 1984) recentemente realocado a um novo gênero, o *Paenibacillus* (Ash *et al.*, 1995).

As bactérias diazotróficas descritas mais recentemente foram isoladas de raízes de milho, sorgo, trigo e cana-de-açúcar. Algumas delas não foram encontradas em solos o que nos leva a considerá-las endofíticas. Dentre estas destacamos duas espécies (*Herbaspirillum seropedicae* e *Acetobacter diazotrophicus*, ver tabela 1). A *A. diazotrophicus* é apenas encontrada em colmos de cana-de-açúcar e é capaz de crescer em meio de cultura contendo altas concentrações de açúcar (10%), demonstrando alta especificidade e adaptação ao ambiente endofítico (Döbereiner, 1992). Mais recentemente uma espécie ainda não descrita, pertencente ao gênero *Burkholderia*, foi isolada de diversas espécies de plantas e com alta capacidade de fixação de nitrogênio (J. Döbereiner, info. pessoal).

Contribuição para Sustentabilidade. Estudos com nitrogênio marcado ( $^{15}\text{N}$ ) evidenciaram a fixação biológica de nitrogênio em gramíneas (De-Polli *et al.*, 1977), sendo estas bastante expressivas em algumas cultivares de cana-de-açúcar, com até 60% do nitrogênio incorporado oriundos da fixação biológica (Lima *et al.*, 1987). Fica evidente que a fixação biológica de nitrogênio é um processo passível de exploração tecnológica em gramíneas. Inoculações com *Azospirillum* acarretaram em aumentos de até 30% na produção de cereais em Israel (Okon, 1985). Todavia, alguns autores atribuem o aumento da produção à efeitos hormonais do *Azospirillum* aumentando a superfície radicular e, conseqüentemente, maior aproveitamento do nitrogênio disponível no solo (Kapulnik *et al.*, 1981). As vias metabólicas de produção de ácido indol-acético (AIA) em *Azospirillum* foram estudadas e sua produção *in vivo* demonstrada por Costacurta (1994). Sendo dois processos benéficos para a produção agrícola, multiplica-se a potencial contribuição destas bactérias para a sustentabilidade das produções agrícolas.

Esta multiplicidade de efeitos benéficos também vem sendo estudada com relação ao *P. azotofixans*, com resultados preliminares indicando seu potencial para produção de hormônios de crescimento e antagonismo a alguns fitopatógenos, além da já conhecida capacidade de fixação de nitrogênio (A.S. Rosado, info. pessoal).

### 3. Agentes Microbianos para o Controle de Doenças e Pragas na Agricultura

#### 3.1. Introdução

A agricultura moderna é caracterizada por um alto uso de insumos químicos, cuja vasta maioria tem a finalidade de garantir o que se chama de “sanidade” dos produtos agrícolas. Esta é ameaçada pelo que se convencionou chamar de “pragas”, assim como doenças causadas por microrganismos que, neste caso, passam a ser denominados de “fitopatógenos”. As “pragas” nada mais são do que insetos que, na ausência de inimigos naturais e na abundância de alimento, representado pela cultura agrícola hospedeira, proliferam, causando prejuízo econômico ao produtor. Isto é uma clara consequência do desequilíbrio ecológico causado pela transformação do ambiente natural em ambiente agrícola. Raciocínio análogo pode ser desenvolvido com relação a ocorrência de doenças nas plantas cultivadas. Parasitismo de plantas por microrganismos é um fenômeno comum nas matas tropicais, sendo parte das interações biológicas normais de um ecossistema, não sendo considerado um “problema” que demande a intervenção “reparadora” humana. Nos agroecossistemas, a presença de esporos de um potencial parasita no solo passa a ser considerado um “inóculo” que necessita de controle, sob pena de multiplicação desenfreada do parasita e danos econômicos significativos na cultura agrícola. Aqui novamente vemos uma consequência do desequilíbrio ecológico dos ambientes agrícolas.

O desenvolvimento tecnológico ocorrido neste século, principalmente da indústria química, resultou na formulação de produtos para o controle das pragas e doenças mais frequentes e danosas para a agricultura. Os inseticidas, fungicidas, bactericidas e nematicidas passaram a ser aplicados em larga escala em todo o mundo desenvolvido e nas propriedades agrícolas de países em desenvolvimento que dispunham de capital suficiente para a tecnificação da produção. O uso desenfreado destes agrotóxicos causou danos ambientais consideráveis. O exemplo mais típico foi a quase extinção das águias norte-americanas. Estudos revelaram a alta dose de DDT nos tecidos de águias mortas. Este fato chocou a opinião pública dos EUA e levou o governo norte-americano a elaborar medidas visando a avaliação de prováveis impactos ambientais dos agrotóxicos.

Os altos custos ambientais e econômicos derivados do uso de agrotóxicos na agricultura resultou num maior esforço de pesquisa direcionada ao desenvolvimento de sistemas de controle de pragas e doenças através de agentes biológicos. As vantagens mais propaladas da adoção de controle biológico pelos agricultores são um impacto ambiental menor e maior segurança ao homem, tanto para aquele que aplica os produtos quanto para o consumidor dos alimentos tratados. Sem falar nos sistemas de produção dos biopesticidas, menos poluentes que as indústrias químicas dos agrotóxicos. Outra vantagem dos agentes de controle biológico são sua maior seletividade, quando comparados com os agrotóxicos. Na sua maioria, as cepas e estirpes de fungos e bactérias usados para o controle biológico são específicos para determinada praga ou fitopatógeno, assim como para

ambientes específicos, o que muitas vezes é considerado como a causa da baixa atratividade comercial destes produtos pela indústria, que teria que desenvolver linhas de produção diferenciadas para diferentes ambientes, culturas, e doenças ou pragas-alvo (Cook, 1993). Em contraste, grande parte dos agrotóxicos, além de atingir os organismos-alvo, podem causar efeitos danosos a outros organismos, incluindo aqueles benéficos para a agricultura, como insetos-predadores, microrganismos fixadores de nitrogênio, micorrizas, decompositores da matéria orgânica, etc. Podemos considerar, portanto, que um melhor entendimento dos processos naturais de controle de organismos prejudiciais à produção agrícola, incluindo o conhecimento e preservação da diversidade dos microrganismos envolvidos nestes processos, constitui-se em um importante passo rumo à sustentabilidade da agricultura.

A seguir, faremos um levantamento do que já se conhece com relação à diversidade e aplicação dos agentes de controle biológico na agricultura, ressaltando aqueles de maior relevância para o Brasil. Finalmente, abordaremos o potencial da diversidade microbiana para o estabelecimento de sistemas eficientes de controle biológico.

### 3.2. Agentes Microbianos para o Controle de Pragas na Agricultura

À primeira vista as plantações modernas (monoculturas) são como verdadeiros paraísos para insetos, habitats ideais para a reprodução e alimentação de um amplo espectro de espécies. Todavia, muitos fatores adversos para os insetos também se fazem presentes, como clima não propício, o longo tempo de geração de algumas espécies, além de um grande número de espécies de inimigos naturais. Entre estes inimigos estão as doenças causadas por microrganismos e víruses patogênicos.

Com tantos problemas em potencial para os insetos, estes deveriam estar sempre naturalmente sob controle, sem se tornar pragas. Todavia, estes inimigos naturais e doenças muitas vezes se abatem sobre os insetos tarde demais para que sejam evitados danos econômicos ou até a morte das plantas atacadas (Burgess e Pillai, 1987).

Nestes últimos 20 a 25 anos o homem vem estudando os processos naturais de doenças de insetos, isolando e selecionando cepas eficientes dos microrganismos responsáveis, desenvolvendo sistemas de produção e formulação de inóculos e testando-os no campo. Este processo teve como resultado o desenvolvimento da tecnologia dos bioinseticidas microbianos, com alguns sucessos comerciais e aceitação entre os produtores. O controle biológico de pragas no Brasil tem um grande caminho a ser trilhado, com a biodiversidade tropical encerrando um grande número de espécies ainda desconhecidas, adaptadas às nossas condições ambientais, com potencial para uso tecnológico no controle das pragas encontradas nas culturas brasileiras. A seguir veremos os sistemas de controle biológico de insetos já desenvolvidos, com especial destaque para aqueles já em uso no Brasil. Abordaremos separadamente os agentes bacterianos e fúngicos.

#### 3.2.a. Bactérias

As bactérias entomopatogênicas de maior relevância e potencial tecnológico estudadas até o momento pertencem, em sua maioria, às famílias Enterobacteriaceae e Bacillaceae, com ainda alguns membros da ordem Pseudomonadales (Habib e Andrade, 1986). Alguns autores separam ainda as bactérias entomopatógenas em esporulantes e não esporulantes. Isto em razão da maior adequabilidade das espécies esporulantes à produção industrial e à aplicação em campo, além da menor sensibilidade dos esporos às radiações ultravioleta e condições climáticas, como calor excessivo e baixos teores de umidade. As bactérias esporulantes têm também maior persistência no campo (St. Julian *et al.*, 1973; Angus, 1974).

Dentre as bactérias esporulantes, merecem especial destaque as espécies do gênero *Bacillus*, que se caracterizam pela produção de toxinas e enzimas, causando doenças nos insetos infectados. A espécie mais estudada e utilizada no campo é *B. thuringiensis*, que apresenta patogenicidade seletiva, de acordo com a estirpe em questão (Vankova, 1964). Esta é uma espécie bastante heterogênea. As características bioquímicas e serológicas estão relacionadas à especificidade e virulência das estirpes, realçando a necessidade de maior aprofundamento nos estudos taxonômicos dos membros desta espécie. Outra característica importante é sua ampla distribuição, sendo encontrada tanto em ambientes de clima tropical assim como nas zonas temperadas, o que a classifica como espécie cosmopolita (Krywienczyk e Fast, 1980). O primeiro registro de produção comercial de *B. t.* data de 1938, para o controle de lagartas. Atualmente no Brasil são encontrados três produtos a base de *B. t.*: Dipel, Thuricide e Bactospeine (Habib e Andrade, 1991).

As principais variedades de *B. thuringiensis* são: *B. t. var. kurstaki*, *B. t. var. tenebrionis* e *B. t. var. israelensis* que causam doenças em lagartas, coleópteros e Dipteras, respectivamente (Habib e Andrade, 1986, 1991). A toxina produzida por *B. thuringiensis* mais relevante para sua efetividade no controle de pragas é

chamada de  $\delta$ -endotoxina. Esta é o componente principal dos produtos comerciais à base de *B. t.* É formada durante o processo de esporulação e formação do cristal protéico. Este não tem ação tóxica. Sua dissolução no elevado pH do trato gastrointestinal dos insetos é que causa a liberação da  $\delta$ -endotoxina. A toxicidade desta toxina depende do hospedeiro e é passível de adaptação co-evolutiva, propiciando a ocupação de novos nichos ecológicos (Burges, 1981). A incrível diversidade desta espécie, determinada por serologia e relacionada à diversidade dos hospedeiros pode ser observada na tabela 2.

**Tabela 2.** Variedades de *Bacillus thuringiensis* registradas até 1981 e as espécies de insetos dos quais foram isoladas (adaptado de Habib e Andrade, 1986).

Variedade	Hospedeiro	Origem	Referência
<i>thuringiensis</i>	<i>Anagasta kuhniella</i>	Europa	Berliner, 1911; Mattes, 1927
<i>finitimus</i>	<i>Malacosoma disstria</i>	América do Norte	Mac Name, 1956*
<i>alesti</i>	<i>Bombix mori</i>	Europa	Toumanoff e Vago, 1951; Barjac e Lemille, 1970
<i>kurstaki</i>	<i>Anagasta kuhniella</i>	Europa	Kurstak, 1964; Krywienczyk <i>et al.</i> , 1978
<i>sotto</i>	<i>Bombix mori</i>	Ásia	Ishiwata, 1902
<i>dendrolimus</i>	<i>Dendrolimus sibiricus</i>	África	Talalaev, 1956*
<i>galleriae</i>	<i>Galleria mellonella</i>	Ásia	Isakova, 1956*
<i>canadensis</i>	<i>Diparopsia</i> sp.	América do Norte	Morris, 1962*
<i>subtoxicus</i>	<i>Paralipsa gularis</i>	América do Norte	Steinhaus, 1941
<i>kurstaki, HD-1</i>	<i>Pectinophora gossypiella</i>	América do Norte	Dulmage, 1967*
<i>aizawai</i>	<i>Ephestia cautella</i>	Ásia	Aisawa, 1962*
<i>morrisoni</i>	<i>Galleria mellonella</i>	Europa	Norris, 1963*
<i>ostrinae</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i>	Ásia	Ren, 1975*
<i>toloworthi</i>	<i>Plodia interpunctella</i>	Europa	Morris, 1963*
<i>darmstadiensis</i>	<i>Galleria mellonella</i>	Europa	Krieg <i>et al.</i> *
<i>toumanoffi</i>	<i>Galleria mellonella</i>	Europa	Toumanoff, 1956*
<i>kyusshuensis</i>	<i>Bombix mori</i>	Ásia	Ohba e Aizawa, 1977*
<i>thompsoni</i>	<i>Galleria mellonella</i>	América do Norte	Thompson, 1969*
<i>pakistani</i>	<i>Cydia pomonella</i>	Ásia	Shaikh, 1975*
<i>israelensis</i>	mosquito	Oriente Médio	Goldberg e Margalit, 1977
<i>tohokuensis</i>	<i>Bombix mori</i>	Ásia	Ohba <i>et al.</i> , 1981
<i>kumamotoensis</i>	<i>Bombix mori</i>	Ásia	Ohba <i>et al.</i> , 1981
<i>tochigiensis</i>	<i>Bombix mori</i>	Ásia	Ohba <i>et al.</i> , 1981

\* - Reference not found.

Outra espécie de *Bacillus* com algum potencial para o controle de insetos é *B. cereus*, que também tem ampla distribuição geográfica e é um saprófita de solos. Causa doenças em insetos com líquido intestinal na faixa neutra de pH (6,6 - 7,4), como himenópteros desfolhadores de essências florestais, o que a difere de *B. thuringiensis*, cujas toxinas agem em níveis de pH elevados (Habib e Andrade, 1986).

*Bacillus popilliae* e *B. lentimorbus* são espécies que provocam a chamada doença leitosa tipo A e B em larvas de besouros da ordem Scarabaeidae, sendo utilizadas para o controle do escaravelho japonês *Popillia japonica*. São patógenos obrigatórios com a vantagem de ter esporos resistentes a altas temperaturas, baixos teores de umidade e radiação ultravioleta, além de apresentar alta longevidade nos corpos de larvas mortas e no solo. No Brasil têm potencial para o controle de escarabeídeos de toletes de cana (*Eutheola humilis*, *Stenocrates* spp. e *Migdolus morretesi*) (Habib e Andrade, 1986).

Dentre as bactérias não esporulantes podemos citar a *Serratia marcescens* que ocorre em larvas e pupas de *Anthonomus grandis* (bicudo do algodoeiro) (Andrade *et al.*, 1984). Apresenta o inconveniente de também ser potencialmente um patógeno ao homem. Há relatos de casos de septicemia e infecções generalizadas causadas por *S. marcescens* (Black *et al.*, 1967). Dentre as pseudomonas temos três espécies, patógenas potenciais de insetos: *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* e *P. aureofaciens*. Tal qual o exemplo anterior, a dificuldade de adoção destas espécies se dá pelo fato de que dentre elas ocorrem estirpes que são também patógenas a plantas e vertebrados.

### 3.2.b. Fungos

Espécies de fungos são responsáveis por cerca de 80% das doenças de insetos. Estima-se que os fungos entomopatogênicos estão distribuídos em mais de 700 espécies de 60 gêneros. Os considerados mais importantes para o controle biológico de pragas são: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Nomuraea*, *Aschersonia* e *Entomophthora* (Alves, 1986). Na tabela 3 podemos encontrar a classificação de alguns gêneros de fungos entomopatogênicos.

A ocorrência de doenças causadas por fungos em insetos é função da: dispersão, viabilidade, concentração de esporos e virulência do patógeno; da densidade populacional e susceptibilidade do hospedeiro ao fungo; e de fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz.

Reis (1991) enumera as vantagens e desvantagens do uso de fungos para o controle biológico de pragas na agricultura:

Vantagens	Desvantagens
1. Especificidade (seletividade)	1. Sucesso dependente das condições ambientais
2. Persistência no ambiente	2. Dificuldade para produção e armazenamento
3. Baixo impacto ambiental	3. Efeito muitas vezes a médio-longo prazo
4. Baixa toxicidade a vertebrados	
5. Não induz resistência	

**Tabela 3.** Classificação de alguns gêneros de fungos entomopatogênicos (adaptado de Alves, 1986).

Classe	Gênero
Oomycetes	<i>Lagenidium</i> <i>Pythium</i> <i>Tarichium</i> <i>Saprolegnia</i>
Chytridiomycetes	<i>Coelomomyces</i> <i>Coelomycidium</i> <i>Myiophagus</i>
Zygomycetes	<i>Entomophthora</i> <i>Myiophyton (=Empusa)</i> <i>Erynia</i>
Plectomycetes	<i>Ascospaera</i>
Pyronemycetes	<i>Cordyceps</i>
Teleomycetes	<i>Uredinella</i> <i>Septobasidium</i>
Coelomycetes	<i>Aschersonia</i>
Hyphomycetes	<i>Aspergillus</i> <i>Aegerita</i> <i>Akanthomyces</i>
	<i>Beauveria</i> <i>Tolypocladium</i> <i>Fusarium</i>
	<i>Hirsutella</i> <i>Hymenostilbe</i> <i>Muiriaria</i>
	<i>Insecticola</i> <i>Metarhizium</i> <i>Mucor</i>
	<i>Nomuraea</i> <i>Paecilomyces</i> <i>Penicillium</i>
	<i>Synnematium</i> <i>Verticillium</i>

A espécie de fungo entomopatogênico de maior relevância para o Brasil é o *Metarhizium anisopliae*, produzido em larga escala para o controle de cercopídeos em pastagens e cana-de-açúcar, principalmente no

Nordeste. São conhecidas duas variedades desta espécie, a *M. anisopliae* var. *anisopliae* e a *M. anisopliae* var. *major*. A primeira é de maior presença no Brasil. É uma espécie de elevada variabilidade genética devido a heterocariose, o que resulta em uma grande diversidade de raças, com diferentes graus de virulência, especificidade, produção de conídios e variados níveis de resistência à radiação ultravioleta (Alves, 1986). Esta grande diversidade é de utilidade potencial como fonte de agentes de controle para as mais diversas condições ambientais e ecossistemas. Assim, teríamos cepas adaptadas para o Nordeste, cerrados, pastagens do Sul, etc.

*Metarhizium anisopliae* ocorre naturalmente em mais de 300 espécies de insetos. É um deuteromiceto, da família Moniliaceae. Sua primeira descrição como agente de controle biológico data de 1879, quando Metschnikoff relatou a doença causada por este fungo em larvas de curculionídeos atacando beterraba.

No Brasil é muito utilizado para o controle de *Mahanarva posticata*, a cigarrinha da cana-de-açúcar. Esta praga ocorre em mais de 450.000 ha de cana plantada no Nordeste. O sucesso do uso de *M. anisopliae* pode ser verificado pelo incremento na área tratada com o fungo (nos estados de Alagoas e Pernambuco) de 6.000 ha em 1977 para 150.000 ha em 1984 (Alves, 1986). A redução no uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar é importante para preservar os inimigos naturais da broca-da-cana, principalmente microimenópteros (*Apanteles* e *Trichogramma*) e moscas (*Paratheresia* e *Metagonistylum*). Outra aplicação importante de *M. anisopliae* é para o controle da cigarrinha-das-pastagens (gêneros *Deois* e *Zulia*), principal praga nas pastagens brasileiras. Neste caso a importância deste agente de controle é ainda maior já que o uso de agrotóxicos em pastagens é inviável economicamente, além de deixar resíduos no leite e carne e reduzir a biodiversidade (fauna silvestre e insetos parasitos e predadores) (Alves, 1986).

A broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) é altamente sensível ao ataque de *M. anisopliae*. No Nordeste, sua ocorrência é comum, causando até 10% de mortalidade natural da broca no campo. Outras pragas que podem ser atacadas por este fungo estão na tabela 4.

**Tabela 4.** Pragmas atacadas por *Metarhizium anisopliae*

Cultura	Praga
Soja	Percevejo-da-soja ( <i>Nezara</i> ou <i>Piezodorus</i> )
Bananeira	<i>Cosmopolites sordidus</i>
Geral	Formigas ( <i>Atta</i> )
Algodão	Bicudo ( <i>Anthonomus grandis</i> )
Café	Broca ( <i>H. hampei</i> )
Cana-de-açúcar	Broca ( <i>Diatraea saccharalis</i> ) Cigarrinha ( <i>Mahanarva posticata</i> )
Pastagens	Cigarrinha ( <i>Deois</i> e <i>Zulia</i> )

Outros fungos de grande importância para o controle biológico de pragmas pertencem ao gênero *Beauveria*. Pertencentes à classe Deuteromycetes, podem causar doenças em mais de 200 espécies de insetos. É o agente fúngico para o controle de insetos mais usado no mundo (Reis, 1991). Este gênero pode ser usado para controlar espécies de Coleoptera, Hemiptera e Homoptera. As espécies mais conhecidas são *B. bassiana* e *B. brongniartii*.

Esta última é produzida na Rússia com o nome de Boverin, sendo usado em conjunto com produtos à base de malathion e trichlorphon para o controle de *Leptinotarsa decemlineata* e *Cydia pomonella* (Goral e Leppa, 1977; Ferron, 1981). Na China, o tratamento de 400.000 ha de milho com *B. bassiana* reduziu de 60% para 2%, em 5 anos, o nível de dano causado pela praga *Ostrinia nubilalis* (Hussey e Tinsley, 1981). Dagoberto *et al.* (1980) registrou 95% de mortalidade de *Diatraea saccharalis* em arroz na Argentina.

No Brasil, o potencial para a aplicação de *B. bassiana* no controle biológico é muito grande, como se reflete na relação de espécies de insetos de importância agrícola que apresenta susceptibilidade ao ataque deste fungo (Tabela 5).

A terceira espécie em importância para controlar pragmas agrícolas é *Nomuraea rileyi*, que ataca mais de 32 espécies de insetos, entre Coleoptera, Lepidoptera e Orthoptera, sendo que 90% dos hospedeiros são Lepidoptera. Os resultados mais expressivos no Brasil são para o controle de *Anticarsia gemmatallis* em soja, com 94% de controle no Paraná e 83% no Rio Grande do Sul (Correa e Smith, 1975; Galileo *et al.*, 1977). Outras espécies de pragmas atacadas por *N. rileyi* podem ser vistas na Tabela 6.

**Tabela 5.** Insetos de importância para a agricultura suscetíveis ao ataque de *Beauveria bassiana* (adaptado de Alves, 1986).

Espécie de Inseto	Planta hospedeira	Referência
<i>Aethalium reticulatum</i> <i>Atta sexdens rubropilosa</i> <i>Aracanthus</i> sp.	diversas - caupi	Alves, 1982 idem Daoust <i>et al.</i> , 1983
<i>Bombyx mori</i> <i>Brassolis sophorae</i> <i>Castnia licus</i>	- palmáceas cana-de-açúcar	Alves, 1969* Habib e Andrade, 1977 Villas-Boas <i>et al.</i> , 1983
<i>Cerotoma arcuata</i> <i>Chalcodermus aeneus</i> <i>Cosmopotites sordidus</i>	caupi e feijão caupi banana	Daoust <i>et al.</i> , 1983; Coutinho, 1988* Daoust <i>et al.</i> , 1983 Alves, 1973*
<i>Crimissa</i> sp. <i>Deois flavopicta</i> <i>Diatraea saccharalis</i>	caju pastagem cana-de-açúcar	Daoust <i>et al.</i> , 1983 Alves, 1973* Alves, 1974*, 1975*
<i>Diabrotica speciosa</i> <i>Diabrotica</i> sp. <i>Dichotomius anaglypticus</i>	soja caupi coprófago	Tonet e Reis, 1979 Daoust <i>et al.</i> , 1983 Alves, 1975*
<i>Edessa mediatubunda</i> <i>Galleria mellonella</i> <i>Hypothenemus hampei</i>	soja - café	Alves, 1975* Alves, 1972* Robbs, 1962; Alves, 1970*
<i>Lagria villosa</i> <i>Metamasius hemipterus</i> <i>Nezara viridula</i>	hortícolas banana soja	Alves, 1979* Alves, 1975* Alves, 1978
<i>Piezodorus guildinii</i> <i>Rodolia cardinalis</i> <i>Solenopsis invicta</i>	soja predador predador	Tonet e Reis, 1979 Alves, 1978 Alves, 1985*
<i>Stenoma decora</i> <i>Terasia meticulosalis</i>	cacau eritrina	Alves, 1985* Alves, 1985*

\* - não publicado

**Tabela 6.** Espécies de insetos suscetíveis ao ataque de *Nomuraea rileyi* (adaptado de Alves, 1986, incluindo dados de Ignoffo, 1981).

Inseto	Planta hospedeira
<i>Agrotis ipsilon</i> <i>Anticarsia gemmatalis</i> <i>Bombyx mori</i>	feijão, soja feijão, soja -
<i>Cirphis latiuscula</i> <i>Diatraea saccharalis</i> <i>Heliothis zea</i>	cana-de-açúcar cana-de-açúcar alfafa, milho, algodão, soja
<i>Heliothis virescens</i> <i>Peridroma saucia</i> <i>Pseudoplusia includens</i>	algodão, soja soja algodão, soja
<i>Plusia</i> sp. <i>Spodoptera frugiperda</i> <i>Trichoplusia ni</i>	soja - algodão, repolho, soja

Outras espécies de fungos entomopatogênicos incluem *Verticillium lecanii*, que pode ser utilizado para o controle de pulgões de cana-de-açúcar e colchonilhas de citrus (*Coccus viridis*). Na Europa é comercializado numa formulação concentrada de nome Vertalec (Alves, 1986). O fungo *Hirsutella thompsonii* é específico para controlar ácaros (eriofídeos e tetraniquídeos), sendo comercializado nos EUA pelos Laboratórios Abbott com o nome de MyCar. *Aschersonia aleyrodinis* causa doença em cochonilhas e mosca-branca (Aleyrodidae), praga comum nos pomares de citrus no Brasil. Na Rússia é comercializado com o nome de Aseronija (Kuno *et al.*, 1982). O gênero *Cordyceps* tem mais de 150 espécies parasitas de insetos e outros artrópodes. Tem grande potencial para seleção de linhagens para uso em controle biológico. O gênero *Entomophthora*, da classe Zygomycetes tem ação patógena em diversas pragas, porém apresenta dificuldades para produção em escala industrial e aplicação no campo (Alves, 1986) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Espécies de *Entomophthora* e insetos suscetíveis.

Insetos-praga	Espécie de <i>Entomophthora</i>
Pulgões	<i>E. thaxteriana</i> <i>E. aphidis</i> <i>E. virulenta</i>
Lepidópteros	<i>E. aulicae</i> <i>E. gammae</i>
Gafanhotos Pulgões e lepidópteros Moscas	<i>E. grylli</i> <i>E. coronata</i> <i>E. muscae</i>

Além de insetos, mais de 50 espécies de fungos podem atacar nematóides, em sua maioria Deuteromicetos. Dentre eles podemos encontrar: *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactyllela*, *Trichothecium* e *Paecilomyces*. Na Europa pode ser encontrado o produto Royal-350, à base de *Arthrobotrys tortor* para controlar o nematóide *Meloidogyne*.

### 3.3. Agentes Microbianos para o Controle de Doenças das Plantas Cultivadas

A ocorrência de doença em plantas pode ser considerada não como uma ação isolada de um patógeno sobre o hospedeiro, mas como o resultado de uma complexa rede de interações ecológicas e ambientais que torna o hospedeiro particularmente vulnerável ao “fitopatógeno” e estes desimpedidos para colonizar, se multiplicar e infestar toda uma cultura agrícola, causando sérios danos econômicos. Se tivermos em mente esta visão holística, eliminando o tradicional reducionismo a que estamos habituados, torna-se mais fácil entender e até encontrar meios alternativos para controlar doenças de plantas, complementando ou reduzindo o uso de agrotóxicos. Esta visão holística deve ser adotada também quando tratamos de controlar um fitopatógeno através da utilização de um microrganismo antagonico. O reducionismo aqui levaria alguém a imaginar que a simples inoculação de um microrganismo antagonico resolveria o problema da doença, tal qual a aplicação de um fungicida. Todavia, o sucesso da introdução de um agente de controle biológico depende em muito, dentre outros fatores, das condições ambientais e do manejo agrícola utilizado. Para ilustrar este fato tomemos os resultados obtidos por Ownley *et al.* (1992), com relação à atividade antagonista de *Pseudomonas fluorescens*, estirpe 2-79, sobre o fitopatógeno *Gaeumannomyces graminis* (tabela 8).

**Tabela 8.** Influência das características de solo na atividade antagonista de *Pseudomonas fluorescens*, estirpe 2-79 (Ownley *et al.*, 1992)

Correlação positiva com antagonicidade	Correlação negativa com antagonicidade
%areia pH SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> conteúdo de Na e Zn	%argila %silte acidez trocável conteúdo de Fe e Mn teor de matéria orgânica carbono total nitrogênio total

Certos tipos de manejo agrícola criam o nicho ideal para a profileração de fitopatógenos, nematóides, competidores e até plantas daninhas. Outros tipos de manejo podem favorecer o controle biológico pela destruição de fontes de inóculo, como resíduos da cultura, por exemplo. Assim, a época e profundidade de enterrio dos resíduos, o plantio direto, rotação de culturas ou cultivares, a época e profundidade da sementeira, e o manejo da fertilização e da irrigação podem ser decisivos para a ocorrência ou não de doenças (Homechin, 1991). A rotação de culturas, além de ajudar o controle de fitopatógenos que dependem dos restos culturais para sobreviver, propicia um incremento da diversidade dos microrganismos do solo, principalmente aqueles sob efeito da rizosfera, aumentando o potencial da ocorrência natural de microrganismos antagonistas nos solo (Papavizas, 1981). Solos compactados pelo uso excessivo de máquinas agrícolas são mais propícios à ocorrência de doenças



de raiz, já que a extração de água pelas raízes superficiais torna o ambiente ideal para a proliferação de fitopatógenos como *Pythium* e *Phytophthora* (Homechin, 1991).

É importante também compreender os possíveis mecanismos de antagonicidade dos agentes de controle biológico de fitopatógenos. Este é um campo de pesquisa que vem recebendo um grande ímpeto, principalmente com uso de técnicas moleculares e genéticas para destrinchar os reais mecanismos de antagonicidade, com as respectivas trocas de sinais moleculares entre as partes envolvidas. Ainda há muito a avançar nesta área e necessidade de um maior manancial de informações (Baker, 1986). Robbs (1991) enumerou os mecanismos pelos quais agentes bacterianos podem controlar um patógeno:

- parasitismo direto ou predação
- antibiose (produção de antibióticos, bacteriocinas, metabólitos ácidos ou tóxicos etc.)
- competição por elementos essenciais
- estímulo do hospedeiro (Blakeman e Brodie, 1976; Weller, 1988)
- eliminação ou redução do potencial de inóculo
- proteção física do rizoplane ou filoplane
- indução de resistência do hospedeiro (Cook e Baker, 1983)

O conhecimento do mecanismo de antagonicidade pode levar ao conhecimento dos genes envolvidos, que podem ser clonados e inseridos em um outro microrganismo, que tenha maior aplicabilidade para produção industrial e/ou sobrevivência no campo, por exemplo.

Em sua maioria, os microrganismos antagonistas são específicos para o solo e a cultura tratada. Portanto, para cada doença, cultura, solo e clima devem ser utilizadas diferentes estirpes, adaptadas à região (Cook, 1993). Isto transforma em prioridade o inventariamento da diversidade das espécies microbianas potencialmente úteis para o controle de doenças em cada ecossistema, considerando a utilização agrícola das terras e os métodos de manejo aplicados.

Encontrar microrganismos antagonísticos a um patógeno não é considerado um grande problema. Weller (1988) estima que as rizobactérias com potencial para uso em controle biológico correspondem a 10% da população total da rizosfera. Os chamados “solos supressivos” são uma boa matéria-prima para o isolamento de microrganismos para serem submetidos a ensaios *in vitro* e *in vivo* para a seleção de estirpes com bom potencial antagonista (Xu e Gross, 1986; Robbs, 1991). Assim como anteriormente dito com relação às bactérias entomopatogênicas, as formulações contendo espécies esporulantes têm maior viabilidade no campo.

Algumas vezes o biocontrole fracassa, mesmo já tendo sido aplicado com sucesso anteriormente. Isto pode ocorrer devido a perda de competência ecológica e/ou ocorrência de mutações no antagonista, ou pela colonização irregular do rizoplane, ou ainda pela combinação de ambos (Weller, 1988). Este mesmo autor lista algumas características necessárias para que um antagonista tenha eficiência a longo prazo, que podem auxiliar no processo de “screening”:

- presença de cápsulas de polissacarídeos de superfície
- presença de fímbrias
- presença de flagelos
- quimotaxismo
- osmotolerância
- capacidade de utilizar carboidratos complexos

Após ter passado pelos testes microbiológicos e com planta em condições controladas, o potencial antagonista deve ser testado em campo, o chamado teste definitivo (Andrews, 1985). Devem ser monitorados o grau de sobrevivência, crescimento e disseminação do antagonista (Bettiol, 1991). As técnicas avançadas a base de sondas moleculares podem ser de grande utilidade para este monitoramento, já que prescindem de alterações genéticas do microrganismo, e podem ser altamente específicas até a nível de estirpe.

A utilização de agentes microbianos para o controle de doenças de culturas agrícolas ainda não é uma realidade no Brasil. Isto demonstra a necessidade de reforçar os investimentos em pesquisas que visem a exploração da diversidade microbiana dos nossos ecossistemas, e desenvolvimento de técnicas eficazes de “screening” por potenciais antagonistas além de tecnologia de produção e formulação dos agentes em escala industrial. Nos EUA, já existem disponíveis no mercado 6 produtos à base de microrganismos antagonistas (Cook, 1993):

- *Agrobacterium radiobacter* K-84 - para o controle de doença da galha (*Agrobacterium tumefaciens*) (Kerr, 1980)

- *Pseudomonas fluorescens* (Dagger G, Ecogen, Inc.) - controle de podridão de raiz de algodão (*Rhizoctonia* e *Pythium*)
- *Gliocladium virens* (GlioGard) - doença de viveiros de mudas de plantas ornamentais (Lumsden e Walters, 1993)
- *Trichoderma harzianum* (F-Stop) (Harman *et al.*, 1991)
- *Trichoderma harzianum/polysporum* (Binab T) - controle de biodeterioração de madeiras (Ricard, 1981)
- *Bacillus subtilis* (Kodiak) - tratamento de sementes

### 3.4. Diversidade Microbiana e Controle Biológico

A importância da diversidade microbiana para o desenvolvimento de novas e refinamento das já existentes tecnologias para o controle biológico de pragas e doenças é clara. Linhagens isoladas de nossos ecossistemas já estão adaptadas a elas, tendo, portanto, maior potencial de competitividade ecológica e capacidade de sobrevivência se comparadas com as linhagens presentes nos biopesticidas formulados no exterior. A prospecção da diversidade microbiana para fins de controle biológico constitui um filão promissor para as indústrias de “defensivos” agrícolas investirem com boas chances de retorno financeiro.

O estudo da diversidade de agentes entomopatogênicos e antagonistas resulta também em um banco de germoplasma que pode servir como fonte de material genético para resistência à doenças ou pragas. Os agentes de biocontrole podem ser manipulados geneticamente resultando em tecnologias mais eficazes e resultados positivos mais duradouros. Os genes de *B. thuringiensis* responsáveis pela produção de toxinas já foi transferido com sucesso para plantas, que se tornaram resistentes às pragas (Vaeck *et al.*, 1987). Um destes genes também foi clonado em *Rhizobium* para controle de larvas de insetos que se alimentam de nódulos de leguminosas.

O isolamento de agentes de biocontrole de solos, plantas ou insetos deve ser seguido de técnicas de “screening” para a seleção de potenciais agentes, como foi visto na seção anterior. Alternativamente, e contando com o desenvolvimento de métodos mais eficazes de avaliação de riscos de introdução ao ambiente de organismos transgênicos, o agente de biocontrole pode resultar de modificação genética de estirpes de ocorrência natural visando uma maior atividade antagonista. As estratégias de “screening” devem permitir a avaliação de milhares ou dezenas de milhares de estirpes (Cook 1993). Técnicas automatizadas de “screening” devem ser desenvolvidas para permitir a análise de um número grande de estirpes. Um dos critérios a ser aplicado para a seleção de estirpes é a sua amenabilidade para produção massal em cultura líquida (Schisler *et al.*, 1992). Os testes de performance em campo devem ser realizados em regiões onde a praga ou doença ocorra em níveis significativos. É inviável testar um agente de controle de uma doença de raiz em solos onde a doença está sendo controlada com rotação de culturas, por exemplo (Schippers *et al.*, 1987; Turner e Backman, 1991). Se o agente for aplicado por pulverização, devem ser seguidas as mesmas estratégias utilizadas para teste de pesticidas químicos (Sutton e Peng, 1993).

Nos EUA, a legislação é considerada por alguns muito rígida no que se refere à obtenção de registro para a comercialização de agentes de controle biológico. Critica-se não a necessidade da legislação, que é importante para prevenir introduções de organismos exóticos que podem se tornar uma nova praga ou doença de plantas e até resultar em um desastre ecológico. O problema é que os agentes de biocontrole são rotulados de “pesticidas microbianos” pelo órgão regulador dos EUA (o Environmental Protection Agency, EPA, através do Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act, FIFRA; e Federal Food, Drug, and Cosmetics Act, FFDCA). Os potenciais agentes biológicos são submetidos a uma bateria de testes muito semelhante ao que ocorre com pesticidas químicos. Isto acarreta um custo adicional que empresas regionais de pequeno porte, as potenciais produtoras de produtos biológicos específicos para sua região, não têm condições de suportar. Agentes biológicos não devem ser tratados como produtos químicos, que não têm especificidade de ação, nem sistemas de regulação da liberação do princípio ativo no ambiente. Cook (1993) considera isto como o maior empecilho para um incremento na implementação de técnicas de controle biológico no dia-a-dia dos produtores americanos.

No Brasil, estamos em fase de definição de leis e regulamentação da utilização de organismos vivos nas atividades industriais e agrícolas, incluindo a lei de patentes e propriedade intelectual. Devemos cuidar para concebermos estas leis, no que se refere a registro de produtos biológicos, sob um paradigma biológico e não químico, como parece ter sido o caso nos EUA.

#### 4. Referências Bibliográficas

- Ash, C.; Priest, F. G. e Collins, M. D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek*, **64**:253-260.
- Baker, D. e Torrey, J. G. (1980). Characterization of an effective actinorhizal microsymbiont, *Frankia* sp. Avcl1 (Actinomycetales). *Canadian Journal of Microbiology*, **26**:1066-1071.
- Baldani, J. I.; Baldani, V. L. D.; Seldin, L. e Döbereiner, J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **36**:86-93.
- Beijerinck, M. W. (1901). *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, **7**:561-582.
- Chen, W. X.; Yan, G. H. e Li, J. L. (1988). Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **38**:392-397.
- Chen, W. X.; Li, G. S.; Qi, Y. L.; Wang, E. T.; Yuan, H. L. e Li, J. L. (1991). *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **41**:275-280.
- Chen, W.; Wang, E.; Wang, S.; Li, Y.; Chen, X. e Li, Y. (1995). Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **45**(1):153-159.
- Costacurta, 1994
- De Lajudie, P.; Willems, A.; Pot, B.; Dewettinck, D.; Maestrojuan, G.; Neyra, M.; Collins, M.D.; Dreyfus, B.; Kersters, K. e Gillis, M. (1994). Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga*, sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44**(4):715-733.
- De-Polli, H.; Matsui, E.; Döbereiner, J. e Salate, E. (1977). Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses <sup>15</sup>N<sub>2</sub> incorporation. *Soil Biology and Biochemistry*, **9**:119-123.
- Derx, H. G. (1950). *Bogoriensis*, 1:1-11.
- Döbereiner, J. (1959). Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* no solo. *Revista Brasileira de Biologia*, **19**:251-258.
- Döbereiner, J. (1966). *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **1**:357-365.
- Döbereiner, J. (1970). Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum* Flugge. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, **124**:224-230.
- Döbereiner, J. (1992). Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. *Ciência e Cultura (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science)*, **44**(5):310-313.
- Döbereiner, J. e Ruschel, A. P. (1958). *Revista de Biologia*, **1**:261-272.
- Dreyfus, B.; Garcia, J. L. e Gillis, M. (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **38**:89-98.
- Eckhardt, M. M.; Baldwin, I. R. e Fred, E. B. (1931). *Journal of Bacteriology*, **21**:273-285.
- Frank, B. (1889). *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, **7**:332-346.
- Gillis, M.; Kersters, K.; Hoste, B.; Jaňssens, D.; Kroppenstedt, M.; Stephan, M. P.; Teixeira, K. R. S.; Döbereiner, J. e De Ley, J. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **39**:361-364.

- Haahtela, K.; Helander, I.; Nurmiäho-Lassila, E. -L. e Sundman, V. (1983). Morphological and physiological characteristics and lipopolysaccharide composition of N<sub>2</sub>-fixing (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-reducing) root-associated *Pseudomonas* sp. *Canadian Journal of Microbiology*, **29**:874-880.
- Howieson, J. G. (1995). Rhizobial persistence and its role in the development of sustainable agricultural systems in Mediterranean environments. *Soil Biology and Biochemistry*, **27(4-5)**:603-610.
- Jarvis, B. D. W.; Pankhurst, C. E. e Patel, J. J. (1982). *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **32**:378-380.
- Jenni, B. e Aragno, M. (1987) *Xanthobacter agilis* sp. nov., a motile, dinitrogen-fixing, hydrogen-oxidizing bacterium. *Systematics and Applied Microbiology*, **9**:254-257.
- Jensen, H. L.; Petersen, E. J.; De, P. K. e Bhattacharya, R. (1960). *Archiv für Mikrobiologie*, **36**:182-195.
- Jordan, D. C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root-nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **32**:136-139.
- Kapulnik, Y.; Sarig, S.; Nur, I.; Okon, J.; Kigel, J. e Henis, V. (1981). Yield increases in summer cereal crops of Israel in fields inoculated with *Azospirillum*. *Experientia Agricola*, **17**:179-187.
- Kramicker, B. J. and Brill, W. J. (1986). Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodule isolates from Wisconsin soybean farms. *Applied and Environmental Microbiology*, **51(3)**:487-492.
- Kuykendall, L. D.; Saxena, B.; Devine, T. E. and Udell, S. E. (1992). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, **38(6)**:501-505.
- Lima, E.; Boddey, R. M. e Döbereiner, J. (1987). Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using <sup>15</sup>N<sub>2</sub> aided nitrogen balance. *Soil Biology and Biochemistry*, **19**:165-170.
- Lindström, K. (1989). *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **39**:365-367.
- Lipman, J. G. (1903). *Report of the New Jersey Agricultural Experiment Station*, **24**:217-285.
- Lipman, J. G. (1904). *Report of the New Jersey Agricultural Experiment Station*, **25**:237-289.
- Martinez-Romero, E.; Segovia, L.; Mercante, F. M.; Franco, A. A.; Graham, P. e Pardo, M. A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **41**:417-426.
- McClung, C. R.; Patriquin, D. G. e Davies, R. E. (1983). *Campylobacter nitrofigiles* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with roots of *Spartina alterniflora* Loisel. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **33**:605-612.
- Minamisawa, K.; Seki, T.; Onodera, S.; Kubota, M. e Asami, T. (1992). Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, **58(9)**:2832-2839.
- Nour, S. M.; Fernandez, M. P.; Normand, P. e Cleyet-Marel, J. -C. (1994). *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44(3)**:511-522.
- Okon, Y. (1985). *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends in Biotechnology*, **3**:223-228.
- Olsen, P. E.; Rice, W. A.; Bordeleau, L. M. e Biederbeck, V. O. (1994). Analysis and regulation of legume inoculants in Canada: the need for an increase in standards. *Plant and Soil* **161(1)**:127-134.
- Reinhold, B.; Hurek, T.; Fendrik, I.; Pot, B.; Kersters, K.; Thielemans, S. e De Ley, J. (1987). *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with the roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *International Journal of Systematic Bacteriology*, **37**:43-51.
- Reinhold-Hurek, B.; Hurek, T.; Gillis, M.; Hoste, B.; Vancanneyt, M.; Kersters, K. e De Ley, J. (1993). *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth),

- and description of two species, *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **43**(3):574-584.
- Segovia, L.; Young, J. P. W. e Martinez-Romero, E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **43**:374-377.
- Seldin, L.; Van Elsas, J. D. e Penido, E. G. C. (1984). *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and grass roots. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **34**:451-456.
- Siqueira, J. O. e Franco, A. A. (1988). Biotecnologia do Solo: Fundamentos e Perspectivas. FAEPE/ABEAS/MEC/ESAL. Lavras. 236p.
- Stanley, J.; Brown, G. G. and Verma, P. S. (1985). Slow-growing *Rhizobium japonicum* comprises two highly divergent symbiotic types. *Journal of Bacteriology*, **163**:148-154.
- Tarrand, J. J.; Krieg, N. R. e Döbereiner, J. (1978) A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, **24**:967-980.
- Tchan, Y. T. (1957). *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, **82**:314-316.
- Thompson, J. P. e Skerman, V. B. D. (1979). Azotobacteriaceae - Taxonomy and Ecology of the Aerobic Nitrogen-Fixing Bacterium. *Academic Press*, London, 328-332.
- Woese, C. R. (1992). Prokaryote Systematics: The Evolution of a Science. In: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. Second Edition.* ( A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder e K. -H. Schleifer, Eds.). Springer-Verlag, New York. v. 1, 3-18.
- Xu *et al.* (1995). *Bradyrhizobium liaonigensis* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **45**(4):706-711.