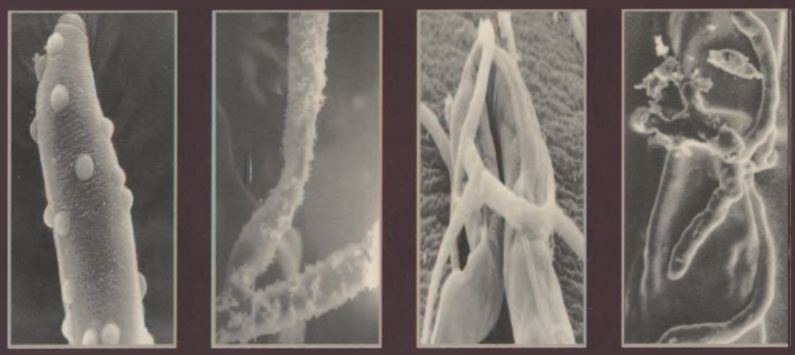
CONTROLE BIOLÓGICO



Editores
MAR SOARES DE MELO
O LÚCIO DE AZEVEDO

VOLUME 2

O controle biológico, através do emprego de microrganismos vivos e com respostas positivas para um patossistema, constitui, sem dúvida, uma das práticas mais sadias e econômicas almejadas em um agroecossistema afetado por pragas e doenças. Embora o Brasil possua grandes áreas ocupadas por uma agricultura extensiva e intensiva, fitoparasitos constituídos por pragas e moléstias ainda causam danos consideráveis, traduzidos em perdas ou má qualidade da safra colhida, principalmente a exportável. Sabe-se que nas próximas décadas os agroquímicos continuarão sendo utilizados na produção de alimentos para suprir as necessidades de um mundo faminto. Surgem, porém, com o emprego indiscriminado do controle químico, vários problemas causados ao meio ambiente, destacando-se no agroecossistema os desequilíbrios biológicos e a emergência de resistências nas espécies-alvo do patossistema (pragas e fitopatógenos indígenas e exóticos). Surge então a necessidade do emprego do controle biológico em áreas de agricultura com recursos carentes, como nos países do segundo mundo. No Brasil, embora exista um grupo competente de pesquisadores na área do combate biológico, falta muito ainda a experiência prática de transferir os resultados obtidos para o emprego em condições de campo. Cabe, pois, um voto de louvor quando verifica-se a edição de mais um livro colaborando para novas metodologias e conceitos de biocontrole tão necessários a uma agricultura econômica e saudável.

C. F. Robbs

Embrapa

CONTROLE BIOLÓGICO

2

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente: Fernando Henrique Cardoso

Ministro da Agricultura e do Abastecimento: Marcus Vinícius Pratini de Moraes

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Presidente: Alberto Duque Portugal

Diretores: Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Elza Angela Battaglia Brito da Cunha

Embrapa Meio Ambiente

Chefe Geral: Bernardo van Raij

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento: Deise Maria Fontana Capalbo

Chefe Adjunto Administrativo: Vander Roberto Bisinoto

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio Ambiente
Ministério da Agricultura e do Abastecimento

CONTROLE BIOLÓGICO

Editores
Itamar Soares de Melo
João Lúcio de Azevedo

2

Embrapa Meio Ambiente

Exemplares dessa publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Meio Ambiente
Rodovia SP 340 - km 127,5 - Tanquinho Velho
Caixa Postal 69 13820-000, Jaguariúna, SP
Fone: (19) 3867-8750 Fax: (19) 3867-8740
sac@cnpma.embrapa.br
www.cnpma.embrapa.br

Revisão: Maria Cristina Tordin e Denise Moraes de Oliveira

Normatização: Maria Amélia de Toledo Leme

Produção gráfica: HORTOGRÁFICA - Gráfica e Editora Ltda., F.: 19 236.1778 / 233.4795

Capa: Itamar Soares de Melo

Tiragem: 1000 exemplares

Micrografias da capa
Primeira micrografia de varredura à esquerda: esporângios de *Pasteuria* sp. aderidos à cutícula de uma fêmea de *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann, 1989) (cortesia do prof. Jaime Santos, UNESP, Jaboticabal)
Segunda micrografia de varredura: hifas *de Rhizoctonia solani* parasitadas por *Bacillus subtilis* (cortesia do Dr. Itamar Soares de Melo)
Terceira foto da esquerda para a direita: *Panagrellus* sp. capturado por redes adesivas de *Monacrosporium cytosporum* (Cooke & Dickinson, 1965). A diagramação no formato exposto deformou a fotografia (cortesia do prof. Jaime Santos, UNESP, Jaboticabal)
Quarta micrografia: parasitismo de hifas de *Rhizoctonia solani* por *Trichoderma harzianum* (cortesia do Dr. Itamar Soares de Melo)

Micrografias da quarta capa
Primeira micrografia, da esquerda para a direita: escleródios de *Sclerotium rolfsii*
Segunda fotografia, da esquerda para a direita: Micrografia do esporângio de *B. sphaericus* 2362 (cortesia de Dra. Katia Regina Araújo da Silva e Dra. Maria Nazareth Leal de Meirelles, Instituo Oswaldo Cruz)
Terceira micrografia, da esquerda para a direita: endosporos de *Pasteuria penetrans* aderido ao nematóide, células e fibras parasporais de *P. penetrans*
Quarta micrografia, da esquerda para a direita: enrolamento de hifas de *T. harzianum* sobre *R. solani* (cortesia do Dr. Itamar Soares de Melo)

C764

Controle biológico / editores Itamar Soares de Melo, João Lúcio de Azevedo. - Jaguariúna, SP: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000.
388p.; 24cm

ISBN 85-85771-09-7

Inclui bibliografia

1. Pragas agrícolas - Controle histórico. I. Melo, Itamar Soares de. II. Azevedo, João Lúcio de. III. EMBRAPA Meio Ambiente.

CDD-632.96

AUTORES

Bonifácio P. Magalhães
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70849-970 Caixa Postal 2372, Brasília, DF
Carlos Alfredo Saumell
Área de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Departamento de Sanidad Animal y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro, Paraje Arroyo Seco, 7000, Tandil, Argentina.
Carlos Roberto Felix
Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília
CEP 70910-900 – Brasília, DF
Claudia Maroja Brazão e Silva
FioCruz
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos, Caixa Postal 926, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, RJ
D.R. Sosa-Gómez
Embrapa Soja, Caixa Postal 1061, CEP 86001-970, Londrina, Pr
Deise Maria Fontana Capalbo
Embrapa Meio Ambiente
Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000
Caixa Postal 69, Jaguariúna, SP
Elizabeth Aparecida Baptista De Nardo
Embrapa Meio Ambiente
Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000
Caixa Postal 69, Jaguariúna, SP
Flávio Moscardi
Embrapa Soja, CEP 86001-970, Caixa Postal 1061, Londrina, PR
Itamar Soares de Melo
Embrapa Meio Ambiente
Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000
Caixa Postal 69, Jaguariúna, SP
Jane L. Faul
Deparment of Biology
Birkbeck College, University of London
University of London, Malet Street
London WC1E 7HX
Janice Lisboa De Marco
Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília
CEP 70910-900 – Brasília, DF

João Batista T. da Silva
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70849-970
C.P. 2372, Brasília, DF
João Lúcio de Azevedo
Departamento de Genética, ESALQ/USP
Caixa Postal 9, CEP 13418-900 Piracicaba, SP
José Luiz Caldas Wolff
Departamento de Genética, ESALQ/USP
Caixa Postal 9, CEP 13418-900 Piracicaba, SP
Leon Rabinovitch
FioCruz
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos, Caixa Postal 926, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, RJ
Luzia Helena Corrêa Lima
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
SAIN Parque Rural, Caixa Postal 02372, CEP 70770-900 – Brasília, DF
Marcos R. de Faria
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70849-970
Caixa Postal 2372, Brasília, DF
Rosa de Lima Ramos Mariano
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Agronomia/Fitossanidade, Av. D. Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52011-200, Recife, PE
Regina Santos de Azevedo Alves
FioCruz
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos, Caixa Postal 926, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, RJ
Reginaldo da Silva Romeiro
Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitopatologia, CEP 36570-000 Viçosa, MG
Terezinha Padilha
Embrapa-LABEX. USDA-ARS, LPSI-IDRL, Building 1040, Room 105, Belsville MD 20705, USA
Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt
Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - BR 465 Km 7, CEP 23890-000
Seropédica, RJ

PREFÁCIO

Nessa virada do século, a população mundial atingiu a cifra dos seis bilhões de habitantes. Embora em ritmo menos acentuado que nos períodos anteriores, ela vai continuar aumentando e, conseqüentemente, a demanda por alimentos vai também aumentar. A área de solo cultivável disponível no nosso planeta é limitada e novas fronteiras agrícolas estão cada vez mais escassas. Para suprir as necessidades da população mundial, a solução é o aumento de produtividade e isso tem que ser conseguido sem prejudicar o ambiente.

A espécie humana, para obter alimentos, está em constante competição com pragas e moléstias. Estima-se que existam mais de 7 milhões de espécies de insetos e cerca de 2 milhões de espécies de microrganismos, principalmente fungos. Se apenas 1% dessas espécies competir na busca de alimentos com a população humana, cerca de 100.000 pestes poderão prejudicar a agricultura e a pecuária, sendo esta uma estimativa extremamente conservadora.

Certamente, os produtos químicos ou agroquímicos têm sido eficientes no controle de pestes agrícolas. No entanto, são bastante conhecidos os problemas resultantes de seu uso constante e, muitas vezes, indiscriminado. Dentre eles, os principais são os efeitos danosos causados ao ambiente, afetando os seres vivos e causando desequilíbrios biológicos e a emergência de resistência em suas espécies-alvo, tornando o tratamento, em muitos casos, ineficaz e anti-econômico. A ordem mundial clama a produção de alimentos mais baratos e de melhor qualidade, sem destruir o ambiente.

Uma alternativa viável e extremamente racional e elegante é a utilização em maior escala do controle biológico, especialmente em países em desenvolvimento, carentes de recursos financeiros e possuidores de vastas áreas agriculturáveis, como é o caso do Brasil. Felizmente, a necessidade do desenvolvimento de mais pesquisas sobre controle biológico, para atender às demandas atuais e, principalmente, futuras tem sido sentida em nosso país. Um grupo cada vez maior e bastante competente de pesquisadores brasileiros vem se dedicando ao assunto. Os resultados obtidos são muito animadores e o Brasil é atualmente um dos líderes mundiais no controle biológico na agricultura, não

só pelas vastas áreas agrícolas em que são aplicados produtos biológicos, substituindo parcial ou totalmente os produtos químicos.

O volume I da publicação "Controle Biológico" mostrou, em seus 8 capítulos, a potencialidade da área e parte da competência técnico-científica já instalada no país. No entanto, essa foi apenas uma tímida faceta do que já existe sobre controle biológico no mundo e no Brasil. A alta demanda pela publicação também revelou que existe um grande número de interessados em controle biológico, desde estudantes de graduação, extensionistas e agricultores, o que mostra o grande interesse e aceitação do uso de biopesticidas. Essa demanda nos fez publicar o volume 2 da série Controle Biológico, no qual serão abordados outros aspectos importantes, desde processos inteligentes de controle visando a um equilíbrio saudável entre plantas cultivadas e pragas e moléstias, até capítulos mais específicos sobre controle de nematóides, carrapatos, vetores de doenças tropicais, fitopatógenos e a utilização de novas espécies no controle biológico.

Mais uma vez, espera-se que a publicação estimule e favoreça a entrada de mais pessoas atuantes em controle biológico, desde aqueles que atuam criando novos processos e produtos para o biocontrole, até aqueles que, no outro extremo, aplicam os produtos gerados, contribuindo para uma agricultura mais saudável e racional.

Como no prefácio do volume I, agradecemos aqui a valiosa colaboração dos autores convidados para a elaboração dos diversos capítulos da presente publicação. Seu espírito de colaboração, aliado a uma alta competência, tornou possível completar a editoração em tempo relativamente curto. Também agradecimentos são devidos ao inestimável apoio da equipe técnica da Embrapa Meio Ambiente: Deise Maria Fontana Capalbo, Regina L. Siewert Rodrigues, Maria Amélia de Toledo Leme e Maria Cristina Tordin.

Itamar Soares de Melo

João Lúcio de Azevedo

SUMÁRIO

Capítulo 4

CONTROLE BIOLÓGICO DE CARRAPATOS

Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

Capítulo 5

CONTROLE MICROBIANO DE GAFANHOTOS

Bonifácio P. Magalhães
Marcos R. de Faria
João Batista T. da Silva

Capítulo 6

RESISTÊNCIA DE LEPIDÓPTEROS A NUCLEOPOLIEDROVÍRUS COM ÊNFASE NO SISTEMA LAGARTA-DA-SOJA-VPNAg

Daniel R. Sosa Gomez

Flávio Moscardi

Capítulo 7

TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS E CONTROLE BIOLÓGICO DE *RHIZOCTONIA SOLANI* E *PYTHIUM* SPP.

Itamar Soares de Melo

Jane L. Faull

Capítulo 8

ENZIMAS HIDROLÍTICAS ENVOLVIDAS NO CONTROLE BIOLÓGICO POR MICOPARASITISMO

Luzia Helena Corrêa Lima
Janice Lisboa de Marco
Carlos Roberto Felix

Capítulo 9

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA SISTÊMICA MEDIADA POR RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

Rosa de Lima Ramos Mariano
Reginaldo da S. Romeiro

Capítulo 10

A MODERNA BIOTECNOLOGIA COMO AUXILIAR NO CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE PRAGAS DA AGRICULTURA

João Lúcio de Azevedo
José Luiz Caldas Wolff

Capítulo 11

ANÁLISE DE RISCO E IMPACTO AMBIENTAL DO USO DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

Deise M. F. Capalbo
Elizabeth A. B. De Nardo

1

CONTROLE BIOLÓGICO DE VETORES DE DOENÇAS TROPICAIS UTILIZANDO *BACILLUS* ENTOMOPATOGÊNICOS

Leon Rabinovitch
Claudia Maroja Brazão e Silva
Regina Santos de Azevedo Alves

INTRODUÇÃO

Principais *Bacillus* entomopatogênicos e suas características

Dentre as bactérias dotadas de entomotoxinas e capazes de produzir infecção e/ou intoxicação em insetos, as espécies *Bacillus thuringiensis e Bacillus sphaericus* ganharam notoriedade nos meios científico e industrial, uma vez que algumas linhagens puderam ser empregadas como princípios ativos de preparações industrializadas, como inseticidas de pragas florestais e agrícolas, ou de vetores de doenças para o homem e animais (Rabinovitch, 1998a; Rabinovitch, 1997). A espécie *B. thuringiensis* possui linhagens que são letais para diferentes ordens de insetos, como Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (Barjac & Frachon, 1990; Nicolas, 1992).

De conformidade com Claus & Berkeley (1986), o *B. thuringiensis* Berliner 1915 é Gram-positivo, sobretudo nas fases iniciais de cultivo, possui metabolismo aeróbico, podendo crescer também em anaerobiose em meios de cultura especiais contendo substâncias redutoras, como o formaldeído sulfoxilato de sódio e o tioglicolato de sódio. A D-glucose é usada como fonte de carbono e energia, assim como a L-arabinose, D-xilose e D-manitol; algumas cepas utilizam a sacarose. A hidrólise do

amido, gelatina e caseína são características da maioria das linhagens inseridas na espécie.

As células do *B. thuringiensis* são largas, medindo de 1μm a l,2μm e de 3μm a 5μm de comprimento. A célula-mãe contendo o esporo (esporângio ou endosporo) não apresenta os envoltórios celulares distendidos (células inchadas), sendo os esporos predominantemente elipsoidais* e centrais. Em geral, os esporos da espécie suportam 75°C durante 10 minutos (observação dos autores). A espécie possui, também, como característica importante, a presença do corpo paraesporal, ou seja, uma glicoproteína sólida, próxima do esporo, envolvida ou não pela membrana do exosporium, que ocorre com formas geométricas variadas (Tabela 1). É também conhecido como d-endotoxina ou cristal de protoxina. O corpo paraesporal é o precursor dos peptídios, que vêm a ser as diferentes toxinas entomopatogênicas.

Tanto o *B. thuringiensis* como o *B. sphaericus* produzem um esporo por célula. O esporo pode ser lançado no meio de cultura após a lise da célula e se mostra altamente refringente sob microscopia de contraste-de-fase, quando é chamado de esporo livre, maduro, sendo rico em ácido dipicolínico, componente que na forma de sal de cálcio desempenha papel na termorresistência e que não é encontrado na forma vegetativa. Os esporos são altamente resistentes ao efeito letal do calor, dessecação e a muitos tipos de substâncias desinfetantes, o que permite sua permanência na natureza, principalmente no solo, em estado de dormência por longos períodos e, em alguns casos, por séculos (Slepecky & Leadbetter, 1983; Seaward, 1976; Sneath, 1962).

Já a espécie *B. sphaericus* Neide 1904 é descrita por Claus & Berkeley (1986) como constituída por células Gram-positivas, aeróbicas, que não utilizam a D-glucose, L-arabinose, D-xilose, D-manitol e D-sacarose. Algumas linhagens hidrolisam a caseína e não o amido, mas hidrolisam a gelatina, mais que 90% da população, segundo Oliveira & Rabinovitch (1998). Entretanto, a espécie pode utilizar o glicerol como fonte de carbono e energia (Klein et al., 1989).

As células do *B. sphaericus* são menos largas que aquelas do *B.*

* Em muitas linhagens podem apresentar a forma cilíndrica de modo predominante

thuringiensis (0,6μm a 1μm), mas podem ser mais delgadas (1,5μm-5μm). O esporo é predominantemente esférico, dilatando nitidamente o esporângio, sugerindo a forma de uma raquete de tênis - forma em plectrídio -, já que a sua posição no esporângio é terminal. Na espécie, os corpos para-esporais e esporos estão envolvidos pela membrana do exosporium (Silva et al., 1998; Davidson & Myers, 1981). Em geral, os esporos suportam 80° C durante 12 minutos (observação dos autores) e não são inibidos pelo acetato, propriedade que é utilizada para facilitar o seu isolamento (Travers et al., 1987).

FIGURA 1. Micrografia eletrônica do esporângio de *B. sphaericus* 2362, podendo ser visualizado o corpo paraesporal (cp) e o esporo, envolvidos pelo exospório (ex).
Foto cedida por Katia Regina Araújo da Silva e Maria Nazareth Leal de Meirelles, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

TABELA 1. Correlação entre a forma de algumas protoxinas de *B. thuringiensis* e o grupo de insetos susceptíveis

FORMAS DOS CRISTAIS DE PROTOXINAS [a] [b]		INSETOS SUSCEPTÍVEIS [c]
Cry 1	bi-piramidal	L
Cry 2	cuboidal	L/D ou L
Cry 3A	plano-retangular	C
Cry 3B	irregular	C
Cry 4A; Cry 4B	esférica	D
Cry 11 A	romboidal	D

(a) Dependem da composição da proteína.
(b) Schnepf et al. (1998).
(c) Baseado em Gill et al. (1992).
L = lepidópteros, C = coleópteros e D = dípteros.

O Advento do *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis*

Nos cinco primeiros anos da década de 70, enquanto se conheciam apenas 13 subespécies - hoje sorovares - de *Bacillus thuringiensis*, os quais se relacionavam com cepas dotadas de atividades tóxicas contra lagartas de lepidóptera, mas pouca ou nenhuma toxicidade para larvas de díptera, Goldberg & Margalit (1977) anunciaram uma bactéria esporulada que demonstrou atividade tóxica contra *Anopheles sergentii* Theobald, *Uranotaenia unguiculata* Edwards, *Culex univitattus* Theobald, *Aedes aegypti* Linnaeus e *Culex pipiens* Linnaeus. O isolamento da bactéria deu-se em agosto de 1976, quando Margalit colheu a água poluída de um charco localizado no Deserto de Negev, nas proximidades do Kibutz Zeelim, água esta que continha exclusivamente larvas moribundas de *Culex pipiens* e adultos emergindo de pupas, "uma verdadeira situação de epizootia". Desse material, a partir da côlonia ONR-60A derivaram todas as culturas de *B. thuringiensis* "variedade" *israelensis* (Margalit & Dean, 1985).

A atividade biológica da bactéria matadora de mosquitos era de 30 a 100 vezes superior à do *Bacillus sphaericus* cepa SSII-1, conhecida como larvicida. Cópias da nova linhagem entomopatogênica foram remetidas para Huguette de Barjac do Instituto Pasteur de Paris, através da Organização Mundial da Saúde, em cujo laboratório a linhagem foi identificada como *Bacillus thuringiensis* sorotipo H-14 e onde recebeu ainda o nome de "subespécie" *israelensis* (Barjac, 1978).

A primeira coletânea de informações com extensas abordagens sobre o *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* foi feita por Margalit & Dean (1985), e dela mencionam-se algumas características. A bactéria é tóxica para praticamente todas as larvas de mosquitos e simulídeos, sendo assinaladas por esses autores 72 espécies de mosquitos sensíveis: *Anopheles* (21 espécies), *Aedes* (21), *Culex* (17), *Culiseta* (5), *Limatus* (2), *Uranotaenia* (1), *Psorophora* (1), *Mansonia* (1), *Armigeres* (1), *Trichoprospon* (1) e *Coquilletidia* (1). Com relação aos borrachudos, a atividade efetiva foi assinalada contra *Simulium* (14 espécies), *Cnephia* (2), *Prosimulium* (1), *Austrosimulium* (2), *Eusimulium* (1), *Odogmia* (1) e *Stegoptera* (1).

Duas espécies de chironomídios e uma espécie de dixídio mostraram-se suscetíveis, porém em dosagens duas ordens de magnitude superiores em relação às requeridas para matar larvas de *Culicidae*. Todos os organismos não-alvo cultivados

em associação com larvas de mosquitos não se mostraram prejudicados pelo *Bacillus thuringiensis* "subespécie" *israelensis* (Margalit & Dean 1985). Quando cristais de protoxinas, ou preparações destas, solubilizadas, foram administradas em mosquitos adultos via ânus como enema, a DL_{50} (dose letal que provoca 50% de mortalidade) foi de 0,21µg/ml e 0,01µg/ml, respectivamente.

De acordo ainda com a revisão mencionada, as proteínas protoxinas do *Bacillus thuringiensis* "subespécie" *israelensis* são sintetizadas quando um plasmídio de 72MDa está presente. Os cristais de protoxina solubilizados são altamente lesivos para culturas de tecidos, e hemolíticos e letais para camundongos recém-nascidos, quando injetados via peritoneal, mas não quando administrados "per os". Entretanto, em virtude da sua especificidade, o sorovar *israelensis* é marcantemente seguro para seres não-alvo, incluindo o homem.

Cerca de 240 toneladas de preparações inseticidas à base da "subespécie" *israelensis* foram utilizadas no Oeste da África, em 1982, sem causar um único efeito adverso, assim como nenhum efeito tóxico para o homem foi observado em mais de 23 anos de uso operacional. Com a aplicação em larga escala em nível de campo, Becker (1983) *apud* Margalit & Dean (1985) relatou que uma campanha de controle de mosquitos foi realizada ao longo do Rio Reno, onde 750kg de preparações inseticidas bacterianas em pó foram aplicadas em 1200ha e, também, 2250l de inseticida bacteriano líquido concentrado foram usados em 2200ha, com excelentes resultados. O controle de mosquitos como o da espécie *Aedes vexans* é realizado ainda hoje no vale superior do Rio Reno, na Alemanha, com o *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis*, com igual sucesso (Becker & Reittich 1994, Becker & Ludwig 1983). Este mesmo autor, enfatiza o uso desta bactéria em formulações livres de esporos, na forma de pastilhas ou de grânulos congelados, em programas de controle do *Anopheles sinensis* na China ou *Anopheles nigerrimus*, *An. sundaicus* e *An. albimanus* na Indonésia, Peru e Equador (Becker, 1998).

O *Bacillus thuringiensis* e a sorologia flagelar

Muitas espécies do Gênero *Bacillus* são dotadas de flagelos peritríquios que conferem mobilidade à célula (Claus & Berkeley, 1986). Os flagelos são constituídos

principalmente de proteínas conhecidas por "flagelinas" e também antígeno "H", os quais permitem a obtenção de anticorpos específicos.

Além disso, os antígenos "H" são estáveis, seguros e específicos como foi visto para *Bacillus thuringiensis* (Barjac & Frachon 1990). Os anticorpos obtidos em anti-soros de animais, como o coelho, permitem realizar reações de aglutinação *in vitro* que revelam frações antigênicas, próprias de espécies próximas, de uma só espécie ou frações intra-específicas. Assim, facilitam a chamada classificação sorológica com base no conhecimento dos sorotipos. Esta classificação será aliada às outras propriedades dos *Bacillus,* como as citológicas, bioquímicas, fisiológicas e genéticas, que auxiliarão a taxonomia complementarmente, determinando o sorovar, este último existindo dentro do sorotipo. Para exemplificar sorotipo e sorovar (Tabela 2), conhecem-se até agora 4 sorotipos 3a que são os sorovares *alesti* (3a, 3c) *kurstaki* (3a ,3b, 3c), *sumioyoshiensis* (3a, 3d) e *fukuokaensis* (3a, 3d, 3c,). Já os sorotipos 12, 13 e 14 somente possuem um único sorovar cada, respectivamente *thompsoni*, *pakistani* e *israelensis*.

Os antígenos somáticos dos envoltórios da célula bacteriana, ou antígenos "O", não se prestam para ser aproveitados de modo prático em *B. thuringiensis*, a exemplo do que ocorre com o *B. cereus*, por não serem estáveis, seguros e específicos como o antígeno "H" (Barjac & Frachon, 1990).

Três espécies de *Bacillus* se destacam em estudos que usam classificações complementares baseadas nos antígenos flagelares: *B. cereus*, *B. sphaericus* e *B. thuringiensis*. No Laboratório de Bactérias e Fungos Entomopatogênicos do Instituto Pasteur, de Paris, Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde, são feitas as determinações dos antígenos "H" com o objetivo de serem conhecidos os sorovares, antigamente também denominados de variedades. No mesmo Centro, os antissoros de *B. sphaericus* originaram nove sorotipos até o ano de 1989. Já o *B. cereus*, geneticamente muito próximo do *B. thuringiensis* e *B. anthracis* (Claus & Berkeley, 1986; Gilbert et al., 1981), é um produtor de enterotoxinas e causa intoxicação alimentar no homem, com síndromes diarréica e emética. Nessa espécie, os antígenos somáticos e flagelares são aproveitados para o estudo da epidemiologia das intoxicações. O Laboratório de Higiene de Alimentos do Centro de Saúde Pública de

Londres estabeleceu a correlação entre antígenos somáticos de *B. cereus* e intoxicações provocadas por esta espécie em que, na maioria dos casos, o sorotipo 1 era freqüente (Gilbert & Kramer, 1986; Gilbert & Kramer, 1984; Gilbert et al., 1981; Gilbert, 1979).

Considerando a grande importância de *B. thuringiensis* no campo do controle biológico de insetos, a pesquisa de novas linhagens, naturalmente existentes nos diferentes nichos terrestres, foi auxiliada pela sorologia para fins de taxonomia intra-espécie e, assim, Barjac & Frachon (1990) argumentaram que o *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, como um sorovar distinto, não apresenta problemas de complexidade em relação ao seu antígeno específico H-14. Entretanto, existem dicotomizações dentro de um mesmo sorovar, como, por exemplo, com as chamadas variedades "sandiego" e "tenebrionis", que compartilham os mesmos antígenos "H" do sorovar H8a 8b "morrisoni", mas do qual diferem por serem patogênicos para larvas de Coleoptera (Barjac & Frachon, 1990). Esses autores haviam até então identificado 32 sorovares, incluindo 27 grupos antigênicos e 7 subgrupos.

No presente, são conhecidos 55 antígenos "H" ou sorotipos e 68 sorovares (Tabela 2) entre os *B. thuringiensis* isolados de praticamente todas as regiões da Terra (Lecadet et al., 1996).

TABELA 2. Classificação das linhagens de *Bacillus thuringiensis* de acordo com o sorotipo "H"

ANTÍGENO H	SOROVAR	PRIMEIRA CITAÇÃO OU DESCRIÇÃO
1	*thuringiensis*	Berliner, 1915 ; Heimpel &Angus, 1958
2	*finitimus*	Heimpel & Angus, 1958
3a, 3	*calesti*	Toumanoff & Vago, 1951 ; Heimpel & Angus, 1958
3a, 3b, 3c	*kurstaki*	de Barjac & Lemille, 1970
3a,3d	*sumiyoshiensis*	Ohba & Aizawa, 1989
3a, 3d, 3e	*fukuokaensis*	Ohba & Aizawa, 1989
4a, 4b	*sotto*	Ishiwata, 1905 ; Heimpel & Angus, 1958
4a, 4c	*kenyae*	Bonnefoi & de Barjac, 1963
5a, 5b	*galleriae*	Shvetsova, 1959 ;de Barjac & Bonnefoi, 1962
5a, 5c	*anadensis*	de Barjac & Bonnefoi, 1972
6	*entomocidus*	Heimpel & Angus, 1958
7	*aizawai*	Bonnefoi & de Barjac, 1963
8a, 8b	*morrisoni*	Bonnefoi & de Barjac, 1963
8a, 8c	*ostriniae*	Gaixin, Ketian, Minghua & Xingmin, 1975
8b, 8d	*nigeriensis*	Weiser and Prasertphon, 1984
9	*tolworthi*	Norris, 1964 ;de Barjac & Bonnefoi, 1968
10a, 10b	*darmstadiensis*	Krieg, de Barjac & Bonnefoi, 1968
10a, 10c	*londrina*	Arantes et al. (não publicado)
11a, 11b	*toumanoffi*	Krieg, 1969
11a, 11c	*kyushuensis*	Ohba and Aizawa, 1979
12	*thompsoni*	De Barjac & Thompson, 1970
13	*pakistani*	De Barjac, Cosmao Dumanoir, Shaik & Viviani, 1977
14	*israelensis*	De Barjac, 1978
15	*dakota*	De Lucca, Simonson & Larson, 1979
16	*indiana*	De Lucca, Simonson & Larson, 1979
17	*tohokuensis*	Ohba, Aizawa & Shimizu, 1981
18a, 18b	*kumamotoensis*	Ohba, Ono, Aizawa & Iwanami, 1981
18a, 18c	*yosoo*	Lee H. H. et al., 1994
19	*tochigiensis*	Ohba, Ono, Aizawa & Iwanami, 1981
20a, 20b	*yunnanensis*	Wan-Yu, Qi-Fang, Xue-Ping & You-Wei, 1979
20a, 20c	*pondicheriensis*	Rajagopalan et al. (não publicado)
21	*colmeri*	De Lucca, Palmgren & de Barjac, 1984
22	*shandongiensis*	Ying, Jie & Xichang, 1986
23	*japonensis*	Ohba & Aizawa, 1986
24a, 24b	*neoleonensis*	Rodriguez-Padilla et al., 1988
24a, 24c	*novosibirsk*	Burtseva, Kalmikova et al., 1995
25	*coreanensis*	Lee H. H. et al., 1994
26	*silo*	De Barjac & Lecadet (não publicado)
27	*mexicanensis*	Rodriguez-Padilla & Galan-Wong, 1988
28a, 28b	*monterrey*	Rodriguez-Padilla et al., (não publicado)
28a, 28c	*jegathesan*	Seleena, Lee H. H. and Lecadet, 1995
29	*amagiensis*	Ohba (não publicado)

30	*medellin*	Orduz, Rojas, Correa, Montoya and de Barjac, 1992
31	*toguchini*	Hodirev (não publicado)
32	*cameroun*	Jacquemard, 1990; Juarez-Perez et al., 1994
33	*leesis*	Lee H. H. et al., 1994
34	*konkukian*	Lee H. H. et al., 1994
35	*seoulensis*	Shim, Lee H. H. et al., 1995
36	*malaysiensis*	Ho (não publicado)
37	*andaluciensis*	Santiago-Alvarez et al. (em publicação)
38	*oswaldocruzi*	Rabinovitch et al., 1995
39	*brasiliensis*	Rabinovitch et al., 1995
40	*huazhongensis*	Yu Ziniu, Daí et al., 1996
41	*sooncheon*	Lee H. H. et al., 1995
42	*jinghongiensis*	Rong Sen Li et al., 1995
43	*guiyangiensis*	Rong Sen Li et al., 1995
44	*higo*	Ohba et al., 1995
45	*roskildiensis*	Hinrinschen, Hansen and Daamgaard (não publicado)
46	*chanpaisis*	Chanpaisang (não publicado)
47	*wratislaviensis*	Lonc et al., (não publicado)
48	*balearica*	Caballero et al., (não publicado)
49	*muju*	Seung Hwan Park et al., (não publicado)
50	*navarrensis*	Caballero et al., (não publicado)
51	*xiaguangiensis*	Jian Ping Yan (não publicado)
52	*kim*	Kim et al., 1996
53	*asturiensis*	Santiago-Alvarez et al., (a ser publicado)
54	*poloniensis*	Damgaard et al., (não publicado)
55	*palmanyolensis*	Santiago-Alvarez et al., (não publicado)

* Conforme o Centro de *Bacillus* Entomopatogênicos, Instituto Pasteur, de Paris

Bacillus sphaericus mosquitocidas e seus sorotipos

A maioria das linhagens de *B. sphaericus*, tóxicas para insetos, foi encontrada em mosquitos vivos ou mortos provenientes de regiões tropicais ou subtropicais. A primeira linhagem desta espécie com atividade tóxica foi encontrada em *Culiseta incides*, conforme descreveram Kellen et al. (1965). Outras linhagens foram isoladas, conforme relatado por Weiser (1984), como a 1321 ou (SSII-1) isolada na Índia, a 1593 isolada de larva de *Culex quinquefasciatus*, crescida em criadouro de água poluída em Jacarta, Indonésia e as de número 2013-6 e 2117-2, isoladas na Romênia e nas Filipinas, respectivamente.

Entretanto, a linhagem de *B. sphaericus* que é altamente tóxica para alguns mosquitos, em especial o *Culex pipiens antagonicos*, originou-se do Nordeste

da Nigéria, região do Rio Kaduma, curiosamente isolada de adulto recém emergido de *Simulium damnosum*, sem contudo produzir intoxicação para borrachudos. Esta cepa de sorotipo 5a 5b e fagotipo 3, ganhou o número 2362 e apresentou uma CL_{50} (concentração letal que provoca 50% de mortalidade) de 50 esporos/ml contra larvas de *Culex pipiens*, enquanto que se mostrou menos virulenta contra *Anopheles stephensi*, CL_{50} alcançada com 400 esporos/ml e *Aedes aegypti* com 800 esporos/ml (Weiser, 1984).

Dada a importância de todos esses achados, as cepas de *B. sphaericus,* acima mencionadas, despertaram o interesse da Organização Mundial da Saúde – WHO, que as introduziu nas coleções de culturas de Centros Colaboradores dessa organização, como o da Universidade de Columbus, Ohio e Instituto Pasteur, de Paris. A preocupação foi a de preservar e manter tais cepas, pois poderiam servir de princípios ativos tóxicos para a elaboração de inseticidas em escala industrial.

Também, baseada nos antígenos flagelares (H) do *B. sphaericus*, criou-se uma classificação sorológica que está baseada em sorotipos, no seio dos quais estão inseridas as linhagens entomopatogênicas da espécie, e uma coleção importante que está preservada no Laboratório de Bactérias e Fungos Entomopatogênicos do Instituto Pasteur, de Paris (Lecadet et al., 1996). O potencial mosquitocida destas cepas foi determinado arbitrariamente de acordo com ensaios, nos quais a mortalidade poderia ser de até 100% das larvas de 4º instar de *Culex pipiens* ou *Anopheles stephensi*, após 48 horas de exposição com diluições de cultivos líquidos a 10^{2}. Até recentemente, eram conhecidos 9 sorotipos de *B. sphaericus* entomopatogênicos (Lecadet et al., 1996) os quais têm as suas designações na Tabela 3. Recentemente, o sorotipo H 49 foi descrito para uma cepa isolada e identificada no Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz.

Diferentemente do que ocorre com *B. thuringiensis*, entre os *B. sphaericus* entomopatogênicos não se conhecem sorovares.

TABELA 3. Sorotipos de *Bacillus sphaericus* ativos contra *Culex pipiens* e *Anopheles stephensi*

SOROTIPOS	NÚMERO DE LINHAGENS
H 1a	7
H 2a, 2b	29
H 3	11
H 5a, 5b(**)	222
H 6	40
H 9a, 9c	2
H 25	30
H 26a, 26b	12
H 48	3
H 49(***)	1

* Conforme Lecadet et al. (1996) e adaptação.
** A cepa industrial nº 2362 pertence a este sorotipo.
*** Sorotipo de linhagem isolada na Fundação Oswaldo Cruz (Lecadet, 1998, comunicação aos autores).

COMPOSIÇÃO DO CRISTAL PROTÉICO E ESTRUTURA DAS TOXINAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* SOROVAR *ISRAELENSIS*

O *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* (*Bti*) produz um corpo paraesporal constituído por, pelo menos, três proteínas com massa molecular de 125kDa (Cry4A), 135kDa (Cry4B) e 68kDa (Cry11A), além de uma quantidade menor de uma quarta proteína, de 58kDa (Cry10A) (Crickmore et al., 1998; Yousten, 1996; Höfte & Whiteley, 1989). Estas proteínas têm se mostrado especialmente ativas contra larvas de culicídeos (mosquitos) e simulídeos (borrachudos e piuns). O *Bti* possui ainda uma proteína de 28kDa, a qual exibe atividade citolítica contra uma variedade de células de invertebrados e vertebrados, sendo denominada de Cyt1A (citolisina) (Höfte & Whiteley, 1989).

Diversos estudos têm mostrado que a mistura de toxinas derivadas de *Bti* apresenta maior atividade mosquitocida que a soma das toxicidades individuais destas toxinas. Este aumento na atividade surge como conseqüência da ação sinérgica existente entre estas toxinas, sendo que nenhuma das proteínas que compõem o corpo paraesporal de *Bti* é tão tóxica quanto o cristal intacto contendo todas elas. (Porter et al., 1993; Gill et al., 1992).

Em estudo recente, realizado por Crickmore et al. (1995), as toxicidades individuais das quatro principais δ-endotoxinas de *Bti* – Cry4A, Cry4B, Cry11A e Cyt1A – foram comparadas através de ensaios biológicos contra larvas de *Aedes aegypti*. Dos resultados obtidos nos bioensaios com os corpos de inclusão purificados, contendo uma única toxina, pôde-se verificar que a toxina Cry11A foi a que mostrou maior atividade, sendo duas vezes mais tóxica que a Cry4B e cerca de cinco vezes mais ativa que as δ-endotoxinas Cry11A e Cyt1A, usando-se concentrações que promoviam a morte de 50% das larvas (CL_{50}). Em concentrações superiores à CL_{50}, a toxina Cyt1A foi a que apresentou maior atividade contra esta espécie de mosquito. Interações sinérgicas foram observadas em todas as combinações de toxinas testadas, sendo que um sinergismo maior foi observado nas misturas de Cry4A + Cyt1A; Cry4B + Cyt1A e entre Cry4A + Cry4B + Cyt1A, respectivamente.

No entanto, nenhuma das misturas usadas, inclusive a composta pelas quatro toxinas, mostrou-se tão ativa quanto o cristal nativo de *Bti*, sendo este cerca de oito vezes mais tóxico que a combinação de Cry4A + Cry4B + Cry11A + Cyt1A. Crickmore et al. (1995) sugeriram que a ausência de outros componentes menores do cristal na mistura, tal como a toxina Cry10A, a qual poderia contribuir para a toxicidade global do cristal, explicaria, em parte, os resultados obtidos. Da mesma forma, supuseram que o cristal nativo de *Bti* poderia ser mais eficientemente ingerido ou solubilizado do que uma mistura de quatro inclusões, obtidas de cepas recombinantes.

As toxinas Cry de *Bt* possuem uma estrutura tridimensional e, quando ativadas, podem ser divididas em três regiões estruturais: uma região N-terminal, onde reside o domínio tóxico da molécula, uma região conservada C-terminal e uma região variável entre estas duas regiões, na qual se encontra a maioria das diferenças entre aminoácidos (Porter et al., 1993; Gill et al., 1992).

A função do domínio carboxi-terminal destas proteínas é presumivelmente estrutural, estando envolvida na formação e estabilidade das inclusões cristalinas. Tal hipótese é sustentada pelo fato de que nesta fração da protoxina se encontra a maioria dos resíduos de cisteína, e as pontes dissulfeto, formadas pela oxidação dos radicais destas cisteínas, seriam essenciais para a formação do cristal, sendo também

responsáveis pela diferenciada solubilidade alcalina verificada entre os cristais de protoxina. Esta região poderia, portanto, estar relacionada à manutenção da estrututra cristalina (Du & Nickerson, 1996; Cooper, 1994; Lereclus et al., 1989).

Höfte & Whiteley (1989), ao compararem as seqüências de aminoácidos na fração N-terminal das toxinas de *Bt*, com diferentes especificidades inseticidas, encontraram cinco regiões altamente conservadas, designadas de blocos 1-5, intercaladas com regiões de seqüências variáveis (Lereclus et al., 1989).

Ao comparar-se as toxinas mosquitocidas Cry4A e Cry4B, verifica-se que há significante homologia na seqüência de aminoácidos nas cinco regiões distintas e definidas que constituem os blocos 1 a 5. A toxina Cry11A apresenta homologia com as outras classes de toxinas mosquitocidas, incluindo a Cry2Aa, somente dentro do bloco 1 (Porter et al., 1993).

Com base nesta conservação de blocos definidos, foi postulado que todas as toxinas Cry de *Bt* têm uma conformação tridimensional similar à estrutura cristalina da toxina coleóptera-específica, Cry3A, elucidada por Li et al. (1991), através da técnica de cristalografia com raios X, com uma resolução de 2,5A°.

A estrutura correspondendo à fração ativa da Cry3A, com massa molecular de 67kDa, consiste de três domínios distintos: domínio I, que se trata de um feixe de seis α-hélices anfipáticas, circundando uma hélice hidrofóbica central (α5). Pode estar envolvido na formação de poros na membrana, com a quinta α-hélice formando um componente-chave do poro; domínio II, que compreende três folhas β antiparalelas ao redor de um cerne hidrofóbico, terminando em alças no ápice da molécula. Parece ter um papel essencial na seletividade da toxina, estando provavelmente associado com a ligação da toxina ao receptor; domínio III, que consiste de um β-sanduíche contendo a região conservada C-terminal da maioria das Cry toxinas. Este domínio está possivelmente envolvido na estabilidade estrutural molecular e, talvez, tenha uma função na toxicidade (Yousten, 1996; Wu & Dean, 1996; Gill, 1995; Knowles, 1994; Ellar, 1994; Knowles & Dow, 1993; Li et al., 1991) (Figura 2).

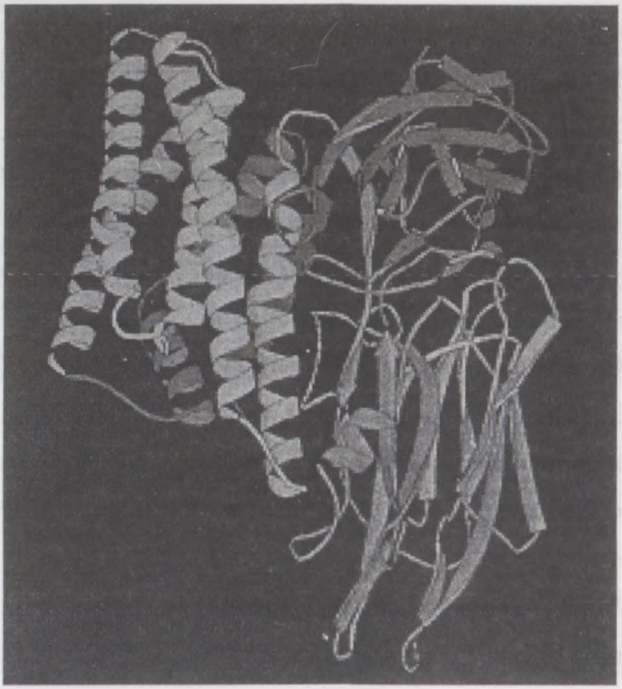


FIGURA 2. Diagrama em fita da δ-endotoxina Cry3A, mostrando a organização dos domínios. O sentido do polipeptídeo está indicado pela coloração da cadeia, que segue a seqüência de cores do arco-íris, indo do vermelho, que representa a região N-terminal, ao azul, que corresponde à fração C-terminal. Os três domínios são: I, um feixe de α-hélices (parte superior esquerda); II, reunião de três folhas β (base); e III, um β-sanduíche (parte superior direita). (Reproduzido com permissão de Li et al., 1991)

Posteriormente, Grochulski et al. (1995) investigaram a estrutura tridimensional da toxina Cry1Aa, lepdóptera-específica, em sua forma ativada (~65kDa), usando cristalografia com raios X, com uma resolução de 2,25 A°, e verificaram que se tratava de uma molécula globular, composta por três domínios distintos: domínio I, formado por um feixe de oito hélices antiparalelas, com a hélice central (α5) relativamente hidrófoba, rodeada por hélices anfipáticas; domínio II, constituído por tr[illegible] folhas β antiparalelas e duas α-hélices curtas; e o domínio III, que consiste de um β-sanduíche, composto por duas folhas β antiparalelas, altamente enoveladas (Figura 3).

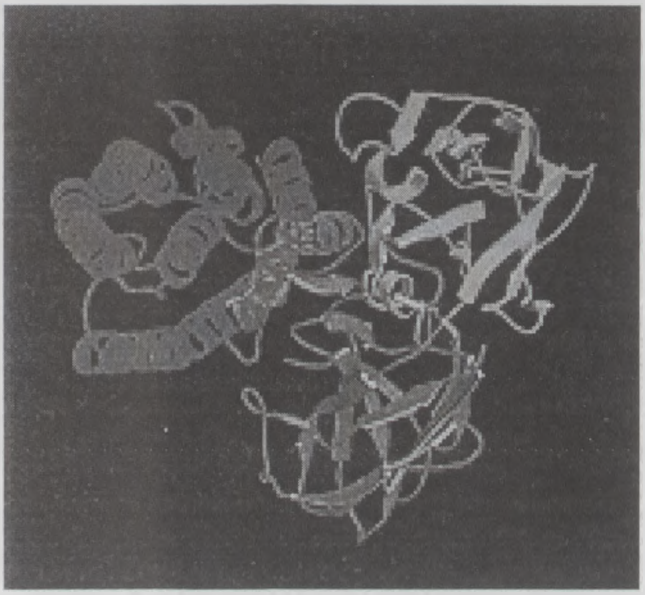


FIGURA 3. Representação tridimensional da molécula Cry 1Aa (a). O domínio I está representado pela cor verde; o domínio II, figura em ciano; e o domínio III está mostrado em amarelo. Os domínios II e III acumulam-se no mesmo lado do domínio I, junto a hélice $\alpha 7$, mostrada em magenta. (Reproduzido com permissão de Grochulski et al., 1995)

Grochulski et al. (1995), ao compararem a estrutura desta toxina com a da Cry3A, conforme esperado, constataram elevada similaridade global com ambas as proteínas constituídas por três domínios que apresentam o mesmo enovelamento topológico. No entanto, esta similaridade varia entre os domínios, sendo que a maior foi observada no domínio III, característica que provavelmente não se limita, exclusivamente, a estas duas toxinas, sendo esperada na maioria das toxinas Cry. Tal fato sugere que este domínio desempenha uma importante, mas ainda desconhecida, função na ação tóxica. Uma diferença estrutural significante, entre a toxina lepidóptera-específica Cry1Aa e a coleóptera-específica Cry3A, foi observada no domínio II, o que suporta as conclusões de estudos genéticos de que esta região está envolvida no reconhecimento e ligação a receptores específicos da superfície celular.

Recentemente, Dean et al. (1996) baseados em experimentos de mutagênese sítio-específica, analisaram a função de cada um dos domínios das toxinas

Cry de *Bt*. Segundo os autores, ambos os domínios II e III estariam envolvidos na ligação a receptores: a toxina ativada ligar-se-ia ao receptor pelas alças existentes no domínio II, enquanto que, no caso do domínio III, uma região estaria especificamente relacionada à ligação inicial a receptores, mas ainda não foi identificada. Os domínios I e III – e possivelmente o domínio II – estariam envolvidos na inserção da toxina na membrana apical de células epiteliais do intestino médio.

Segundo Li et al. (1991), o domínio I poderia ser o responsável pela formação de poros líticos no epitélio intestinal do organismo alvo. Em função da similaridade existente entre este domínio das toxinas Cry e os formadores de poros de várias outras toxinas protéicas de bactérias – como por exemplo, a colicina A e a toxina da difteria – foi proposto o modelo em "guarda-chuva" para a inserção das toxinas de *Bt* na membrana plasmática, baseado na estrutura da toxina Cry3A. Neste modelo, a formação do poro é iniciada pelas hélices α4 e α5 que se inserem na membrana como um grampo helicoidal, enquanto o restante do domínio I nivela-se com a superfície da membrana, com as faces hidrofóbicas de suas outras hélices próximas à membrana (Schnepf et al., 1998; Knowles, 1994).

Outro modelo, denominado de "canivete", foi proposto por Hodgman & Ellar (1990) para a formação de poros. Nele, as hélices altamente hidrofóbicas α5 e α6, as quais são unidas através de uma alça na extremidade da estrutura do domínio I, abrir-se-iam como um canivete, inserindo-se na membrana. O restante da molécula permaneceria na superfície da membrana, ou sobre o receptor (Schnepf et al., 1998; Knowles, 1994).

Com relação à proteína citolítica Cyt1A, o modelo estrutural proposto baseia-se na sua identidade na seqüência de aminoácidos (39%) e similaridade (70%) com um segundo membro da família Cyt, a Cyt2A (Knowles, 1994; Koni & Ellar, 1994; Koni & Ellar, 1993).

A δ-endotoxina Cyt2A, a qual é encontrada em inclusões para-esporais de *Bacillus thuringiensis* sorovar *kyushuensis*, é uma proteína de domínio único, de arquitetura α/β, porém apresentando uma topologia incomum, que consiste de duas camadas externas de grampos α-hélice, enroladas ao redor de folhas β combinadas. Acredita-se que as fitas β5, β6 e β7 – as quais exibem um caráter anfifílico e são

suficientemente longas para atravessar a zona hidrofóbica da bicamada – sejam responsáveis pela ligação e formação de poros na membrana celular do inseto. As α-hélices de Cyt2A, apesar de apresentarem caráter anfifílico, são curtas, o que as torna inadequadas para exercer tais funções (Li et al., 1996). Esta toxina, Cyt2A, apresenta atividade mosquitocida, sendo amplamente citolítica in vitro; na sua forma não processada, existe como um dímero, o qual se mantém unido pelo entrelaçamento do braço N-terminal de suas subunidades (Li et al., 1996) (Figura 4).

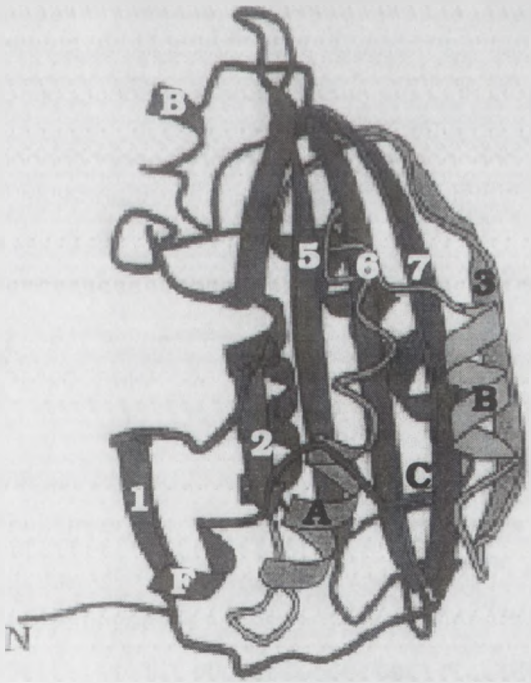


FIGURA 4. Estrutura global do monômero Cyt 2A. Diagrama em fita, mostrando que as camadas helicoidais são feitas de dobras em grampo, e que uma fita na folha β é composta por dois fragmentos não contíguos (β2 e β4), com sentidos opostos. A seqüência peptídica segue a ordem do arco-íris, indo do vermelho, na região N-terminal, ao magenta, na fração C-terminal. O par de hélices A-B precede o par de hélices C-D, o qual, por sua vez, precede as fitas internas da folha. No espaço entre β1 e β2, insere-se a equivalente fita β1 de outro monômero, a fim de formar a folha dimérica. (Reproduzido com permissão de Li et al., 1996)

MODO DE AÇÃO DAS TOXINAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

Toxinas Cry

As inclusões cristalinas sintetizadas pelo *Bt*, após ingestão por larvas de insetos susceptíveis, são solubilizadas no intestino médio, liberando uma ou mais proteínas chamadas de δ-endotoxinas. O intestino médio da maioria dos insetos-alvo apresenta um pH muito elevado, o que é essencial para promover a dissolução da maioria das protoxinas de *Bt*, as quais são usualmente solúveis somente acima de pH 9,5. No caso específico de *Bti*, as proteínas Cry4A, Cry4B e Cyt1A, são solúveis em pH 9,5 , enquanto a Cry11A requer um pH de 12. Supõe-se que as condições alcalinas do intestino médio do inseto promovam a solubilização das protoxinas pela destruição das ligações iônicas entre as subunidades, e que as condições redutoras, existentes no intestino médio de muitos insetos susceptíveis, poderiam promover o rompimento de pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína, contribuindo para a solubilidade. Um único cristal pode conter um milhão de subunidades de proteínas, mantidas juntas por distorcidas e instáveis pontes dissulfeto intercadeias. Assim, a clivagem destas ligações é considerada uma etapa crítica na solubilização do cristal (Du & Nickerson, 1996; Du et al., 1994; Cooper, 1994; Knowles & Dow, 1993; Gill et al., 1992; Li et al., 1991).

Estas proteínas (protoxinas) são proteoliticamente convertidas em polipeptídeos tóxicos menores, através de proteases do intestino médio das larvas. Por exemplo, no intestino médio de larvas de mosquitos, cujo pH varia de 7,5 a 10, têm sido detectadas proteases como a tripsina e a quimotripsina. Como resultado, fragmentos tóxicos protease-resistentes contendo o domínio N-terminal das protoxinas são liberados.

As toxinas de *Bti*, após ativação por proteases do intestino médio, ligam-se a receptores específicos localizados nas vilosidades apicais das membranas das células colunares do intestino (BBMV) do inseto (Gill et al., 1992; Höfte & Whiteley, 1989).

A especificidade das toxinas de *Bti* ao inseto-alvo está freqüentemente correlacionada à especificidade de ligação a estes receptores, uma vez que se tem

verificado a existência de sítios de ligação de alta afinidade no epitélio do intestino médio de insetos susceptíveis. A afinidade é medida pela constante de dissociação (Kd), e quanto maior for o seu valor, menor será a afinidade da toxina aos sítios de ligação. A maioria das toxinas Cry tem valores de Kd variando de 0,5 a 50nm, para sítios de ligação (receptores) presentes em concentrações (Rt) de 2 a 40pmol/mg de proteína de membrana. Alguns estudos demonstram que a atividade inseticida das toxinas Cry parece estar relacionada à concentração destes sítios de ligação, ao invés de ser determinada por diferenças na afinidade da toxina ao receptor, sendo observada maior toxicidade em função da presença de um número maior de receptores (Nielsen-Leroux, 1996; Honée & Visser, 1993; Van Rie et al., 1990; Van Rie et al., 1989; Hofman et al., 1988).

Após a ligação a receptores específicos, a toxina insere-se rápida e irreversivelmente na membrana plasmática de células do intestino, com a subseqüente abertura ou formação de canais cátion-seletivos ou poros, havendo assim um desequilíbrio osmótico, ocasionado pela perda da integridade da membrana. Tais eventos conduzem à lise celular e, finalmente, à morte do inseto por inanição ou septicemia (Kumar et al., 1996; Lee et al., 1996; Dai & Gill, 1993; Honée & Visser, 1993; Knowles & Dow, 1993; Gill et al., 1992).

Toxina citolítica

Considera-se que a toxina Cyt1A atue, basicamente, através de um mecanismo similar ao das toxinas Cry, diferindo, porém, nos componentes da membrana celular que são requeridos para o estágio inicial da interação entre estas toxinas citolíticas e a membrana celular. Enquanto as proteínas Cry ligam-se, inicialmente, a glicoproteínas existentes nas microvilosidades da membrana, a afinidade primária da Cyt1A é para os componentes lipídicos da membrana, especificamente para ácidos graxos insaturados (Wirth et al., 1997; Gill et al., 1992; Haider & Ellar, 1989).

Após a ligação inicial da toxina, a etapa subseqüente consiste na sua inserção na membrana celular. Uma vez que a toxina é inserida, ocorre a agregação das moléculas de Cyt1A na bicamada lipídica da membrana celular, embora a

oligomerização possa ocorrer antes da inserção da toxina citolítica (Gill, 1995; Gill et al., 1992).

Chow et al. (1989) sugeriram que a formação de oligômeros aparentemente contribui para a toxicidade por dois mecanismos diferentes. Primeiro, por facilitar o aumento da ligação à toxina e, desse modo, acelerar a ação citolítica observada; segundo, os poros funcionais parecem ser gerados somente quando os agregados de um tamanho apropriado são formados. Estes autores presumiram, ainda, que a oligomerização é supostamente essencial para a lise celular, visto que a agregação ocorre em uma etapa anterior à lise.

Recentes resultados sugerem que, embora possa ocorrer a inserção na membrana independente de receptor sob elevadas condições de pH e concentração de toxina, um receptor específico pode ser essencial para a toxina Cyt1A ser ativa *in vivo* (Knowles, 1994; Koni & Ellar, 1993). Ele poderia orientar a molécula na superfície hidrofóbica da membrana, antes de ocorrer a penetração da toxina na bicamada lipídica hidrófoba (Chilcott et al., 1990). Estudos utilizando anticorpos monoplanos mostraram que a toxina Cyt1A é capaz de se ligar a quase todas as regiões do intestino médio, sendo que, na presença das δ-endotoxinas Cry de *Bti*, a ligação parece ser direcionada para as regiões do intestino médio, nas quais as toxinas Cry se ligam de modo específico (Li et al., 1996; Ravoahangimalala & Charles, 1995; Ravoahangimalala et al., 1993).

Knowles & Ellar (1987) propuseram uma teoria para o mecanismo de ação da toxina citolítica de *Bti*. Trata-se de um modelo em duas etapas, no qual após ligar-se a fosfolipídeos insaturados na membrana celular, a toxina gera pequenos orifícios ou poros na membrana de células susceptíveis – seja diretamente, por inserção na membrana, ou indiretamente, por perturbação de moléculas existentes na bicamada lipídica. A criação destes poros conduziria à lise colóide-osmótica: o equilíbrio de íons através destes orifícios promoveria um influxo de água acompanhando estes íons, resultando em entumescimento celular, o que ocasionaria o rompimento da integridade da membrana, e eventual lise.

De acordo ainda com esta teoria, inicialmente os orifícios induzidos pela toxina seriam muito pequenos, sendo impermeáveis a macromoléculas intracelulares.

No entanto, como conseqüência do entumescimento osmótico, ocorreria o evento secundário de alargamento destes orifícios ou a geração de novos poros, o que possibilitaria o progressivo escoamento de moléculas maiores.

Os experimentos realizados por Knowles & Ellar (1987), sugerem um poro de raio de 0,6 a 1,0nm para a toxina citolítica de *Bti* .

COMPOSIÇÃO DO CRISTAL PROTÉICO DE *BACILLUS SPHAERICUS*

Algumas cepas de *Bs* sintetizam estruturas poliédricas ordenadas, conhecidas como corpos paraesporais ou cristais, que contêm proteínas tóxicas para larvas de uma variedade de mosquitos. O maior componente do cristal é uma toxina binária composta por duas proteínas distintas de 51,4 e 41,9kDa, denominadas de P51 e P42, respectivamente, sintetizadas em quantidades eqüimoleculares (Charles et al., 1996; Porter, 1996).

O *Bs* produz ainda três toxinas adicionais, com massa molecular de 100, 31,8 e 35,8kDa, designadas como Mtx, Mtx2 e Mtx3, respectivamente, não tendo sido constatada significante homologia entre estas toxinas e a toxina binária. Estas Mtx toxinas (toxinas mosquitocidas) são sintetizadas durante a fase de crescimento vegetativo e não se acumulam como cristais. Não se sabe, ao certo, se tais toxinas estão localizadas em algum compartimento na célula ou se estariam dispersas no citoplasma (Thanabalu & Porter, 1996; Yousten, 1996; Charles et al., 1996; Porter, 1996; Liu et al., 1993; Baumann et al., 1991; Baumann et al., 1988).

As cepas de *Bs* que sintetizam a toxina binária são extremamente tóxicas, apresentando um espectro de ação altamente específico contra larvas de mosquitos, sendo que as espécies mais susceptíveis pertencem aos gêneros *Culex* e *Anopheles*. Tais cepas podem também produzir as toxinas Mtx, sendo que estas, no entanto, não são as principais responsáveis pela atividade larvicida. Cepas consideradas fracamente tóxicas produzem apenas as toxinas Mtx. Estudos realizados sugerem que a baixa toxicidade destas cepas poderia ser atribuída à fraca expressão e/ou ao baixo nível de estabilidade da toxina durante a esporulação, mais do que à ineficácia inerente da própria toxina de 100kDa (Rippere et al., 1997; Priest & de Muro, 1996; Yousten, 1996; Davidson, 1995; Berry, 1994).

Algumas investigações foram feitas, a fim de estabelecer qual a função desempenhada por cada um dos componentes da toxina binária, na atividade larvicida. Dentre estas, destacam-se os estudos de ligação *in vivo* realizados por Oei et al. (1992), em larvas de *Culex quinquefasciatus*, usando as proteínas P51 e P42, separadamente. Os autores propuseram, com base nas suas observações, que a proteína P51 atuaria como o componente de ligação da toxina binária, dirigindo a ligação da proteína P42 aos sítios de citopatogenicidade do intestino das larvas susceptíveis, isto é, ao intestino médio posterior e ao ceco gástrico, em um padrão de ligação referido como ligação regional. A proteína P42 seria o componente ativo da toxina binária, após a interiorização. Tais observações fizeram ainda com que os autores atribuíssem a especificidade da toxina binária à afinidade entre a proteína P51 e o suposto receptor, presente no intestino da larva.

Como conseqüência dos estudos realizados, os quais indicam que, possivelmente, o componente P42 é a molécula tóxica (ativa), e que P51 é o componente de ligação, foi sugerida a hipótese de que as toxinas cristalinas de *Bs* atuem pelo mecanismo "A/B" – "A", componente ativo; "B", componente de ligação – o qual é exibido por toxinas produzidas por patógenos de mamíferos, tais como a toxina da cólera (Charles et al., 1996; Nielsen-Leroux, 1996; Davidson, 1995).

MODO DE AÇÃO DAS TOXINAS DE *BACILLUS SPHAERICUS*

Toxina binária

Após ingestão do complexo esporo-cristal por larvas de mosquitos susceptíveis, ocorre a rápida solubilização da matriz do corpo paraesporal, no pH altamente alcalino do intestino médio. Subseqüentemente, a toxina binária é proteoliticamente clivada a peptídeos ativos menores; a proteína de 51,4kDa é rapidamente convertida a uma proteína estável de 43kDa, enquanto a proteína de 41,9kDa é processada a um fragmento de cerca de 39kDa. Estes polipeptídeos, separadamente ou em associação, atravessam a membrana peritrófica e ligam-se a receptores específicos nas microvilosidades apicais da membrana das células epiteliais, nas regiões do ceco gástrico e intestino médio posterior. Em seguida, verifica-se a

interiorização de ambas as toxinas, promovendo a toxicidade por um mecanismo desconhecido, que induz o aparecimento de áreas de baixa densidade eletrônica, devido ao surgimento de grandes citolisossomos ou vacúolos nas células epiteliais do intestino, havendo expansão mitocondrial e posterior lise celular. Durante o período de intoxicação, os indivíduos tratados apresentam sintomas como a interrupção da alimentação, tremores e dificuldades de locomoção. Trata-se de um processo de ação lento e gradual, com morte do inseto ocorrendo entre 4-48h, dependendo da dose ingerida (Charles et al., 1996; Nielsen-Leroux, 1996; Davidson, 1995; Porter et al., 1993; Priest, 1992; Baumann et al., 1991; Sing & Gill, 1988).

Toxinas mosquitocidas Mtx, Mtx2 e Mtx3

A proteína Mtx (100kDa) compartilha significantes seqüências de homologia regional com as subunidades catalíticas de várias toxinas ADP-ribosilantes, tais como a subunidade S1 da toxina da coqueluche e a subunidade A (ativa) da cólera e toxinas termolábeis de *Escherichia coli,* assim como uma outra curta região com homologia à exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* e com a subunidade A, da toxina de difteria. A homologia com estas toxinas bacterianas fortemente sugere que a toxina de 100kDa atue por ADP-ribosilação de proteínas celulares, inativando-as (Davidson, 1995; Berry, 1994; Thanabalu et al., 1993; Porter et al., 1993).

As toxinas de 31,8kDa (Mtx2) e 35,8kDa (Mtx3) exibem limitada, porém significante homologia com a enterotoxina de 35kDa, de *Clostridium perfringens* e, em menor extensão, com a citotoxina de 31,69kDa de *Pseudomonas aeruginosa*, as quais têm atuação específica em células de mamíferos (Thanabalu & Porter, 1996; Porter, 1996; Liu et al., 1996). Estas toxinas bacterianas induzem a formação de poros na superfície celular, conduzindo ao influxo de água devido à perda do equilíbrio osmótico. Em função da similaridade existente entre estas toxinas e as toxinas Mtx2 e Mtx3, acredita-se que ambas atuem por mecanismo de ação semelhante (Thanabalu & Porter, 1996; Liu et al., 1996; Porter, 1996).

PRINCIPAIS DOENÇAS TROPICAIS CUJOS AGENTES DE TRANSMISSÃO SÃO PASSÍVEIS DE CONTROLE BIOLÓGICO POR *BACILLUS*

Dengue

Dengue é uma doença cujo agente infeccioso é um arbovírus (vírus assim denominado por ser transmitido por inseto), do Gênero *Flavivirus*, Família Togaviridae, do qual são conhecidos quatro diferentes sorotipos: Den 1, Den 2, Den 3 e Den 4 (FNS, 1998; Nobre et al., 1994). Embora todos os sorotipos possam estimular a formação de anticorpos grupo e tipo específicos, a imunidade induzida por um tipo é apenas parcialmente protetora contra outro tipo. O homem parece ser o reservatório do vírus da dengue, embora este já tenha sido também isolado de macacos, naturalmente infectados, que poderiam ter um papel num eventual ciclo silvestre da doença, a exemplo da febre amarela (Nobre et al., 1994).

Clinicamente pode se apresentar sob duas formas: dengue clássica e dengue hemorrágica ou febre hemorrágica da dengue (FHD). Febre alta, dores musculares e articulares, dor de cabeça e atrás dos olhos, perda de apetite, náuseas, vômitos e prostração, são sintomas comuns às duas formas de dengue, além de manchas vermelhas na pele, podendo assim confundir-se com o sarampo e a rubéola. A dengue hemorrágica diferencia-se da clássica pela sua evolução, que se dá pela tendência a hemorragias, dores abdominais intensas, palidez cutânea, pele pegajosa e fria, agitação, sonolência, dificuldade respiratória, pulso rápido e fraco, podendo levar o paciente ao choque e à morte (FNS, 1998) .

A dengue é a virose urbana mais difundida pelo mundo, ocorrendo em todos os continentes, com exceção da Europa, sendo típica de áreas tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais favorecem o desenvolvimento do mosquito transmissor, o *Aedes aegypti*, considerado seu principal vetor. Entre outros vetores de menor importância epidemiológica estaria o *Aedes albopictus*, até o momento nunca encontrado infectado na natureza nas Américas, embora considerado o vetor original da dengue. Nativo de regiões asiáticas, opera como vetor rural da doença, podendo ocorrer também em áreas urbanas, principalmente se o *A. aegypti* estiver ausente, com hábitos alimentares semelhantes a este (FNS, 1998; Nobre et al., 1994).

Existe alguma discussão em torno da hipótese de que o *A. aegypti* estaria tomando o lugar do *A. albopictus* em diversas regiões na Ásia e que o aumento da ocorrência de febre amarela e dengue, desde 1950, estaria relacionado a esta mudança (Luft, 1996).

O vírus da dengue não afeta o mosquito de nenhuma forma, mas um período de incubação de 8 a 11 dias é necessário para que ele se torne infectante e, uma vez infectado, assim permanece o resto da vida (de 15 a 65 dias) (Luft, 1996; Nobre et al., 1994). Ainda não se sabe com certeza os fatores determinantes do aparecimento de formas clínicas graves da dengue. É possível que esteja relacionado com a maior virulência de determinadas cepas do vírus, mas a hipótese mais aceita é a de que a febre hemorrágica do dengue seja causada pela exposição seqüencial a diferentes sorotipos. O período de viremia da dengue é de 7 a 8 dias após o aparecimento dos sintomas e o período de incubação da doença é de 4 a 5 dias (Nobre et al., 1994).

A transmissão ocorre de uma pessoa doente para uma sadia, apenas através da picada do mosquito fêmea. O mosquito macho alimenta-se apenas de seiva de plantas e por isso não é transmissor. A fêmea do *Aedes aegypti* tem hábitos diurnos, picando sempre ao amanhecer ou entardecer, atacando preferencialmente no ambiente doméstico ou peridoméstico, pois os criadouros encontram-se, em geral, dentro das próprias casas ou em seus arredores. Todo lugar onde exista água parada e limpa ou recipientes que acumulem água, como vasos de plantas, pneus velhos, latas, garrafas, caixas d'água, cisternas e latões, são criadouros em potencial, locais onde as fêmeas podem vir a colocar seus ovos, de onde surgirão as larvas de mosquitos. Estas larvas se desenvolverão por aproximadamente uma semana na água, passarão por um estágio denominado pupa, que durará de um a dois dias, surgindo então a forma adulta e alada do mosquito (FNS, 1998).

O *Aedes aegypti* é um mosquito pequeno, escuro, com desenho prateado no dorso, em forma de lira, e com listras nas patas, podendo viver de um a dois meses (Figura 5). Os locais preferidos para seu abrigo são armários e lugares escuros dentro das casas e, no ambiente externo, a preferência é por lugares frescos e sombreados (FNS, 1998).

FIGURA 5. *Aedes aegypti*, mosquito transmissor da dengue
Foto cedida por Genilton José Vieira, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

O *Aedes aegypti* havia sido erradicado do país em 1955, após uma longa e árdua luta de Oswaldo Cruz, Clementino Fraga, Fred L. Soaper, Emílio Ribas, entre outros. Uma reinfestação ocorreu em 1967, nos Estados do Pará e Maranhão, mas foi eliminada dois anos depois. Vários focos foram detectados em diferentes pontos do território, mas debelados rapidamente. Em 1976, no entanto, a partir de um foco na cidade de Salvador (Bahia), o país foi inexoravelmente reinfestado pelo *Aedes aegypti*, que está hoje presente na maioria dos Estados brasileiros. Em 1986 foi introduzido no país o *A. albopictus*, vetor em potencial da febre amarela e da dengue, que em 1994 já havia se disseminado pelos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Maranhão e Bahia (Nobre et al., 1994).

Há registros de dengue no Brasil desde 1846, quando uma epidemia atingiu o Rio de Janeiro, São Paulo, Salvador e outras cidades. Esta epidemia durou dois anos e a doença na época era conhecida por outros nomes: polca, patuléia, febre eruptiva reumatiforme. Outra epidemia foi registrada de 1851 a 1853, em São Paulo. Em 1916, nova epidemia de dengue, confundida com gripe, foi diagnosticada em São

Paulo e na ocasião ganhou o curioso nome de Urucubaca. Em 1923, foi publicado um artigo em Brasil-Médico, sobre uma epidemia de dengue em Niterói, Rio de Janeiro. Somente em 1982, com uma epidemia em Boa Vista, Roraima, foi pela primeira vez isolado o vírus da dengue no país (sorotipos 1 e 4), também tendo sido esta a primeira epidemia documentada, clinica e laboratorialmente (FNS, 1998; Nobre et al., 1994).

Em 1986, a doença reapareceu de forma epidêmica em três Estados, Ceará, Alagoas e Rio de Janeiro, neste último atingindo mais de um milhão de pessoas, com casos também na Bahia, Minas Gerais, Pernambuco, São Paulo e Mato Grosso do Sul. De 1986 até 1989, apenas o sorotipo Den 1 foi detectado como responsável pelos surtos e epidemias de dengue que ocorreram em São Paulo, Minas Gerais, Ceará, Alagoas, Bahia, Pernambuco e Rio de Janeiro (FNS, 1998; Nobre et al., 1994).

Em 1990 surgiram os primeiros casos de dengue hemorrágico no Rio de Janeiro, com a introdução de um novo sorotipo, o Den 2, infectando pessoas que já haviam contraído a doença anteriormente. A disseminação deste novo sorotipo por diversas regiões do país causou o aparecimento de casos de dengue hemorrágico em outros Estados: Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais, Sergipe, Rio Grande do Norte e Pernambuco. De 1990 a 1998 foram confirmados, em todo o Brasil, 718 casos que levaram à ocorrência de 27 óbitos (FNS, 1998; Nobre et al., 1994).

O maior número de casos de dengue são sempre registrados no período das chuvas, quando as condições ambientais são propícias ao desenvolvimento e proliferação do mosquito vetor. A partir de 1994 as epidemias têm apresentado maior vulto, espalhando-se para todas as regiões geográficas do país (Tabela 4).

TABELA 4. Evolução dos casos de dengue no Brasil de 1995 a 1997 *

	1995	1996	1997
Nº total de casos no país	128.619	183.466	254.939
Nº de Estados afetados	18	20	21
Nº total de casos de Febre Hemorrágica do Dengue / Óbitos	112/2	69/ -	36/5

* Fonte: FNS (1998)

No ano de 1998, até o mês de maio, segundo dados da Fundação Nacional de Saúde (Boletim Epidemiológico), já haviam sido registrados 358.888 casos de dengue em todo o Brasil, a maioria notificada em regiões metropolitanas das 22 unidades federadas (Tabela 5). Na Região Sudeste ocorreram 57,02% dos casos, dos quais 63,2 % em Minas Gerais, com dois sorotipos circulantes, Den 1 e Den 2, assim como 18,67% no Espírito Santo, seguido por 13,64% no Rio de Janeiro, onde apenas o Den 1 foi detectado.

A segunda região mais atingida foi a Nordeste, com 33,57% dos casos, sendo 29,83% no Estado da Paraíba, sem informações sobre os sorotipos, 17,36% em Sergipe e 14,48% Pernambuco. Nestes dois últimos Estados, os dois sorotipos, Den 1 Den 2, encontravam-se circulantes.

O menor número de casos notificados ocorrem na Região Sul, 0,59% do total no país, todos no Estado do Paraná, sendo a maioria no município de Foz do Iguaçu.

Quanto à Região Norte (5,52% dos casos), nos Estados de Rondônia, Acre e Amapá, não há registros da doença e o primeiro caso autóctone no Estado do Amazonas ocorreu em março de 1998, tendo sido registrados, desde então, outros casos, especialmente em Manaus.

No Centro-Oeste a incidência também é baixa, com a maioria dos casos (45%), ocorrendo em Mato Grosso.

TABELA 5. Casos de dengue notificados no Brasil, ano de 1998, até o mês de maio, por região geográfica e nos respectivos Estados *

	Número de casos
Região Norte	**19.815**
Amazonas	9.525
Roraima	112
Pará	9.135
Tocantins	1.043
Região Nordeste	**120.487**
Maranhão	9.607
Piauí	13.396
Ceará	2.686
Rio Grande do Norte	10.341
Paraíba	35.943
Pernambuco	17.445
Alagoas	5.184
Sergipe	20.914
Bahia	4.971
Região Sudeste	**204.630**
Minas Gerais	129.327
Espírito Santo	38.209
Rio de Janeiro	27.916
São Paulo	9.178
Região Sul	**2.128**
Paraná	2.128
Região Centro-Oeste	**11.828**
Mato Grosso do Sul	1.799
Mato Grosso	5.323
Goiás	3.243
Distrito Federal	1.463
Total	**358.888**

* Fonte: CENEPI (1998)

A disseminação da dengue no mundo pode ser atribuída a vários fatores, dentre eles, o aumento da densidade populacional acompanhada de urbanização desordenada, principalmente nas metrópoles, ausência de infra-estrutura básica de saneamento, levando pessoas a armazenarem água para utilização doméstica, inadequado sistema de coleta de lixo, insuficiência de recursos financeiros e de pessoal para combate ao mosquito vetor, pouco conhecimento da doença e dos meios para prevení-la por parte da população. Outros fatores que contribuíram para a disseminação do vírus, são a intensificação dos movimentos migratórios e das trocas comerciais entre países, o aumento da produção de recipientes descartáveis, maior freqüência de viagens, maior rapidez dos meios de transporte, levando à dispersão do mosquito a lugares cada vez mais distantes e a resistência dos mosquitos aos inseticidas químicos convencionais (FNS, 1998).

Não existindo vacina contra a dengue, a garantia de não haver doença é não haver mosquito, portanto, medidas preventivas individuais e coletivas para seu controle, adotadas pelas instituições públicas e também pela população, em geral são imprescindíveis.

As medidas de controle geralmente utilizadas nos programas oficiais para o controle da dengue e prevenção da febre amarela urbana buscam reduzir a intensidade da infestação do *A.* aegypti e mantê-la a mais baixa possível, nos períodos interepidêmicos, por meio da redução dos criadouros, da eliminação de inservíveis (latas, pneus usados e outros recipientes semelhantes) e através da aplicação de larvicida nos depósitos de água de consumo (Nobre et al., 1994). O Plano Nacional de Erradicação do *A. aegypti* do Ministério da Saúde, de 1996, previa, entre outras medidas de controle larvar, a adoção de inseticida à base de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* (Rabinovitch 1997). Nos períodos epidêmicos, associa-se ao método focal a aplicação espacial de inseticida organofosforado ou piretróide para a redução das formas adultas dos mosquitos, as quais estão ou podem vir a ficar infectadas e transmitir a doença. Estas medidas precisam contar com a participação da população para terem eficácia, o que pode ser alcançado com a educação sanitária e comunicação social intensas por todos os meios possíveis. A melhoria das condições de saneamento básico, principalmente o adequado abastecimento de água, poderia reduzir

significativamente o uso de larvicida, na medida em que dispensa o acúmulo de água em depósitos improvisados. A adoção de certos hábitos, como a troca de água de vasos de plantas, manutenção de caixas d'água e outros depósitos cobertos, a limpeza de quintais com a remoção de recipientes que possam acumular água e a manutenção de pneus usados sob proteção das chuvas, por exemplo, são algumas medidas úteis para reduzir a infestação de *A. aegypti* (Nobre et al., 1994).

Febre amarela

A febre amarela é uma doença febril aguda cujo agente etiológico é um arbovírus do Gênero *Flavivirus* (antigo grupo B) da Família Togaviridae, considerada endêmica nas regiões tropicais das Américas e África. É transmitida por algumas espécies de mosquitos, do macaco para o homem e do homem para outro homem. Epidemiologicamente existem duas formas de febre amarela: a urbana e a silvestre, ambas idênticas do ponto de vista etiológico, clínico, imunológico e histopatológico (Nobre et al., 1994).

O ciclo silvestre, nas Américas, é mantido pela circulação do vírus entre macacos e, possivelmente, entre alguns marsupiais e mosquitos do Gênero *Haemagogus*, principalmente. O homem não imunizado, ao penetrar em regiões de mata, pode contrair a doença se picado por mosquito infectado. Já o ciclo urbano é mantido pela transmissão do vírus do homem doente ao homem sadio, por meio da picada do mosquito *Aedes aegypti*. Em 1979, foi demonstrada a transmissão transovariana do mosquito, ou seja, uma vez infectado, supõe-se que ele assim permaneça por toda a vida, tornando-se infectante após um período que varia de 9 a 30 dias após a aquisição do vírus. O *Aedes albopictus* é também susceptível à infecção pelo vírus amarílico em laboratório, porém nunca foi encontrado infectado na natureza (Nobre et al., 1994).

As pessoas, após serem picadas por mosquitos infectados com o vírus da febre amarela têm um período de incubação da doença que varia de 3 a 6 dias. O período de viremia, por sua vez, estende-se desde um dia antes do aparecimento dos sintomas até 72 horas após o desaparecimento dos mesmos. Muitas pessoas desenvolvem apenas a forma branda da doença, que se caracteriza por febre e

indisposição por alguns dias. Cerca de 15% das pessoas infectadas, no entanto, desenvolvem a forma mais grave da febre amarela, que apresenta duas fases: uma fase aguda, de cerca de 3 dias, com súbito aparecimento de febre, dor de cabeça, mialgia, náuseas e vômitos; remissão por 24 horas; e uma fase tóxica, com aparecimento de icterícia, hematêmese, melena, podendo levar ao coma e à morte. Testes laboratoriais podem mostrar leucocitose, albuminúria, anormalidades nos testes das funções do fígado e o aumento do tempo de protrombina. A duração típica dos primeiros sintomas até a morte é de cerca de duas semanas e pelo menos metade dos indivíduos que atingem a fase tóxica não sobrevivem (Robertson et al., 1996; Nobre et al., 1994).

A primeira epidemia de febre amarela no Brasil deu-se em 1685, na cidade de Recife (Pernambuco), atingindo um ano depois também a Bahia, onde permaneceu até 1692 com alta taxa de letalidade. Não houve registros de epidemia durante o século 18. Em 1849 foi novamente registrada uma epidemia em Salvador (Bahia), propagando-se até 1861 também para o norte e o sul do país, atingindo 16 províncias, inclusive algumas situadas longe do litoral, como Goiás e Mato Grosso. No final de 1849, a febre amarela atingiu o Rio de Janeiro e de forma bastante grave, pois há registro de que em um só dia - 15 de março de 1850 - teriam morrido 120 pessoas pela doença. Em 1928 e 1929, nova epidemia foi registrada no Rio de Janeiro. Os últimos casos registrados de febre amarela urbana no Brasil foram notificados em Sena Madureira, no Acre, em 1942 (Nobre et al., 1994).

Em 1932 foi descrita uma epidemia sem a presença do mosquito vetor *A. aegypti*, o qual desde 1901 era considerado o único transmissor nas Américas. Ocorreu no Vale do Canaã, Espírito Santo, sendo esta a primeira vez que o ciclo silvestre da doença foi reconhecido (Nobre et al., 1994).

Ao contrário de outras febres virais hemorrágicas, existe uma excelente vacina contra a febre-amarela, que foi introduzida no país, em 1937, com vírus atenuado e que utiliza a cepa americana 17D, desprovida de neuro e viscerotropismo, sendo até hoje este o tipo de vacina em uso no Brasil. Esta vacina oferece altos níveis de proteção, garantindo imunidade por pelo menos dez anos e, provavelmente, até por toda a vida (Robertson et al., 1996; Nobre et al., 1994).

No Brasil, a área endêmica da febre amarela silvestre são as áreas rurais das regiões Norte, Centro-Oeste e pré-amazônica do Maranhão (Nobre et al., 1994). De 1930 a 1992, 898 casos foram reportados e 720 deles (80,1%) registrados nos Estados do Pará, Goiás e Mato Grosso. No mesmo período, casos esporádicos, com apenas 15 confirmados, ocorreram no Estado do Maranhão (1,6% do total no país) (Vasconcelos et al., 1997).

De 1993 a 1994, a febre amarela foi amplamente distribuída em Barra do Corda, Esperantinópolis, Mirador e Pastos Bons, municípios do Estado do Maranhão. Ao todo, noventa casos foram diagnosticados nesses dois anos no Estado do Maranhão, sendo 13 deles fatais, sugerindo a maior epidemia dos últimos 20 anos. Milhares de pessoas não imunizadas por falta de vacinação foram claramente a razão desta epidemia. Nenhuma campanha de vacinação havia sido feita na área afetada desde 1988, quando apenas 17,4% da população havia sido vacinada. As áreas epidêmicas eram, na maior parte, agrícolas e pecuárias (Vasconcelos et al., 1997).

Nesse período de epidemia no Maranhão, com alto nível de transmissão epizoótica do vírus, o principal vetor foi o *Haemagogus janthinomys*, o que foi considerado também o principal vetor da febre amarela silvestre no Brasil. No entanto, o vírus foi igualmente encontrado em *Sabethes chloropterus*, considerado um vetor secundário, o que costuma ocorrer em casos de nível alto de transmissão, assim como a ocorrência de uma grande população de macacos. (Vasconcelos et al., 1997).

Em 1997 houve 11 casos de febre amarela silvestre registrados no Brasil, todos no Estado do Pará. Em 1998, até o mês de maio, foram registrados 24 casos, sendo 21 no Pará, 2 no Amazonas e 1 no Mato Grosso (CENEPI, 1998).

Desde 1980 a febre amarela tem reemergido na África e América do Sul e, uma vez que o *A. aegypti* estabeleceu-se novamente em áreas urbanas destas regiões, existe sempre um temor de que a doença possa reaparecer de forma explosiva (Robertson et al., 1996).

Pacientes assintomáticos carregando o vírus podem ser uma fonte silenciosa de febre amarela em áreas onde o vetor urbano está presente em grande número. Casos de febre amarela podem ocorrer junto com casos de dengue e isto também deve ser considerado ao fazerem-se diagnósticos (Vasconcelos et al., 1997).

A área de circulação do vírus está aumentando e, portanto, a vacinação deve ser prioritária sempre que possível. Manter a vacinação sistemática da população considerada de risco contra a febre amarela seria a melhor forma de prevenir a forma urbana da doença e surtos epidêmicos da forma silvestre. Os grupos considerados de maior risco são adultos jovens e do sexo masculino, geralmente lavradores e motoristas (Robertson et al., 1996), e outros profissionais que circulam em áreas de mata. Por outro lado, o combate ao *A. aegypti*, principalmente realizado para evitar casos e epidemias de dengue nas cidades, deve também ser pensado como uma forma de prevenir o reaparecimento de casos de febre amarela urbana.

Malária

A malária ou paludismo continua sendo uma das mais importantes doenças parasitárias. No entanto, medidas de controle hoje adotadas, bem como medicamentos modernos, não fazem mais da malária um sinônimo de flagelo da humanidade, como outrora. É também conhecida como impaludismo, febre palustre, febre intermitente, febre terçã, febre quartã ou ainda popularmente, maleita, sezão, tremedeira, batedeira ou simplesmente febre (FNS, 1998).

Em 1993 estimava-se que cerca de 300 milhões de pessoas estariam infectadas com os parasitas causadores da malária, 90% destas vivendo na África tropical. Pelas estatísticas, ainda, o número de mortes previstas anualmente, naquele momento, era de 500 mil a 1,2 milhões, ocorrendo principalmente entre crianças africanas com idade inferior a cinco anos (TDR, 1993).

No Brasil, a malária humana é causada por uma das três espécies de parasitas protozoários do Gênero *Plasmodium* ou plasmódios: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*. Em áreas com elevada transmissão, coexistem o *P. falciparum* e o *P. vivax*, sendo freqüentemente detectada a associação destas espécies no exame sangüíneo de pacientes (FNS, 1998).

Os sintomas da malária são causados pelo desenvolvimento do parasita nas células vermelhas sangüíneas, sendo o principal a febre, com ciclo claro em todos os casos, menos para *P. falciparum*. A malária por *falciparum* é a mais perigosa forma da doença, resultando em complicações mais sérias, como anemia e malária

cerebral (TDR, 1993).

Sintomas inespecíficos, como cefaléia ocasional, náuseas, vômitos, astenia, fadiga, anorexia e febre ligeira, podem ser observados inicialmente em alguns pacientes vários dias antes do ataque agudo da malária, que se caracteriza por crises febris, com quatro períodos distintos e sucessivos: frio, calor, suor e ausência de febre (FNS, 1998).

O período de frio pode durar de 15 a 60 minutos e está relacionado com o aumento brusco da temperatura do corpo, causando frio intenso, calafrios com tremor generalizado e ranger de dentes, podendo ocorrer também cefaléia, náuseas e vômitos. Além disso, o pulso é débil e rápido, a pele seca e com rugas, os lábios cianóticos e sobretudo crianças podem apresentar crises convulsivas (FNS, 1998).

O período de calor dura de 2 a 6 horas. O paciente sente-se quente, sua face fica hiperêmica, o pulso forte e a pele seca e quente. A dor de cabeça, que geralmente surge na etapa anterior, aumenta de intensidade e náuseas e vômitos podem continuar. A temperatura pode alcançar 40° C ou mais e alguns pacientes chegam a delirar (FNS, 1998).

O período de suor dura de 2 a 4 horas. Nele, a febre diminui rapidamente e a cefaléia, a sede e o mal-estar cedem. Há uma sensação de alívio. Terminando o suor, o paciente sente-se cansado e débil e, livre dos sintomas, consegue ter um sono tranqüilo (FNS, 1998).

As formas clínicas da malária podem ser classificadas em leves, moderadas, graves e de urgência, dependendo da intensidade dos sintomas, do nível de parasitemia e do grau de anemia. A forma moderada é típica dos indivíduos não-imunes. As formas graves e de urgência, com raras exceções, são observadas nas infecções produzidas por *P. falciparum*. Se o paciente não receber terapêutica específica e adequada, a doença pode evoluir para a forma denominada de urgência, quando os sintomas são mais graves, aparecendo complicações sérias, relacionadas aos rins, pulmões, fígado, cérebro e sangue. A parasitemia é superior a 2%, podendo alcançar 30% ou mais; a anemia é intensa, com o paciente podendo apresentar uma redução de até 50% da taxa de hemoglobina (FNS, 1998).

Muitas pessoas infectadas estão parcialmente protegidas de complicações

pela imunidade concomitante, adquirida por infeções prévias e recentes. Complicações severas são encontradas quase que exclusivamente em não-imunes, notavelmente crianças pequenas, mulheres grávidas, imigrantes e trabalhadores migrantes que entram em áreas altamente endêmicas e também habitantes de áreas de endemicidade instável (TDR, 1993).

O homem é o mais importante reservatório da malária humana, embora macacos de espécies superiores também possam albergar o *P. malariae*. Na Amazônia foi detectada a presença de *P. brazilianum* e *P. simium*, morfologicamente semelhantes aos *P. malariae* e *P. vivax*, em macacos de pequeno e grande porte, respectivamente, mas a transmissão natural ao homem não foi comprovada (FNS, 1998).

Os transmissores da malária dos mamíferos são insetos da Ordem Díptera, Família Culicidae e Gênero *Anopheles*. Este gênero compreende cerca de 400 espécies, mas apenas um pequeno número tem importância para a epidemiologia da malária. No Brasil, cinco espécies são consideradas os principais vetores: *An. darlingi*, *An.. aquasalis*, *An. albitarsis*, *An. cruzi* e *An. bellator* (FNS, 1998). Segundo Deane (1986), o *An. darlingi* seria o mais importante vetor primário da malária em áreas do interior do país, do nordeste até o norte do Estado do Paraná. Já o *An. aquasalis* seria um vetor menos importante, transmitindo a doença ao longo da costa brasileira, desde a região Norte até o Estado de São Paulo. O *An. cruzi*, *An. bellator* e também o *An. homunculus* seriam os responsáveis pela chamada malária das bromélias - praticamente erradicada - e os únicos vetores nos Estados do Sudeste, ao sul do paralelo 25°S. O *An. albitarsis*, por sua vez, presente apenas em áreas restritas, é considerado um vetor bem menos importante.

Os anofelinos medem em geral menos de 1cm de comprimento ou envergadura, têm corpo delgado, pernas longas, que lhe valeram em algumas regiões o nome de pernilongo. São também conhecidos como carapanã, muriçoca, sovela, mosquito-prego ou simplesmente mosquito (FNS, 1998).

A maioria possui hábitos crepusculares ou noturnos. Durante o dia refugiam-se da luz excessiva, vento, calor e inimigos naturais, em abrigos próximos aos criadouros - geralmente arbustos, lugares de vegetação densa, oco de árvores, espaço sob raízes, troncos caídos, grutas, buracos de animais, etc. (FNS, 1998).

Ao entardecer, as fêmeas buscam suas fontes alimentares: animais ou homens. Anofelinos que costumam penetrar nas habitações humanas participam mais ativamente da transmissão da malária do que espécies que permanecem de preferência no exterior (FNS, 1998).

Há os que penetram nas casas durante o crepúsculo vespertino e só se retiram ao amanhecer, escolhendo como esconderijo, por exemplo, roupas penduradas, parte traseira de móveis e quadros, partes baixas das paredes. Outros abandonam as casas logo depois de se alimentarem (FNS, 1998).

A endofilia ou domesticidade versus exofilia de determinadas espécies é um fator importante a ser conhecido e considerado no planejamento de seu controle, podendo determinar qual a melhor estratégia e tipo de inseticida a ser utilizado em cada caso.

O principal vetor no Brasil, *An. darlingi*, cria-se em grandes coleções de água, como represas, lagos, lagoas, remanso de rios, em águas profundas e límpidas, pobres de matéria orgânica. É endofílico e notavelmente antropófilo, picando homens de preferência a outros animais. Picando freqüentemente fora de casa, caracteriza a transmissão extradomiciliar da malária. É bastante susceptível à infecção pelos plasmódios, com taxas de parasitismo superiores a 20% no estômago (índice oocístico) e superiores a 55% nas glândulas salivares (índice esporozoítico) (FNS, 1998).

A doença se transmite pela fêmea anofelina infectante. O mosquito ingere sangue humano que contém os plasmódios em sua forma de gametócitos. Os gametócitos macho e fêmea se unem formando o oocineto que, por sua vez, apresenta diversas transformações em seu interior no prazo de 8 a 35 dias, dependendo da espécie de parasita e da temperatura a que está exposto o vetor, formando os esporozoítos. Estes se concentram nas glândulas salivares e são injetados no organismo humano cada vez que o mosquito se alimenta de sangue. A malária pode ser transmitida também por transfusão do sangue de pessoas infectadas (FNS, 1998).

O período de incubação é de 12 dias para *P. falciparum*, 14 dias para *P. vivax* e 30 dias para *P. malariae*. Com algumas cepas de *P. vivax*, em zonas temperadas ou subtropicais, pode haver período de incubação mais prolongado, de 8 a 10 meses. No caso de transmissão por transfusão, o período de incubação geralmente é breve,

variando de acordo com o número de parasitos contidos no sangue (FNS, 1998).

O homem infecta o mosquito quando circulam em seu sangue gametócitos infectantes em número suficiente para que o mosquito, ao sugá-lo, ingira gametócitos de ambos os sexos. Já o mosquito permanece infectante durante toda sua vida (FNS, 1998).

O tratamento da malária tem como objetivo principal a eliminação dos plasmódios do sangue, mas nas infecções por *P. vivax* e *P. malariae* é também necessário eliminar os plasmódios que se encontram no fígado, evitando recaídas após a cura clínica (FNS, 1998). Os antimálaricos normalmente utilizados são a cloroquina e quinina, considerados inclusive seguros para gestantes, com esquemas de tratamento diferenciados para cada um dos tipos de *Plasmodium*. Derivados da artemisina, uma nova droga, têm sido também utilizados em casos de infecções graves por *P. falciparum*, inclusive nos casos de cepas multirresistentes deste, predominantes em áreas de alto risco. No caso de infecções mistas, deve-se tratar a espécie que apresentar formas assexuadas e que estiver produzindo o ataque primário; nos casos de coexistirem anéis de *P. falciparum* e formas *de P. vivax*, o tratamento inicial deve ser dirigido para o *P. falciparum* (FNS, 1998; TDR, 1993).

O primeiro relato de malária no Brasil, feito por Gabriel Soares de Souza em "Noticia do Brasil", parece ter sido em 1587, com a menção da existência de febre terçã e quartã entre os índios Tupinambás. Realmente começou-se a dar atenção à doença, no final de 1870, quando milhares de nordestinos, escapando da seca e oriundos principalmente do Estado do Ceará, dirigiram-se para a região Amazônica em busca da riqueza que viria com a coleta de látex, durante o ciclo da borracha, e terminaram por adquirir a malária e muitos a morrer dela (Deane, 1986).

Alguns anos depois, em 1888, as mais importantes fazendas e áreas de plantio do sudeste brasileiro, como as planícies costeiras do Rio de Janeiro, Baixada Fluminense e áreas similares de São Paulo, tornaram-se maláricas devido à deterioração da irrigação e sistemas de drenagem, como conseqüência do abandono das plantações pelos escravos, recém-libertados (Deane, 1986).

No início do século, uma outra grande epidemia ocorreu na região Amazônica durante a construção da ferrovia Madeira-Mamoré, como descrito por

Oswaldo Cruz e Carlos Chagas, ao visitarem a região, entre 1910 e 1913. Naquele momento, além dos nordestinos, imigrantes de outros estados brasileiros e também estrangeiros foram vitimados pela doença (Deane, 1986).

Uma violenta epidemia ocorreu em 1930, desta vez nos Estados do Rio Grande do Norte e Ceará, devido à invasão desta área pelo *An. gambiae*, espécie não autóctone do continente americano (Nobre et al., 1994), que foi totalmente erradicada do país em 1940 (Deane, 1986).

Em meados dos anos 40, no Brasil, a prevalência de malária na região amazônica aumentou acentuadamente devido a uma nova massa migratória de mais de 50 mil nordestinos para as áreas de seringais, conseqüência do aumento das necessidades de borracha natural pelos aliados durante a guerra. Ao mesmo tempo, observava-se um nível alto de endemicidade também nos vales de rios não amazônicos, como o São Francisco e o Paraná, assim como na Baixada Fluminense e outras áreas, de forma que havia cerca de 4 a 5 milhões de casos estimados, anualmente, para uma população de então 55 milhões de pessoas, com mais de metade dos casos de malária fora da região amazônica (Deane, 1986).

Após uma eficiente campanha nacional anti-malária, a incidência da doença caiu para 52 mil casos confirmados em 1970, a maioria restrita à região amazônica. Depois disso, a região recebeu novas levas de imigrantes, desta vez vindos principalmente dos Estados do sudeste, levados por promessas de programas de desenvolvimento na área, e novamente houve aumento do número de casos de malária (Deane, 1986).

Em 1985 ocorreram cerca de 400 mil casos no país, quase todos na região amazônica, que compreendendo 51% do território brasileiro, abrigava somente 9% de seus habitantes, sendo também responsável por 90% dos casos autóctones registrados. A malária encontrava-se, então, praticamente erradicada de outras áreas do país (Deane, 1986).

A região amazônica será certamente uma das últimas áreas maláricas no hemisfério. Por estar sujeita a um processo de assentamento e exploração, que certamente continuará por longo tempo, a presença da doença nessa região parece inevitável (Marques, 1986).

Em 1995, na Amazônia, os Estados mais atingidos pela malária foram Mato Grosso, Pará, Rondônia e Amazonas (76,5% dos registros). As áreas de maior ocorrência foram as de garimpo (Mato Grosso, Pará), área de influência de rodovias, como a Transamazônica e a Cuiabá-Santarém, áreas de elevada incidência de *An. darlingi*, como em Rondônia, ou ainda, no Estado do Amazonas, áreas da periferia com abundância de vetores e que receberam fluxos populacionais procedentes de zonas rurais e lá se fixaram. Outras áreas consideradas de alto risco, com elevada transmissão eram o oeste de Roraima (garimpos e área Yanomami), vale do rio do Acre, vale do rio Jari, trechos da bacia do Juruá e a área de influência da rodovia Perimetral Norte, no Amapá. Nos Estados do Maranhão e no Tocantins, a transmissão apresentava-se menos intensa (FNS, 1998).

No ano de 1998, até o mês de maio, haviam sido registrados um total de 141.224 casos de malária no país, com 90,73% ocorrendo na região Norte, 5,81% na região nordeste e 3,3% na região Centro-Oeste. As regiões Sul e Sudeste apresentavam número de casos bem menor, correspondendo a 0,09% e 0,07% do total no país, respectivamente. A maior incidência é a de malária provocada por *P. vivax*, 77,29% das ocorrências. *P. falciparum*, o mais preocupante, foi o responsável por 21,74% das ocorrências, enquanto para *P. malariae*, o índice foi de apenas 0,23%. Casos de infecções mistas foram diagnosticadas em 0,74% do total de casos (Tabela 6).

TABELA 6. Casos de malária notificados no Brasil, ano de 1998, até o mês de maio, por região geográfica *

	Número de casos			
	Malária por *P. falciparum*	Malária por *P. vivax*	Malária por *P. malariae*	Malária por *P. falciparum* + *P. vivax*
Região Norte	27.663	99.210	311	943
Região Nordeste	1.526	6.618	6	56
Região Sudeste	16	76	-	1
Região Sul	19	109	1	1
Região Centro-Oeste	1.481	3.144	2	41
Total	**30.705**	**109.157**	**320**	**1.042**

* Fonte: CENEPI (1998)

O controle da malária, durante alguns anos, baseou-se principalmente na tentativa de erradicação do mosquito vetor. A experiência mostrou, no entanto, que o controle do mosquito nem sempre é possível, em áreas onde a doença é muito severa e onde a interrupção da transmissão não pode ser mantida. Ênfase passou a ser dada, então, ao diagnóstico precoce, tratamento com anti-maláricos eficazes e ao uso seletivo de medidas preventivas, incluindo aí o controle do vetor, onde ele pode ser mantido. Outras medidas adicionais de controle, como borrifações intradomiciliares, uso de espirais e mosquiteiros impregnados, teriam menos impacto, especialmente nas camadas mais pobres da população endêmica. No entanto, alguns estudos indicam que o uso de mosquiteiros impregnados pode ser eficaz na redução da mortalidade infantil em certas situações epidemiológicas (TDR, 1993).

O trabalho de controle do vetor na fase larvar ainda é considerado muito útil e pode ser implementado através de algumas medidas que visem à eliminação dos criadouros de *Anopheles*, como por exemplo, a retirada mecânica da vegetação aquática ao longo das margens dos riachos, uma vez que a vegetação favorece a deposição de ovos; drenagem para facilitar o escoamento das águas da chuva; construção de diques e canais para evitar águas estagnadas; retificação de cursos d'água e pequenos aterros (FNS, 1998; Marques, 1986).

O aparecimento de resistência a certas drogas no organismo humano é um sério problema. A cloroquina era a droga utilizada na África, mas a resistência espalhou-se em regiões endêmicas. Novas drogas vêm sendo desenvolvidas, mas também a resistência a algumas delas tem sido reportada em taxas alarmantes. O controle da malária continua realmente sendo um desafio, principalmente em áreas onde não há infra-estrutura adequada para cuidados com a Saúde Pública (TDR, 1993).

No Brasil, a estratégia geral de controle da malária está baseada em quatro pontos básicos: o diagnóstico imediato e o tratamento oportuno dos casos; o planejamento e a aplicação de medidas anti-vetoriais seletivas; a pronta detecção de epidemias para contê-las e a reavaliação regular da doença no país, incluindo os fatores ecológicos, sociais e econômicos que determinam sua incidência. No combate aos vetores, o programa utiliza produtos químicos para nebulizações e borrifações intradomiciliares, como organoclorados, organofosforados e piretróides. Tem-se

procurado, também, sempre que possível, coletar informações sobre os hábitos e a reprodução dos mosquitos locais, espécies prevalentes, sua densidade e infectividade, condições ecológicas e sazonais, bem como a resposta do mosquito e do parasito aos inseticidas e medicamentos, respectivamente (FNS, 1998).

Filariose linfática

A filariose linfática humana ocorre pelo parasitismo de helmintos Nematoda das espécies *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori*. É endêmica em várias regiões tropicais da Ásia, África e Américas, sendo sério problema de Saúde Pública na China, Índia, Indonésia e nas regiões leste, centro-oeste e oeste da África. Cerca de 800 milhões de pessoas vivem em áreas de risco e estima-se que 119 milhões no mundo sejam portadoras de filariose, 116 milhões infectados por *W. bancrofti*, 12,9 milhões por *B. malayi* ou *B. timori* (Rocha & Fontes, 1998).

A doença nas Américas é causada especificamente por *W. bancrofti*, provavelmente introduzida pelo tráfico de escravos africanos no período colonial (Rocha & Fontes, 1998; Coutinho et al., 1996). No Brasil, especificamente Pernambuco, por sua situação geográfica e política, foi a província que mais recebeu escravos durante o período de 1636-1645. Estima-se que 23.613 negros tenham entrado no Estado, oriundos das mais variadas regiões do continente africano (Coutinho et al., 1996). O parasito da filariose encontrou no país um bom vetor, o *Culex quinquefasciatus*, talvez o mais eficiente mosquito transmissor, assim como condições climáticas apropriadas, tendo então se adaptado e dispersado (Rocha & Fontes, 1998; Coutinho et al., 1996).

Os vermes adultos de *W. bancrofti* vivem nos linfonodos e vasos linfáticos e as microfilárias, formas embrionárias, são encontradas no sangue periférico humano. As microfilárias são ingeridas por insetos vetores, no momento do repasto sangüíneo, desenvolvem-se e atingem o estágio larvário infectante (larvas L_3) (Rocha & Fontes, 1998).

A doença é caracterizada por uma grande variedade de manifestações clínicas, principalmente relacionadas a inflamações agudas e patologias crônicas dos vasos linfáticos. Algumas manifestações como a Eosinofilia Pulmonar Tropical e outras síndromes, genericamente conhecidas como filariose oculta, são menos freqüentes

e, provavelmente, estão relacionadas à hipersensibilidade do hospedeiro às microfilárias (Rocha & Fontes, 1998; Albuquerque et al., 1995).

Em áreas endêmicas podem ser encontrados, simultaneamente, vários indivíduos microfilarêmicos assintomáticos, outros sintomáticos e amicrofilarêmicos e outros poucos com microfilaremia e doença (Albuquerque et al., 1995b). A microfilaremia é definida como a presença de microfilárias no sangue periférico, enquanto que as manifestações clínicas da filariose podem caracterizar a doença aguda ou crônica. A aguda pode ser identificada quando houve um ou mais episódios de febre (seguidos ou não por cefaléia, náuseas e vômitos) ou por doenças locais (dor, calor, linfagite ou adenolinfagite nos braços e pernas, nos órgãos genitais masculinos ou nos seios) por pelo menos três dias. Já a forma crônica é identificada, de acordo com critérios da Organização Mundial de Saúde, por linfoedema, elenfantíase, hidrocele ou quilúria (Albuquerque et al., 1995a).

Alguns autores acreditam que diferentes níveis de prevalência de microfilaremia, em uma mesma área endêmica, estão provavelmente relacionados a diferentes graus de exposição aos vetores infectados, o que pode ser resultante de diferentes comportamentos individuais no que diz respeito ao contato com o vetor (Albuquerque et al., 1995a).

A transmissão de *W. bancrofti* é considerada um processo "ineficiente", uma vez que não há um reservatório animal da infecção e os vetores infectados apresentam alta taxa de mortalidade. As larvas ingeridas, por sua vez, não se desenvolvem dentro do vetor e muitas delas não sobrevivem ao se moverem da pele humana para o sistema linfático. Assim, a transmissão da filariose ocorre somente onde há densidade muito alta de vetores infectados (Albuquerque et al., 1995a).

O principal vetor no Brasil, o *Culex quinquefasciatus*, prolifera-se principalmente em águas estagnadas e poluídas, um tipo de criadouro encontrado freqüentemente em cidades com áreas endêmicas. Esta característica do ciclo de vida do vetor faz com que a expansão das endemias esteja intimamente relacionada ao tipo de processo de urbanização que acontece em países em desenvolvimento (Albuquerque et al., 1995a) (Figura 6).

FIGURA 6. *Culex quinquefasciatus*, principal vetor da filariose bancroftiana no Brasil
Foto cedida pela Editora Globo/Ricardo Siqueira

Estudos iniciais da filariose no Brasil tiveram lugar na Bahia, no século XIX, destacando-se a identificação de microfilárias na urina de pacientes com hematoquilúria por Wucherer em 1868, e a identificação da *Wuchereria bancrofti* por Araújo Silva, em 1877 (Coutinho et al., 1996). A cidade de Salvador é considerada o primeiro foco histórico da infecção (Maciel et al., 1996).

Até o início da década de 50, muito pouco se sabia sobre a filariose bancroftiana no Brasil, a não ser por inquéritos hemoscópicos isolados para a detecção da parasitose, que permitiram que cidades como Salvador (Bahia) e Belém (Pará) fossem consideradas focos.

Em Recife, a doença foi pela primeira vez documentada em 1952 com uma prevalência de 9,7% , em inquérito realizado por Azevedo e Dobbin entre 450 bancários examinados no bairro de Afogados (Coutinho et al., 1996; Maciel et al., 1996).

Entre 1951 e 1958 foram pesquisadas 852 localidades de 24 Unidades da Federação, totalizando 811.361 pessoas examinadas, sendo também realizados inquéritos entomológicos em 12 Estados e Territórios, tendo sido dissecados 120.399

exemplares de diferentes espécies de mosquitos. Esses inquéritos, hemoscópicos e entomológicos, permitiram a identificação de focos autóctones em várias cidades, de Estados de norte a sul do país. Foram encontrados portadores de *W. bancrofti* em 89 localidades de oito diferentes Unidades da Federação, com transmissão autóctone comprovada em apenas em 11 municípios: Recife (Pernambuco), Castro Alves (Bahia), Florianópolis (Santa Catarina), São Luís (Maranhão), Salvador (Bahia), Maceió (Alagoas), Manaus (Amazonas) e Porto Alegre (Rio Grande do Sul) (Rocha & Fontes, 1998).

Ao final desta avaliação ficou comprovado que a bancroftose no Brasil tinha distribuição urbana, sendo encontrada principalmente em cidades litorâneas, com características nitidamente focais. Dentre as áreas endêmicas, os locais de maior importância epidemiológica pela significativa densidade demográfica, elevada prevalência e alta concentração de vetores, eram Belém e Recife, onde se estimava, na ocasião, em 50 e 80 mil o número de portadores do parasitose, respectivamente. Além dessas duas capitais, também foram considerados importantes, na época, os focos de Castro Alves na Bahia, Florianópolis, Ponta Grossa e Barra de Laguna em Santa Catarina, e Cametá, Vigia e Soure no Pará. Os demais focos, com prevalência de microfilarêmicos inferiores a 1%, não foram considerados de expressão como problema de Saúde Pública, mas deveriam ficar sob observação pelo Ministério da Saúde (Rocha & Fontes, 1998).

Pelos inquéritos entomológicos realizados, o *Cx. quinquefasciatus* foi considerado o principal transmissor no país, embora raros exemplares de mosquitos de outras espécies tenham sido também encontrados infectados, não sendo considerados de importância na transmissão da bancroftose no Brasil (Rocha & Fontes, 1998).

A partir desses inquéritos, foram iniciadas ações de controle da doença, pelo Departamento Nacional de Endemias Rurais (DNERu) e depois, em 1970, pela Superintendência de Controle de Endemias (SUCAM), tendo como meta erradicar ou controlar a bancroftose nas áreas endêmicas, através do tratamento de indivíduos parasitados com dietilcarbamazina (DEC), do combate químico das formas adultas e larvárias dos insetos vetores e da eliminação dos criadouros de mosquitos através de obras de saneamento (Rocha & Fontes, 1998).

O uso de inseticidas organoclorados ou organofosforados de ação residual, como BHC, DDT e depois Dieldrin, para o ataque das formas adultas do vetor, mostraram bom resultado no início, mas, em pouco tempo, tornaram-se ineficazes e foram abandonados. Devido à falta de um inseticida eficaz e ao alto custo das aplicações semanais de larvicidas nos criadouros, a atenção concentrou-se no tratamento dos casos humanos e na educação sanitária da população. Quase todos os focos de transmissão ativa foram considerados extintos pelo Ministério da Saúde, que considerava como áreas endêmicas somente Belém (Pará) e Recife (Pernambuco). Em 1985, o Ministério da Saúde considerava que a endemia vinha sendo controlada de forma satisfatória no país e que a doença tinha atingido nível baixo de endemicidade, não mais apresentando a gravidade do passado. Em Belém, o índice de indivíduos com microfilaremia havia regredido de 9,8% (1951) para 0,2 % (1983) e em Recife, de 6,9% (1954) para 0,7% (1984) (Rocha & Fontes, 1998) .

Após a década de 50 não foi realizado outro levantamento global no Brasil para redesenhar o mapa da distribuição geográfica da filariose linfática no país, estando disponíveis apenas dados de inquéritos isolados (Rocha & Fontes, 1998).

Na Bahia, os últimos dados são de 1986, que mostram que nenhum caso autóctone foi registrado desde 1981 no Estado, o mesmo ocorrendo em João Pessoa (Paraíba), em inquérito do início de 1970. Outros dados foram levantados ainda em Recife, Belém, Maceió, Ponta Grossa (Paraná) e Barra de Laguna (SC), mas em nenhum outro foco antigo foi realizada reavaliação recente da situação da parasitose (Rocha & Fontes, 1998).

Em Maceió, em 1990, foi realizado um inquérito hemoscópico piloto entre 731 militares do Exército local, após ser encontrado um paciente com linfagite retrógrada, uma das formas clínicas da filariose linfática. Dois militares e um parente de um deles encontravam-se microfilarêmicos, em grau significativo para uma área onde se imaginava que a transmissibilidade estaria sob controle. Em virtude do aparecimento destes casos autóctones recentes e pela presença do vetor em potencial (*Cx. quinquefasciatus*) um amplo inquérito hemoscópico foi então realizado na região. Foram examinados 10.450 escolares de 23 bairros diferentes e a prevalência detectada foi de 0,7%. A pesquisa estendeu-se para os 33 bairros de Maceió e a prevalência

geral foi também de 0,7%. A parasitose apresentou distribuição focal na cidade, com filarêmicos em apenas 10 bairros, sendo que 84% dos parasitados concentravam-se em apenas 3 bairros, centrais e limítrofes: Feitosa, Pitanguinha e Jacintinho, com prevalências de 5,3%, 3,5% e 1,2%, respectivamente. Nestes bairros, mosquitos *Cx. quinquefasciatus* capturados apresentaram índices de infectividade variando de 0,4 a 2,1%. Todos esses dados, em conjunto, revelaram a ocorrência de transmissão ativa de *W. bancrofti* na área urbana de Maceió, ao contrário do que considerava o Ministério da Saúde (Rocha & Fontes, 1998).

Em Santa Catarina foi realizado um inquérito pela SUCAM, em 1976, sendo examinados 21.639 residentes nas áreas consideradas endêmicas, no passado, não tendo sido detectado nenhum microfilarêmico. O desaparecimento da bancroftose na região foi atribuído à ação do medicamento dietilcarbamazina, administrado entre 1957 e 1963, a todos os parasitados em Florianópolis e Ponta Grossa e a toda a população em Barra de Laguna. Em 1994 confirmou-se a erradicação da parasitose, quando foram examinados 90,7% da população de Ponta Grossa e 95,2% de Barra de Laguna, não se detectando nenhum microfilarêmico em áreas que, no passado, apresentaram índices de até 14,5% (Rocha & Fontes, 1998).

Em 1982, em Recife, o declínio observado nos índices de microfilaremia, apresentados pela SUCAM, de 1954 até o início da década de 80, não foi constatado quando foram pesquisados alguns bairros isolados da capital pernambucana, inclusive tendo-se verificado aumento da prevalência de bancroftose ao longo dos anos (Rocha & Fontes, 1998).

Em 1994, antigas áreas endêmicas de Recife, os bairros de Santo Amaro e Campo Grande, apresentaram índices de prevalência de 13,5% e, em áreas de ocupação mais recente, 12,3% (bairros de Sapucaia e Salgadinho em Olinda). Em 1995, em outras áreas de Recife, como os bairros de Coque e Mustardinha, foram observados índices de 10,7% e 9,3%, respectivamente. Em 1996, em pesquisa mais ampla, foram examinados 10.851 indivíduos de 31 diferentes bairros, sendo detectados 6,5% de microfilarêmicos (Rocha & Fontes, 1998).

A manutenção da filariose linfática em Recife, de forma endêmica, certamente está associada à baixa qualidade de vida observada em grande parte da

área urbana, agravada pela migração e urbanização desordenada. 42,2% das residências situam-se em áreas de favelas, onde a deficiência de serviços de infra-estrutura, como sistema subterrâneo para coleta de esgotos, sistemas de drenagem, valas que recebem lixo doméstico, ruas sem calçamento, solo encharcado, altos índices pluviométricos, coleta irregular de lixo, são fatores que contribuem para a criação de condições favoráveis para a instalação de criadouros do mosquito vetor. Nestas áreas, a densidade populacional do vetor costuma ser elevada e o tipo de habitação favorece também o contato hospedeiro-vetor. A população, de modo geral, desconhece a forma de transmissão da doença e, portanto, não toma medidas de proteção individual, nem procura destruir os criadouros de mosquitos (Regis, 1998; Rocha & Fontes, 1998; Albuquerque et al., 1995).

Recife é considerada, na atualidade, a principal área endêmica no Brasil, apresentando não somente transmissão bastante intensa, mas também claros sinais de dispersão geográfica da doença. A distribuição da filariose se dá de forma heterogênea, ocorrendo principalmente em áreas de favelas, onde os índices de prevalência chegam a alcançar 14,9%, evidenciando o fracasso do tratamento seletivo dos portadores de microfilárias como único método de controle utilizado durante décadas (Albuquerque et al., 1995).

A Organização Mundial de Saúde considera a filariose linfática uma das doenças potencialmente erradicáveis e, em conjunto com a Organização Pan-Americana de Saúde, planeja a erradicação dela nas Américas. Desta forma, a Fundação Nacional de Saúde, em conjunto com Universidades Federais, Institutos de Pesquisa e Secretarias de Saúde das áreas endêmicas, elaborou um Plano Nacional para Eliminação da Filariose Linfática no Brasil, que tem como objetivos principais a reavaliação dos focos ativos e daqueles considerados extintos, mobilização da comunidade nas áreas de endemia, tratamento em massa da população nestas áreas e controle de vetores adequado às realidades locais (Rocha & Fontes, 1998).

O controle da filariose bancroftiana no homem é feito principalmente através da terapia química com dietilcarbamazina (DEC), mas, em certas áreas, o clássico "spray" com inseticidas pode ser efetivo contra formas adultas de mosquitos. Métodos de controle integrado, diretamente contra larvas dos mosquitos, estão

também em teste em muitas situações urbanas, com resultados promissores (TDR, 1989).

Entre 1990 e 1995, o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz, financiado pela Organização Mundial de Saúde, desenvolveu um projeto de pesquisa e de controle efetivo da filariose bancroftiana, inicialmente em 21 das 36 Zonas Especiais de Interesse Social, que correspondem a 8,3% de toda a área da cidade de Recife, onde a população apresenta nível sócio-econômico muito baixo. Nestas áreas, o nível de prevalência de microfilarêmicos médio era de 6,5% e o nível de infectividade de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* variava entre 0,9 e 2,8%. Duas áreas, Coque e Mustardinha, com prevalência de 10%, foram selecionadas, para a realização de um estudo piloto. Na primeira, houve tratamento em massa com DEC, associado ao controle do vetor com produtos à base de *Bacillus sphaericus* 2362, enquanto na segunda, houve somente o tratamento químico. O tratamento com DEC resultou na redução drástica dos níveis de infecção da população e de infectividade do vetor em ambas as áreas, com melhores resultados no Coque, onde o índice de infecção caiu de 3,11%, antes do tratamento com DEC, para 0%, assim permanecendo durante todo o segundo ano de quimioterapia. Na Mustardinha, a infectividade foi reduzida para 0,05% no segundo de tratamento com DEC. Os índices de microfilaremia da população, por sua vez, foram reduzidos em 99,8% no Coque e em 98,7% na Mustardinha (Furtado et al., 1998).

A eficácia e viabilidade do uso de *B. sphaericus* para o controle de *Cx. quinquefasciatus* têm sido comprovadas em programas e testes implementados em larga escala em alguns países e em áreas de Recife e Olinda. Em Recife, 3.000 criadouros, em uma área urbana de 1,2Km², foram tratados mensalmente com *B. sphaericus* 2362, durante dois anos. A densidade populacional de *Cx. quinquefasciatus* foi reduzida em 50% no primeiro ano e em 85% no segundo ano de tratamento, tenso sido mantida baixa durante dez meses após a suspensão das aplicações. Em Olinda foram tratados 2.500 criadouros, mensal/bimestralmente, durante 18 meses. Em 80% da área tratada houve uma redução de 80% da densidade da população de *Cx. quinquefasciatus*. Os resultados obtidos no restante da área não foram tão bons devido a dificuldades operacionais no tratamento de uma lagoa. Tais dificuldades

independeram do agente de controle utilizado, mas revelaram a importância de integração de outras abordagens de controle, como por exemplo, a eliminação dos criadouros e a criação de barreiras físicas (Regis, 1998). De fato, a vedação de fossas, aplicação de bolas de isopor nas mesmas e a utilização de inseticida biológico à base de *B. sphaericus*, de forma integrada, foram medidas já experimentadas em Recife, tendo sido verificada uma redução acentuada da densidade de mosquitos após a implementação das mesmas (Coutinho et al., 1996).

Oncocercose

A oncocercose é uma doença parasitária crônica causada por um nematódeo chamado *Onchocerca volvulus* e transmitida por várias espécies de mosquitos do Gênero *Simulium* (FNS 1998). Também conhecida como cegueira dos rios, é endêmica em grande parte da África e em focos isolados da América Latina e Yemen (TDR, 1993). As manifestações clínicas da doença incluem nódulos dermais, complicações linfáticas e sistêmicas. A mais grave complicação são lesões nos olhos que podem levar à cegueira (FNS, 1998). O risco de complicações depende da duração e intensidade da infecção e da linhagem do parasita envolvido. Complicações graves são encontradas quase exclusivamente em comunidades altamente endêmicas, onde a transmissão é alta e a superinfecção uma regra (TDR, 1993).

Existem duas espécies de *O. volvulus*, idênticas sob o microscópio, mas com diferentes vetores e nichos ecológicos. Uma causa a oncocercose das savanas e a outra, a oncocercose silvestre. Para o mesmo grau de carga de filária e microfilária, a forma das savanas causa três vezes mais cegueira do que a forma silvestre (TDR, 1991).

As larvas são transmitidas através da picada do *Simulium* infectado. Os helmintos adultos se desenvolvem em nódulos subcutâneos, liberando um grande número de microfilárias nos tecidos ao redor. A maior parte dos sintomas da oncocercose resultam da migração destas microfilárias pela pele e olhos, o que pode levar a coceiras intensas, dermatites desfigurantes e danos oculares, incluindo a cegueira (TDR, 1991).

No Brasil, a doença está restrita à área dos índios Yanomamis, em número

de mais de dez mil, que habitam os Estados de Roraima e do Amazonas, distribuídos em aproximadamente 200 comunidades espalhadas por uma área contínua de 9.419.108 hectares (FNS, 1998; Coelho et al., 1998).

Em 1967, Bearzoti et al. constataram o primeiro caso de oncocercose no Brasil em uma criança de três anos de idade, que apresentava dois nódulos no couro cabeludo e que seguramente adquirira a doença no então Território de Roraima, em local que não pôde ser identificado com exatidão (Moraes & Chaves, 1974).

A doença foi encontrada posteriormente, em 1972, em duas missionárias americanas, residentes junto a aldeias de índios Uaicás, do grupo Yanomami, no rio Tootótobi (Amazonas) e também em uma outra missionária americana, esta residente na Serra dos Surucucus, Roraima, local também habitado por índios Uaicás (Moraes & Chaves, 1974).

Como estas aldeias estavam localizadas ao longo da fronteira entre Brasil e Venezuela, nos territórios de ambos os países, levantou-se a hipótese de a doença ser endêmica naquela região, envolvendo todo o grupo e com origem provável na Venezuela (Moraes & Chaves, 1974).

Os Yanomamis vivem em torno das serras Parima, Surucucus, Urucuzeiro, Tapirapecó, Curupira, estendendo-se por cerca de 500 Km ao lado da fronteira Brasil-Venezuela, região elevada que favorece a criação de vetores - insetos do gênero *Simulium* (borrachudos ou piuns), abundantes na região (Moraes & Chaves, 1974).

Com os primeiros inquéritos epidemiológicos realizados na região de Tootótobi (Amazonas) em 1974, foi confirmado o caráter endêmico da doença, quando para os 91 índios examinados, o percentual de casos positivos foi de 62,6% (Moraes & Chaves, 1974). No mesmo ano, na região de Surucucu, foi encontrada uma prevalência de 47% e na região de Auaris, 24,5% (Rassi et al., 1976) e 19,5% (Moraes et al., 1977a). Já em 1977, uma prevalência de 51,4% na região de Catrimani e de 10,3% em Macujaí foram relatadas por Moraes et al. (1977b).

A oncocercose, no entanto, tem se mantido restrita ao território Yanomami devido ao alto grau de isolamento ainda mantido por este grupo indígena e pela falta de vetores apropriados para *O. volvulus* na periferia da área por eles ocupada.

Na parte central e montanhosa (compreendendo Brasil e Venezuela) o *S. guianense* é um vetor eficiente, responsável por prevalências de até 60% ou mais nas aldeias ali situadas. Na parte periférica e arredores, a espécie dominante - *S. oyapockense* - também vetora, apresenta capacidade de transmissão bem inferior - a prevalência é, nestas áreas, insignificante (0,5%) (Moraes, 1986).

Na parte central do território Yanomami, principalmente, a presença de valiosas jazidas minerais tem atraído garimpeiros de diversas partes do país. Em 1976, chegou a se estabelecer ali, por alguns meses, uma companhia de mineração, na Serra dos Surucucus, para a lavra de cassiterita. Neste período, estima-se que mais de 300 trabalhadores ficaram expostos, através do contato com indígenas locais infectados. Depois de algum tempo, este tipo de atividade foi proibida e os garimpeiros dispersaram-se. Acredita-se que alguns tenham se dirigido para Goiás, em Minaçu, atraídos por garimpos de ouro e cassiterita que cercam este município, onde foi detectado, em 1986, um primeiro caso autóctone de oncocercose (Moraes, 1986).

Dada a natureza nômade dos que buscam minérios, é certa a presença de muitos desses trabalhadores nas mais diversas zonas de garimpagem espalhadas pelas região Norte e Centro-Oeste do país. Apesar das proibições impostas, garimpeiros continuam a entrar clandestinamente no território Yanomami à procura de ouro e diamantes. Muitos saem infectados, pois o trabalho é realizado à margem de rios, onde abundam simulídeos, muitas vezes em locais próximos a aldeias Yanomamis. Pouco se conhece sobre a distribuição de espécies de simulídeos vetoras de *O. volvulus* fora do território Yanomami, sendo então impossível dizer quais destas zonas de migração poderão se tornar novos focos no futuro (Moraes, 1986).

Várias outras pessoas, como missionários e indigenistas têm sido removidas da região para prestação de serviços em outros locais. Uma vez que as microfilárias chegam a viver 15 anos ou mais, estas pessoas podem servir de fonte para a organização de novos focos no território brasileiro (Moraes, 1986).

Entre 1993 e 1996 a Fundação Nacional de Saúde (FNS) em parceria com o Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA) realizou amplo inquérito clínico-epidemiológico com o objetivo de obter dados sobre a distribuição da oncocercose na área Yanomami, que serviriam de base a atividades de tratamento a serem

desenvolvidas na área. Foram então examinados 4.138 indivíduos, sendo 3.926 indígenas e 212 não indígenas - funcionários e missionários que trabalhavam na área naquele momento - em estudo que foi desenvolvido em 27 pólos-base do Distrito Sanitário Yanomami (Coelho et al., 1998).

Os resultados indicaram 5 pólos-base hiperendêmicos, com mais de 60% de prevalência, abrangendo 78 comunidades; 6 mesoendêmicos, abrangendo 37 comunidades que apresentaram prevalências entre 21 e 59%; 7 hipoendêmicos, abrangendo 57 comunidades com prevalências entre 0 e 20%; 9 considerados não endêmicos, abrangendo 28 comunidades com prevalência 0% e um pólo suspeito, abrangendo 14 comunidades com estudo que ainda não havia sido concluído (Coelho et al., 1998).

A implantação efetiva de um programa de controle e eliminação da oncocercose tem boas perspectivas de sustentabilidade com: a disponibilidade de um medicamento microfilaricida à base de ivermectina; a iniciativa da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS)/ O.M.S. junto a OEPA (Onchocerciasis Elimination Program for Americas), que tem coordenado, estimulado e apoiado esforços de diversos países nas Américas com focos de oncocercose, tendo como objetivo eliminá-los, até o ano 2000, como é esperado para os focos africanos; e também, a criação do Distrito Sanitário Yanomami (Coelho et al., 1997).

A não efetivação de medidas sistemáticas para controle dessa endemia, no entanto, deve-se ao relativo isolamento dos grupos indígenas atingidos, dificuldades logísticas, operações difíceis e de alto custo, outras doenças de caráter agudo que assolam a região, ocasionando outras prioridades das equipes locais de saúde (Coelho et al., 1997).

Em 1995, entre os meses de outubro e dezembro, foi realizado um projeto piloto nos pólos-base de Toototobi e Balawaú, com população alvo de 307 pessoas em 6 comunidades, no primeiro, e 232 pessoas em 8 comunidades, no segundo, para tratamento sob supervisão médica direta. A droga utilizada foi a ivermectina (Mectizan®) com a observação das reações adversas. Em Toototobi foi encontrada uma prevalência de 68,2% e em Balawaú, de 76,6% (Coelho et al., 1997).

Todas as 14 comunidades foram examinadas e tratadas em massa com

ivermectina - 80,1% da população - excluindo-se as grávidas e crianças com menos de 5 anos de idade (Coelho et al., 1998).

Dos 432 indivíduos tratados, 12,3% apresentaram reações adversas, 83% leves e 17% moderadas, não sendo observadas reações graves (Coelho et al., 1997).

Nódulos compatíveis com oncocercose foram encontrados em 15,3% das 535 pessoas examinadas e desses, 86,7% tinham biópsia de pele positiva (Coelho et al., 1997).

As reações adversas foram semelhantes às de tratamento realizado em outros países na América e África. A confiança dos Yanomami no sistema de saúde implantado nos pólos-base onde foi distribuída a ivermectina, associada ao prévio esclarecimento sobre a doença e os possíveis efeitos colaterais, contribuiu para a boa aceitação e tolerância ao primeiro ciclo de tratamento (Coelho et al., 1997).

Como conclusão dos estudos realizados neste projeto piloto, recomendou-se a distribuição de ivermectina em toda a extensão do foco endêmico visando a evitar o aparecimento de formas graves de manifestação da doença - seqüelas oculares ou dermatológicas e a dispersão para áreas indenes.

Por outro lado, as larvas de *Simulium* que transmitem a *Onchocerca* criam-se tipicamente em rios de corrente rápida e córregos e, dentro da área do Progama de Controle da Oncocercoce no Oeste da África (OCP), a transmissão tem sido interrompida, em grande zona, pelo ataque continuado nos criadouros de borrachudos usando larvicidas biodegradáveis, além de tratamentos com a ivermectina (TDR, 1989).

De fato, apesar da introdução da ivermectina, um microfilaricida que controla a morbidade, o controle de vetores ainda permanece o método de escolha para conter a transmissão do parasita dentro do Programa para Controle da Oncocercose no Oeste da África. Inseticidas são borrifados em criadouros nos rios onde o *S. damnosum* (vetor no Oeste da África) se reproduz. O programa teve início em 1975 e gradualmente foi expandido até cobrir uma área de 20.000 milhas de extensão ao longo dos rios. Ao todo, sete tipos de inseticidas vêm sendo utilizados, em rotação. Um biológico, à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* (*B.t.i.*),

três organofosfatos, dois piretróides sintéticos e um carbamato. Em termos de segurança para o meio-ambiente, o *B.t.i.* tem, sem dúvida, se mostrado o mais aceitável e que pode ser usado sem risco. É seletivo, totalmente inócuo ao homem e outros mamíferos, vertebrados aquáticos e peixes, fato particularmente importante, uma vez que estes são fonte de alimento da população ribeirinha local, além de ser inócuo a invertebrados e apresentar baixa resistência - fatos comprovados após 16 anos de uso, sendo ainda o mais barato dentre os inseticidas usados (Hougard, 1998).

UTILIZAÇÃO DE *BACILLUS THURINGIENSIS* SOROVAR *ISRAELENSIS* E *BACILLUS SPHAERICUS* NO CONTROLE DE VETORES

Além dos inseticidas químicos convencionais, os inseticidas microbianos têm sido crescentemente empregados, como um método alternativo, no controle de insetos vetores de importantes doenças tropicais (de Barjac, 1989).

Dentre os agentes utilizados para o controle microbiológico de mosquitos e borrachudos, destacam-se duas bactérias: o *Bti* e o *Bs*, as quais são normalmente saprofíticas, freqüentemente associadas com folhas, solos ou insetos. Estas bactérias entomopatógenas apresentam alto grau de especificidade ao inseto-alvo e segurança ambiental, o que as faz particularmente adequadas para o uso em larvas de mosquitos susceptíveis presentes em áreas alagadas e contra populações de mosquitos resistentes aos inseticidas químicos (Wirth et al., 1998).

Os dados obtidos até o momento, denotam a segurança destas bactérias aos insetos não-alvo, invertebrados e vertebrados. Estudos têm demonstrado a inocuidade do *Bti* e do *Bs* para vários mamíferos, tendo-se concluído que estes bacilos são altamente improváveis de ocasionar prejuízos aos humanos. Assim sendo, as evidências sugerem que os riscos à saúde pública, pela utilização de *Bti* e *Bs* como agente de controle, são extremamente pequenos, particularmente em comparação aos resultados benéficos à comunidade (Lacey & Orr, 1994; TDR, 1993; Yousten et al., 1991; Siegel & Shadduck, 1990a, 1990b; Mulla, 1990; Mulla et al., 1984; Molloy & Jamnback, 1981).

Desde a descoberta do *Bti* por Goldberg & Margalit (1977), em 1976, e

da cepa *Bs* 2362, por Weiser (1984), em 1984, foi despertado o interesse na produção industrial destes bacilos, de modo que pudessem ser testados em grande escala. O uso de preparações à base de *Bti* foi aprovado pela "U. S. Environmental Protection Agency" (EPA), por volta de 1981, enquanto que o registro para o uso comercial de *Bs*, nos E.U.A. e na Europa, foi obtido em 1990. Diferentes tipos de formulações destes biolarvicidas são produzidos por diversas companhias, estando comercialmente disponíveis (Tabela 7; Tabela 8). Atualmente, estes produtos vêm sendo largamente utilizados para o controle de vetores em muitos países tropicais, assim como contra mosquitos incômodos e borrachudos, na Europa e América do Norte (TDR, 1993; Becker & Margalit, 1993; Becker, 1990).

Produtos comerciais à base de *Bti* foram escolhidos pelo Programa de Controle da Oncocercose (OCP), da Organização Mundial de Saúde (WHO), visando ao controle de *Simulium damnosum* – o vetor do nematódeo *Onchocerca volvulus* – em uma área abrangendo 11 países, na África Ocidental. A implantação destes produtos, em 1981, surgiu como um método alternativo ou suplementar aos inseticidas organofosforados, rotineiramente utilizados na região, os quais haviam se tornado ineficazes devido ao desenvolvimento de resistência. Dessa forma, procurando-se evitar um acréscimo na resistência, foi desenvolvido, a partir de 1985, um programa de controle "integrado", no qual se adotou o uso principal de *Bti* e a aplicação esporádica de organofosfatos, utilizado apenas nas regiões onde nenhuma resistência havia sido detectada. Desde então, poucos novos casos de oncocercose – também conhecida como "cegueira dos rios" – têm sido registrados (Silva-Filha, 1994; Drobniewski, 1994; Becker & Margalit, 1993).

TABELA 7. Alguns produtos comercialmente disponíveis à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis*

Nome	Empresa/Origem	Tipo de Formulação
	B.t.i.	
Mosquito Dunks	Summit Chemical Co./EUA	tabletes em forma de biscoito
Bactimos Briquets	Summit Chemical Co./EUA	briquetes
Aquabac 200 G	Becker Microbials/EUA	grânulos
Bactimos Granules	Novo Nordisk/Dinamarca	grânulos
Teknar Granules	Zoecon/EUA	grânulos
Vectobac G e CG	Abbott Lab./EUA	grânulos
Bactimos Pellets	Novo Nordisk/EUA	pellets
Bactimos WP	Novo Nordisk/Dinamarca	pó molhável
Bactisand	Summit Chemical Co./EUA	pó molhável
Bactulicid	I.M.Pushkin/Leningrado	pó molhável
Biocul Bactoculicide	Biotech International Limited/Índia	pó molhável
Vectobac WP	Abbott Lab./EUA	pó molhável
Aquabac XT	Becker Microbials/EUA	suspensão aquosa concentrada
Bactivec	Labiofam/Cuba	suspensão aquosa concentrada
Skeetal FC	Microbial Resources/EUA	concentrado emulsionável
Teknar HP-D	Sandoz / Zoecon/EUA	suspensão aquosa concentrada
Teknar	Zeneca/Brasil	suspensão aquosa concentrada
Vectobac 12 AS	Abbott Lab./Brasil	suspensão aquosa concentrada
Vectobac AS	Abbott Lab./Brasil	suspensão aquosa concentrada

TABELA 8. Alguns produtos comercialmente disponíveis à base de *Bacillus sphaericus*

Nome	Empresa/Origem	Tipo de Formulação
	B.s.	
Vectolex CG	Abbott Lab./EUA	grânulos
Biolar Spherix	Biotech International Limited/Índia	pó molhável
Griselesf 2362	Labiofam/Cuba	suspensão aquosa concentrada
Spherico SC	Geratec/Brasil	suspensão aquosa concentrada
Spherimos FC	Novo Nordisk/EUA	concentrado emulsionável

Iniciou-se na Alemanha, em 1976, uma campanha visando ao controle de culicídeos, usando-se produtos comerciais à base de *Bti*. Este programa abrangia uma área de 500km^2 no Vale do Rio Reno e tinha como espécies-alvo *Aedes vexans*, *Aedes sticticus* e *Aedes rossicus*, além de *Culex pipiens molestus*, em cuja espécie foram testadas preparações de *Bs*, a partir de 1989. Como resultado, a incidência destes mosquitos - combatidos devido ao grande incômodo causado à população, com decréscimo na sua qualidade de vida - foi reduzida em 90%, a cada ano (Becker & Margalit, 1993; Becker, 1990).

A partir de 1987, o Instituto de Doenças Parasitárias, contando com o apoio da WHO, implantou na Província de Hubes, localizada ao longo do Rio Yang-Tsé, na República Popular da China, um amplo controle de mosquitos, usando-se *Bti* e *Bs*. Dentre as 69 espécies de mosquito existentes, na época encontrava-se *Anopheles sinensis*, espécie vetora do agente da malária – *Plasmodium vivax*. Após o tratamento sistemático com os dois bacilos, houve uma redução considerável nos casos de malária na região (Becker & Margalit, 1993; Becker, 1990).

Apesar do amplo uso de inseticidas bacterianos à base de *Bti*, em campo, não há registro de casos de resistência, até o momento, nas populações de mosquitos e simulídeos tratadas com estes produtos (Wirth & Georghiou, 1997).

Assim, após 7 anos de aplicação intensiva de *Bti* na África, em função do Programa de Controle da Oncocercose, não foi encontrado acréscimo significante de resistência em populações naturais de *Simulium damnosum* (Kurtak et al., 1989).

Outra investigação foi feita por Becker & Ludwig (1993), em populações naturais de *Aedes vexans*, no Vale do Rio Reno/Alemanha, tratadas sistematicamente com *Bti* por mais de 10 anos. Não foi encontrada diferença significante na susceptibilidade de populações selecionadas de áreas tratadas e não tratadas, o que foi confirmado pelo baixo índice de resistência – menor que 1 – obtido em todos os testes. Becker & Ludwig (1993) atribuíram ao curto período anual de exposição das larvas às toxinas, assim como a migração constante de indivíduos para a área tratada, como possíveis fatores responsáveis pela manutenção da susceptibilidade destas populações.

Entretanto, Gill et al. (1992) relataram estudos não publicados, no qual

a seleção de *Culex quinquefasciatus* com apenas uma toxina de *Bti* – Cry11A – rapidamente produziu altos índices de resistência àquela toxina (Tabashnik 1994). Tal resultado sugere que a dificuldade na obtenção de níveis relevantes de resistência, pode estar relacionada à complexa mistura de toxinas que compõem o corpo paraesporal de *Bti*, as quais devem interagir com múltiplos sítios de ligação ou receptores, desta forma retardando a evolução de resistência a este agente (Silva-Filha, 1994; Gill et al., 1992).

Convém ressaltar que as tentativas de seleção de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, em laboratório, têm resultado apenas em baixos índices de resistência ao *Bti*, o que reforça a hipótese de que a mistura heterogênea de quatro toxinas, presentes nesta bactéria, constitui em uma defesa efetiva contra o desenvolvimento de resistência (Georghiou, 1990; Goldman et al., 1986; Georghiou et al., 1983; Vasquez-Garcia, 1983).

Recentes trabalhos sugerem que a combinação de quantidades subletais de Cyt1A pode suprimir ou reduzir consideravelmente os altos níveis de resistência às proteínas Cry, de *Bti*, em larvas de *Culex quinquefasciatus*, provavelmente devido aos dois distintos modos de ação apresentados por estas toxinas (Wirth et al., 1997; Wirth & Georghiou, 1997; Georghiou & Wirth, 1997).

Segundo Wirth et al. (1997), a toxina Cyt1A restituiria a capacidade das proteínas Cry de se ligarem e/ou inserirem-se na membrana microvilar da larva do mosquito. O potencial da toxina Cyt1A em reduzir a resistência às proteínas Cry, de *Bti*, residiria no fato de essa toxina exercer seu efeito mediante uma perturbação não específica na membrana – ação do tipo detergente – o que poderia facilitar a permeação da membrana celular pelas moléculas das proteínas Cry. Tal fato explicaria, ainda, o sinergismo observado entre Cyt1A e as proteínas Cry contra larvas de mosquitos não-resistentes, conforme previamente comentado (Wirth et al., 1997; Butko et al., 1996).

Diferentemente do que sucede com o *Bti*, vários níveis consideráveis de resistência foram encontrados em populações de *Culex quinquefasciatus* tratadas com *Bs* em laboratório e vários trabalhos têm confirmado que a resistência a este agente pode ser desenvolvida em campo, quando esta bactéria é usada intensivamente.

Vários níveis de resistência foram detectados em populações de *Culex pipiens quinquefasciatus*, tratadas com *Bs*, no Brasil e na Índia, assim como em *Culex pipiens pipiens*, na França (Nielsen-LeRoux, 1998).

Detectou-se um nível de resistência relativamente alto em uma população de campo de *Culex quinquefasciatus* em Kochi, na Índia, exposta a repetidas aplicações de *Bs* 1593, durante um período de dois anos. As larvas da área tratada forneceram valores de CL_{50} e CL_{90} que foram 146 e 180 vezes maiores, respectivamente, que os de uma população controle não tratada. A linhagem resistente, colonizada em laboratório, foi submetida a uma moderada pressão de seleção, obtendo-se um aumento de cerca de 32.000 vezes na CL_{90}, após 18 gerações (Rao et al., 1995).

Em uma área urbana do Recife (Brasil), cuja população natural de *Culex quinquefasciatus* havia sido intensivamente tratada com *Bs* 2362, verificou-se que houve uma redução de cerca de 10 vezes na sensibilidade dos indivíduos da população a esta bactéria, após 37 tratamentos, durante um período aproximado de dois anos (Silva-Filha, 1994).

Acredita-se que diferentes genes estejam envolvidos na resistência ao *Bs*, com base em estudos de ligação *in vitro* realizados entre a toxina binária de *Bs* e frações apicais das membranas das células colunares do intestino (BBMF) de três populações de *Culex*, as quais haviam adquirido resistência à toxina. Isto porque, em uma das colônias resistentes, houve uma alteração na funcionalidade do receptor, não tendo sido detectada qualquer ligação, ao passo que nas outras duas populações estudadas, nenhuma modificação considerável nas características de ligação – afinidade e concentração de receptores – foi encontrada, comparando-se com as colônias controle de *Culex* (Nielsen-LeRoux, 1998; Nielsen LeRoux et al., 1995; Silva- Filha et al., 1995; Nielsen-LeRoux, 1994).

A resistência em campo parece declinar rapidamente, à medida que o tratamento é interrompido e ocorre a migração constante de indivíduos não-tratados para a área tratada, o que se deve, provavelmente, ao caráter recessivo da resistência (Nielsen-LeRoux et al., 1998; Adak et al., 1995).

No Brasil, as normas para concessão de registro comercial de agentes de controle biológico, para utilização ao nível de campo, foram estabelecidas através

de um projeto intitulado "Análise de Risco e Avaliação de Impacto Ambiental do Uso de Agentes Microbianos de Controle Biológico", conduzido conjuntamente pelo Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental – Embrapa Meio Ambiente; Instituto Biológico/SP; USP/ESALQ; UNESP/Jaboticabal, em cooperação com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (Capalbo, 1995).

A proposta, apresentada em 1994, baseou-se em legislações e regulamentações adotadas pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) e pela Comunidade Econômica Européia (CEE), tendo sido submetida à apreciação dos órgãos federais registrantes: Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária (MAARA), IBAMA e Ministério da Saúde (MS), assim como aos representantes das comunidades científica e empresarial brasileiras. Essa proposta foi publicada em Dezembro de 1995, tendo sido aprovada como Portaria Normativa nº131, em Dezembro de 1997, sendo, em seguida, publicada no Diário Oficial da União (de Nardo et al., 1998; de Nardo et al., 1995).

O Comitê de Sanidade Vegetal do Cone Sul (COSAVE) – que assessora o Mercado Comum do Cone Sul (MERCOSUL) – através do Grupo de Trabalho Permanente em Controle Biológico (GTP-CB), vem procurando padronizar as legislações e protocolos para agentes biológicos de controle, a serem adotados pelos países integrantes do Cone Sul – Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai. O GTP-CB visa à harmonização de regulamentações para importação, quarentena, registro, uso e manejo de organismos e produtos biológicos para o controle de pragas, o que se tornou necessário em função do funcionamento do MERCOSUL (de Nardo et al., 1998; de Nardo et al., 1995).

A grande maioria dos programas de controle implantados no Brasil é dependente de produtos comerciais importados, embora, recentemente, pesquisas e investimentos estejam sendo feitos no sentido de se obter uma tecnologia que, eventualmente, possibilite a produção de inseticidas biológicos em escala industrial, de modo a suprir a demanda nacional (Ruas Neto & Silveira, 1989).

No litoral Norte do Estado de São Paulo – Ubatuba, Caraguatatuba, Ilha Bela e São Sebastião – a Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) tem

conduzido um Programa de Controle de Simulídeos, usando produtos comerciais de *Bti*, visando principalmente ao combate do borrachudo mais comum do Sul e Sudeste do País: *Simulium pertinax*. Este programa teve o seu implemento em 1990 e, desde então, a densidade de fêmeas de *S. pertinax* tem permanecido dentro dos limites aceitáveis (Araújo-Coutinho & Lacey, 1990; Araújo-Coutinho, 1995).

No Rio Grande do Sul, deu-se início em 1984, a um projeto-piloto de combate aos simulídeos, através do Serviço de Controle de Vetores da Secretaria Estadual de Saúde e do Meio Ambiente. Formulações comerciais de *Bti* foram utilizadas, de forma experimental, numa área envolvendo cinco municípios da serra gaúcha: Gramado, Nova Petrópolis, Feliz, Dois Irmãos e Sapiranga (Ruas Neto & Silveira, 1989). Em conseqüência do êxito obtido, o Governo decidiu reincrementar, em 1997, o programa de combate ao borrachudo. O Programa Estadual de Controle de Simulídeos testou recentemente, entre abril de 1996 e maio de 1997, uma formulação à base de biomassa entomotóxica de *Bti* – denominada de INPALBAC – que foi desenvolvida no Brasil pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)/RJ, em convênio com a INPAL S/A Indústrias Químicas. Foram realizados cinco testes em campo em alguns arroios dos municípios de Barão, Sertão Santana e Tapejara, e o produto, que se encontra em fase de registro junto ao Ministério da Saúde, mostrou-se eficaz, conseguindo 100% de mortalidade das larvas nos trechos onde foi aplicado, além de alcançar um bom carreamento (Mardini et al., 1999, no prelo).

Nestes Estados, os simulídeos não têm o caráter de vetores de endemias, sendo alvo de vários programas de controle em função do desconforto causado à população humana, podendo ocasionar reações alérgicas (culicose) e dermatites em pessoas sensíveis (Araújo-Coutinho, 1995; Araújo-Coutinho & Lacey, 1990; Ruas Neto & Silveira, 1989; Ruas Neto & Oliveira, 1985).

No Recife, a partir de 1991, iniciou-se o uso de *Bs*, em escala-piloto, para o controle de *Culex quinquefasciatus*, vetor da filária *Wuchereria bancrofti*, que transmite a filariose linfática, doença também conhecida por "elefantíase". Nesta cidade – considerada como a possuidora de maior número de casos desta moléstia no Brasil e entre as de maior incidência no mundo – foi realizado um programa de controle integrado, baseado na aplicação de produtos experimentais não formulados, produzidos

localmente, assim como produtos comerciais formulados (Spherimos), à base de *Bs*. Este Programa Nacional de Controle da Filariose Linfática, desenvolvido pelo Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, durou dois anos e, ao final dos testes, houve uma redução drástica na densidade de larvas e adultos da espécie *Culex*, em áreas carentes da capital pernambucana, ocasionando um decréscimo significante no nível de microfilária na população humana local (Regis et al., 1995).

Em Minas Gerais, no início de 1996, um produto formulado à base de *Bs*, designado de SFEROBAC, foi aplicado no Córrego do Carrapato – na cidade de Montes Claros – e em Belo Horizonte, na Lagoa da Pampulha, visando ao controle de *Culex quinquefasciatus*. Este produto foi desenvolvido pela Fundação Oswaldo Cruz, em convênio com a INPAL S/A Indústrias Químicas, e os testes preliminares, levados a efeito pela Prefeitura Municipal de Montes Claros e pelo Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, forneceram bons resultados em ambas as áreas de aplicação do produto (Consoli et al., 1997).

PRODUÇÃO DE INSETICIDAS BACTERIANOS - UMA EXPERIÊNCIA PRÓPRIA

Os inseticidas industrializados com *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* IPS-82 e *B. sphaericus* 2362 necessitam de ser produzidos em fermentadores industriais de grande porte, porque é necessária a produção de grande quantidade de partículas de cristais de protoxina (δ-endotoxina). Portanto, é necessário obter-se toneladas de biomassas. A presença dos esporos num inseticida à base de *B. thuringiensis* pode não ser necessária, mas é importante no inseticida com *B. sphaericus*, pois nos envoltórios do esporo está a protoxina larvicida. Todavia, tratamentos nas biomassas para retirar ou inativar seletivamente os esporos encarecem o produto final, de modo que vários produtos apresentam os esporos viáveis.

Para a produção de biomassa altamente larvicida, ou seja, em que a concentração de protoxina seja elevada por unidade de peso seco, é necessário que várias condições sejam observadas.

Para tanto, podem ser destacadas (Rabinovitch et al., 1998b):

- A correta preservação e manutenção das cepas industriais de *B.*

thuringiensis e *B. sphaericus;*

- Adequada ativação das cepas e adequados dimensionamento e preparo do inóculo que irá para os reatores;
- Acerto da natureza dos nutrientes, ativadores enzimáticos e otimização da fórmula do meio de cultura industrial;
- Ajuste das condições de cultivo em escala industrial;
- Recuperação e concentração dos cristais de δ-endotoxinas existentes na biomassa;
- Formulação da biomassa e acondicionamento.

A preservação das cepas bacterianas pode ser feita, por exemplo, por liofilização de massas de esporos, suspensas em leite desnatado impregnando tiras de papel de filtro, estas conservadas em frascos-âmpola sob vácuo.

A ativação pode se dar em Caldo Nutriente (Difco ou similar) sob temperatura de 33°C que é a temperatura usual para todas as fermentações com estas bactérias.

O volume de inóculo deve permanecer ao redor de 1% do volume total do meio de cultura.

Na composição do meio industrial usam-se proteínas de soja (2% para *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* IPS-82 e 1% para *B. sphaericus* 2362); íons metálicos como Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+} e Ca^{2+} em concentrações ao redor de 0,5mg/l e extrato de lêvedo a 0,1%.

No meio de cultura para *B. thuringiensis* pode-se usar D(+) glucose a 0,3%. Para início de um estudo de otimização de processo, o pH inicial poderá ser de 7,5 - 8,0, mais agitação, taxa de aeração e tempo de fermentação de 500rpm, 0,5vvm e 24h, respectivamente.

A etapa do "scale up" e seus detalhamentos constituem segredo em muitas indústrias, assim como detalhes de recuperação e formulação das toxinas e esporos. Mas, como sugestão, operando um fermentador vertical de 3000l com 2/3 de sua capacidade e adotando um inóculo de 1%, aeração de 0,8vvm e agitação de 100rpm, o tempo de fermentação pode ser de 21h – 24h para ambas as bactérias, obtendo-se um pH final do mosto de 8,20 até 8,52 e um máximo de

esporulação (Rabinovitch et al., 1998b). As biomassas formuladas nestas condições podem apresentar $CL_{50} = 9,68 \pm 4,01 \mu g/l$ para *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* IPS-82 e $CL_{50} = 0,44 \pm 0,22 \mu g/l$ para *B. sphaericus* 2362, em média.

FORMULAÇÃO DE INSETICIDAS BACTERIANOS

As biomassas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* e *B. sphaericus*, uma vez separadas do meio fermentado, encerram um complexo de componentes orgânicos, dos quais os ativos contra larvas de culicídeos e simulídeos são as protoxinas (endotoxinas) e, em segundo plano, os respectivos esporos. As protoxinas, como proteínas, são mais sensíveis a alterações em suas estruturas químicas e assim se inativam ao longo do tempo. Essa inativação pode ser ajudada por agentes importantes como a água onde ficam suspensas, contaminação microbiana, oxigênio, radiação ultra-violeta, substâncias não enzimáticas que reacionam com proteínas, enzimas proteolíticas, temperatura excessiva, entre outros fatores.

Assim, a necessidade de proteger a integridade dos cristais de protoxinas tem importante papel na industrialização desses inseticidas, visando a preservar por um largo tempo a atividade biológica do produto comercial, esta representada pela concentração letal (CL em mg/l) e/ou pela potência (Unidades Tóxicas/mg).

Os componentes de uma formulação, que devem ser inativos contra larvas e que no total não devem ultrapassar a 2%, têm objetivos específicos que visam a:

- Evitar que a preparação se torne um meio de cultura para fungos e bactérias. Assim, as preparações secas ou úmidas (suspensões, emulsões, pastas, pós, grânulos, pastilhas) são adicionadas de conservantes como o sorbato de potássio, nipagin, nipazol, ácido benzóico, entre outros, substâncias usualmente encontradas em alimentos.
- Envolver os cristais de protoxinas, que serão ingeridos pelas larvas, sem aumentar prejudicialmente o tamanho da partícula (mais de 12μm), como derivados polivinílicos, acetatos de celulose, entre outros. Estes revestimentos ajudam a aumentar o tempo de permanência das partículas no criadouro do inseto, mas podem não ser digeridos rapidamente por

diferentes larvas de mosquitos. Daí poder-se usar intercaladamente aplicações de produtos com cristais recobertos e não recobertos (estes últimos de ação larvicida mais imediata).

- Provocar flutuação ou afundamento dos cristais de protoxina, em função do comportamento das larvas nos criadouros. Por exemplo, existem produtos com óleo mineral ou vegetal visando a auxiliar a flutuação, assim como os que encerram pó impalpável de diatomáceas (kieselguhr) para precipitação e arraste da protoxina.

É interessante assinalar que existem inseticidas comercializados dos quais se retirou a água que existiu na etapa de fermentação. A secagem é feita em equipamento tipo "spray dryer", visando a aumentar o "tempo de prateleira" e a resistência à temperatura ambiente na faixa de 40° C a 60° C.

Os inseticidas comercializados à base de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* e *B. sphaericus* (sobretudo o primeiro) podem ser encontrados nas formas de pós molháveis, concentrados emulsionados, grânulos e pastilhas revestidos ou não, suspensões aquosas e suspensões hidrooleosas.

Todavia, é importante mencionar que para tornar complexa uma formulação e uma forma de apresentação são necessárias várias operações unitárias e equipamentos especiais, havendo reflexo negativo no custo final do produto. Assim, as formulações concentradas que ainda contêm água residual, são mais econômicas e concorrem bem com os inseticidas químicos convencionais, já que são muito ativas em pequenas concentrações.

BIOENSAIOS COM INSETICIDAS BACTERIANOS

Os bioensaios realizados em algumas etapas da produção dos inseticidas bacterianos, visam a obter dados quantitativos e auxiliam a padronização do produto. Têm aplicação desde a pesquisa da atividade larvicida da bactéria entomopatogênica até a condição de produto industrial acabado. São úteis principalmente durante as fases de fermentação, separação das biomassas e de produto final. Portanto auxiliam o controle de qualidade dos inseticidas bacterianos e permitem o confronto de um produto com outro similar, por comparação de suas atividades larvicidas.

Os inseticidas preparados com *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* IPS-82 utilizam larvas de 4º estádio de *Aedes aegypti* para teste, enquanto que aqueles preparados com *B. sphaericus* 2362 são confrontados contra larvas de 4º estádio de *Culex quinquefasciatus*. Remetemos o leitor para a descrição dessas metodologias contidas nos documentos produzidos pela Organização Mundial da Saúde com a cooperação do Instituto Pasteur de Paris, que são, para *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*: WHO-TDR/VEC/SWG(5)81.3, Anexo V) e para o *B. sphaericus*: WHO-TDR/BCV/SPHAERICUS/85.3, Anexo II).

Ambos os métodos buscam a determinação da concentração letal cinqüenta por cento (CL_{50}) do inseticida, e a sua comparação com a CL_{50} de um pó-padrão liofilizado seja da cepa IPS-82 de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* ou, no outro caso, de *B. sphaericus* 2362. Esses padrões são obtidos no Instituto Pasteur de Paris, no Laboratório de Bactérias e Fungos Entomopatogênicos. Pela fórmula a seguir se obtêm as Unidades Tóxicas Internacionais ou Potência:

Para *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*:

$$\text{Potência do inseticida (UTI/mg)} = \frac{15.000 \text{ UTI/mg} \times CL_{50} \text{ do padrão}}{CL_{50} \text{ do inseticida}}$$

Para *B. sphaericus*:

$$\text{Potência do inseticida (UTI/mg)} = \frac{1.700 \text{ UTI/mg} \times CL_{50} \text{ do padrão}}{CL_{50} \text{ do inseticida}}$$

Deste modo, pode-se padronizar a Potência dos inseticidas, variando-se as quantidades dos componentes das formulações. A seguir, alguns exemplos de Potências de produtos comercializados:

PRODUTO	AGENTE BACTERIANO	POTÊNCIA (UTI/mg)
VECTOBAC-AS	*B. thuringiensis* sorovar *israelensis*	600
TEKNAR	*B. thuringiensis* sorovar *israelensis*	1.200
SPHERICO	*B. sphaericus*	1.700

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No Brasil, os inseticidas industrializados, elaborados com protoxinas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* e *B. sphaericus*, não têm sido utilizados na plenitude das vantagens que oferecem para o controle de vetores de interesse em saúde pública, bem como profilaxia de doenças tropicais. Perdem para os inseticidas convencionais, obtidos industrialmente por via de síntese orgânica, rotineiramente utilizados em grandes quantidades. Além disso, não existe uma política oficial estabelecida e praticada pelo governo federal que determine e estimule o emprego de inseticidas bacterianos consagrados, juntamente com outras medidas profiláticas de controle de vetores de doenças humanas.

No entanto, alguns Estados brasileiros conseguem manter isoladamente uma tradição ao longo de anos, como o Rio Grande do Sul, São Paulo e Pernambuco, que utilizam esses inseticidas microbianos industrializados, convenientemente padronizados e controlados quanto à qualidade. Nestes Estados, embora tais inseticidas não resolvam por si só a problemática dos vetores – pois o manejo deve figurar em qualquer planejamento de controle – eles têm demonstrado utilidade e segurança inquestionáveis, de modo a influir sobre outros membros da União, como Alagoas e Pará, que recebem apoio técnico de equipes especializadas na produção e controle de vetores da Universidade Federal de Pernambuco e do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, da Fundação Oswaldo Cruz .

A Fundação Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, através da Gerência Técnica de Entomologia e Pesquisa Operacional, reconhece a necessidade da "implantação do controle biológico em todos os programas de controle de doenças vetoriais em que a sua utilização seja possível" "...para os programas de Filariose, Dengue e Malária, pode-se contar com produtos eficazes para o controle dos respectivos vetores" (FNSS/CCDTV/DEOPE, 1999).

Finalmente, um levantamento feito em 1996, com dados aproximados e extra-oficiais acerca do consumo mínimo de inseticidas à base de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* e de *B. sphaericus,* abrangendo 11 Estados brasileiros, foi de 19. 000 litros/mês à época, com a sugestão de um mercado nitidamente em expansão. Todavia, até o presente não existe indústria no País com esta produtividade, necessária para atender ao mercado nacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAK, T.; MITTAL, P.K.; RAGHAVENDRA, K.; SUBBARAO, S.K.; ANSARI, M.A.; SHARMA, V.P. Resistance to **Bacillus sphaericus** in *Culex quinquefasciatus* Say 1823. **Current Science**, v.69, n.8 , p.695-698, 1995.

ALBUQUERQUE, M.F.M.; MARZOCHI, M.C.; XIMENES, R.A.A.; BRAGA, M.C.; SILVA, M.C.M.; FURTADO, A.F. Bancroftian Filariasis in Two Urban Areas of Recife, Brazil: The Role of individual Risk Factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.37, n.3, p. 225-233, 1995a.

ALBUQUERQUE, M.F.M.; MARZOCHI, M.C.; SABROZA, P.C.; BRAGA, M.C.; PADILHA, T.; SILVA, M.C.M.; SILAVA, M.R.F.; SCHINDLER, H.C.; MACIEL, M.A.; SOUA, W.; FURTADO, A.F. Bancroftian Filariasis in Two Urban Areas of Recife, Brazil: Pre-control Observations on Infection and Disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, p.373-377, 1995b.

ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C.; LACEY, L.A. Controle de simulídeos com concentrado emulsionável *de Bacillus thuringiensis*. **Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.108, n.3, p.213-219, 1990.

ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. Biological control program against simuliids in the State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, n.1, p.131-133, 1995.

BARJAC, H. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* very toxic for mosquitoes *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serotype 14. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences**, Paris, Série D. v.286, p.797-800, 1978.

BARJAC, H; FRACHON, E. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. **Entomophaga**, v.35, n.2, p. 233-240, 1990

BAUMANN, L.; BROADWELL, A.H.; BAUMANN, P. Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4 and 41.9-kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. **Journal of Bacteriology**, v.170, n.5 , p.2045-2050, 1988.

BAUMANN, P.; CLARK, M.A.; BAUMANN, L.; BROADWELL, A.H. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins. **Microbiological Reviews**, v.55, n.3 , p.425-436, 1991.

BEARZOTI, P.; LANE, E.; MENEZES Jr. Relato de um Caso de Oncocercose Adquirida no Brasil. **Revista Paulista de Medicina**, v.70, p.102, 1967.

BECKER, N. Mosquito control in West Germany. **Bulletin of the Society for Vector Ecology**, v. 8, p. 85-93, 1983.

BECKER, N. Microbial control of mosquitoes and black flies. In: Proceedings of International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, 5., 1990, Adelaide, Austrália. **Resumos**. Society for Invertebrate Pathology, 1990. p.84-89.

BECKER, N.; MARGALIT, J. Use of *Bacillus thuringiensis* against mosquitoes and black flies. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S.; eds. ***Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice**. Cambrige: John Willey & Sons, 1993. p.265-286.

BECKER, N., LUDWIG, M. Mosquito control in West Germany. **Bulletin of the Society for Vector Ecology**, v.8, n.2, p. 85-93, 1983.

BECKER, N.; LUDWIG, M. Investigations on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after a 10-year application on *Bacillus thuringiensis israelensis*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.9, n.2, p.221-224, 1993.

BECKER, N.; REITTICH, F. Protocol for the introduction of new *Bacillus thuringiensis israelensis* products into the routine mosquito control programme in Germany. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.10, p.527-533, 1994.

BECKER, N.; SCHÄDLER, P. The use of entomopathogenic bacteria against mosquitoes. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., 1998, Rio de Janeiro, RJ. **Resumos**. 1998. p.1-4.

BERRY, C. The binary and the 100-kDa Mtx toxins from *Bacillus sphaericus*. In: Proceedings of International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, 6., 1994, Montpellier, França. **Resumos**. Society for Invertebrate Pathology, 1994. p.197-200.

BUTKO, P.; HUANG, F.; PUSZTAI-CAREY, M.; SUREWICZ, W.K. Membrane permeabilization induced by cytolytic δ-endotoxin CytA from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Biochemistry**, v.35, p.11355-11360, 1996.

CAPALBO, D.M.F. *Bacillus thuringiensis*: fermentation process and risk assessment a short review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, n.1, p.135-138, 1995.

CENEPI - Centro Nacional de Epidemiologia, Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasil. **Boletim Epidemiológico**, Ano III, n.2, abril e maio, 1998.

CHARLES, J.-F.; NIELSEN-LEROUX, C.N.; DELÉCLUSE, A. *Bacillus sphaericus* toxin: molecular biology and mode of action. **Annual Review of Entomology**, v.41, p.451-472, 1996.

CHILCOTT, C.N.; KNOWLES, B.H.; ELLAR, D.J.; DROBNIEWSKI, F.A. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis israelensis* parasporal body. In: de BARJAC, H.; SUTHERLAND, D; eds. **Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies: Biochemistry, Genetics and Applications of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus***. New Jersey: University Press, 1990. p.45-65.

CHOW, E.; SINGH, G.J.P.; GILL, S.S. Binding and aggregation of the 25-kilodalton toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to cell membranes and alteration by monoclonal antibodies and amino acid modifiers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.11, p.2779-2788, 1989

CLAUS, D.; BERKELEY, R.C.W. Genus *Bacillus* In:. Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E.; Holt, J.G., eds. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, vol. 2, 1986. p.1104-1139.

COELHO, G.E.; VIEIRA, J.B.F.; OLIVEIRA, C.E.; FRANCISCO, D.A.; PINHEIRO, L.R. Atividades Preliminares de Controle e Tratamento da Oncocercose no Território Yanomami, Roraima, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, n.1, p. 69-72, 1997.

COELHO, G.E.; VIEIRA, J.B.F.; GARCIA-ZAPATA, M.T.A.; SCHUERTZ, J.C.M. Identificação de Áreas de Estratificação Epidemiológica no Foco de Oncocercose na Região Yanomami, Roraima, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.14, n.3, p. 607-611, 1998.

CONSOLI, R.A.G.B.; SANTOS, B.S.; LAMOUNIER, M.A.; SECUNDINO, N.F.C.; RABINOVITCH, L.; SILVA, C.M.B.; ALVES, R.S.A.; CARNEIRO, N.F.F. Efficacy of a new formulation of *Bacillus sphaericus* 2362 against *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae) in Montes Claros, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, n.4 , p.571-573, 1997.

COOPER, D. *Bacillus thuringiensis* toxins and mode of action. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.49, p.21-26, 1994.

COUTINHO, A.; MEDEIROS, Z.; DREYER, G. História da Filariose Linfática em Pernambuco. I. Aspectos Epidemiológicos e de Controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.29, n.6, p.607-612, 1996.

CRICKMORE, N.; BONE, E.J.; WILLIAMS, J.A.; ELLAR, D.J. Contribution of the individual components of the δ-endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.131, p.249-254, 1995.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.807-813, 1998.

DAI, S-M.; GILL, S.S. *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry IVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.23, n.2, p.273-283, 1993.

DAVIDSON, E.W.; MYERS, P. Parasporal inclusions in *Bacillus sphaericus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.10, p.261-265, 1981.

DAVIDSON, E.W. Biochemistry and mode of action of the *Bacillus sphaericus* toxins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, n.1, p.81-86, 1995.

DEAN, D.H.; RAJAMOHAN, F.; LEE, M.K.; WU, S-J.; CHEN, X.J., ALCANTARA, E.; HUSSSAIN, S.R. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins site-directes mutagenesis - a minireview. **Gene**, v.179, p.111-117, 1996.

DEANE, L.M. Malaria Vectors in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, suppl. II, p. 5-14, 1986.

de BARJAC, H. New facts and trends in bacteriological control of mosquitoes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84 Supl III, p.101-105, 1989.

de NARDO, E.A.B.; de MORAES, G.J., de SÁ, L.A.N. Regulamentação do uso de agentes microbianos de controle. In: ALVES, S.B., ed. **Controle Microbiano de Insetos.** Piracicaba: FEALQ, 1998. p.1119-1142.

de NARDO, E.A.B.; CAPALBO, D.M.F.; de OLIVEIRA, M.C.B.; de MORAES, G.J. eds. **Análise de Risco e Avaliação de Impacto Ambiental Decorrente do Uso de Agentes de Controle Biológico: Memória do Workshop**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1995.127p.

DROBNIEWSKI, F.A. A review – The safety of *Bacillus* species as insect vector control agents. **Journal of Applied Bacteriology**, v.76, p.101-109, 1994.

DU, C.; MARTIN, P.A.W.; NICKERSON, K.W. Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal **Bacillus thuringiensis** protein crystals. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.10, p.3847-3853, 1994.

DU, C.; NICKERSON, K.W. *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized Cry 1Ac toxin: physiological and pathogenic consequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.10, p.3722-3726, 1996.

ELLAR, D.J. Molecular genetics of **Bacillus thuringiensis** δ-endotoxins and toxin receptors. In: Proceedings of International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, 6., 1994, Montpellier, França. **Resumos**. Society for Invertebrate Pathology, 1994. p.10-15.

FNS – Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasil. In: **http:// www. fns.gov.br**, 1998.

FNSS/CCDTV/DEOPE, CC-003/1999 – Ministério da Saúde, Relatório Final da Oficina de Trabalho: O papel do controle biológico nos programas de controle de vetores, 26 a 31 de outubro de 1998, Belo Horizonte.

FURTADO, A.F.; REGIS, L.; MACIEL, M.A.; BRAGA, C.; ALBUQUERQUE, M.F.M.; LAPA, T.; SOUZA, W. Papel do Controle Biológico do Vetor, Culex quinquefasciatus, em um Projeto Bem Sucedido de Controle da Filariose Bancroftiana. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., 1998. Rio de Janeiro, RJ. **Resumos**. Rio de Janeiro: IOC-FIOCRUZ, 1998. p.452-455.

GEORGHIOU, G.P.; BAKER, J.; AL-KHATIB, Z.; MELLON, R.; MURRAY, C.; TRAN, H.; VASQUEZ, M.; PELSUE, F.; HAZELRIGG, J. Insecticide resistance in mosquitoes: research on new chemicals and techniques for management. In: **Mosquito Control Research**, Annual Report 1983, p.86-91. University of California.

GEORGHIOU, G.P. Resistance potential to biopesticides and consideration of countermeasures. In: CASIDA, J.E., ed. **Pesticides and alternatives: innovative chemical and biological approaches to pest control.** New York: Elsivier, 1990. p.409-420.

GEORGHIOU, G.P.; WIRTH, M.C. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.3 , p.1095-1101, 1997.

GILBERT, R.J. *Bacillus cereus* gastroenteritis. In: Riemann, H. & Bryan, F.L., eds. **Food-borne Infections and Intoxications**. London: Academic Press, 2nd ed, 1979. p.495-518.

GILBERT, R.J.; TURUNBULL, P.C.B.; PARRY, J.M. ; KRAMER, J.M. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species: their part in food poisoning and other clinical infections. In: Berkeley, R.C.W. & Goodfellow, M., eds. **The Aerobic Endospore-Forming Bacteria: Classification and Identification**. London: Soc. Gen. Microbiology, Acad. Press Inc., 1981. p.297-314.

GILBERT, R.J.; KRAMER, J.M. *Bacillus cereus* enterotoxins: present status. **Biochemical Society Transactions**, 604th meeting, v.12, p.198-200, 1984.

GILBERT, R.J.; KRAMER, J.M. *Bacillus cereus* food poisoning. In: Cliver, D.O. & Cochrane, B.A., eds. **Progress in Food Safety.** Madison: Food Research Institute, 1986. p.85-93.

GILL, S.S. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, n.1 , p.69-74, 1995.

GILL, S.S.; COWLES, E.A.; PIETRANTONIO, P.V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of Entomology**, v.37, p.615-636, 1992.

GOLDBERG, L.J.; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Culex univitattus, Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosquito News**, v.37, n.3, p.355-358, 1977.

GOLDMAN, I.F.; ARNOLD, J.; CARLTON, B.C. Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.47, p.317-324, 1986.

GROCHULSKI, P.; MASSON, L.; BORISONA, S.; PUSZTAI-CAREY, M.; SCHWARTZ, J-L; BROUSSEAU, R.; CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* Cry IA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **Journal of Molecular Biology**, v.254, p.447-464, 1995.

HAIDER, M.Z.; ELLAR, D.J. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ-endotoxin: interaction with phospholipid vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.978, p.216-222, 1989.

HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSENS, S.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America**, v.85, p.7844-7848, 1988.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v.53, n.2 , p.242-255, 1989.

HODGMAN, T.C.; ELLAR, D.J. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins determined by compilational analysis. **DNA Seq.**, v.1, p.97-106, 1990.

HONÉE, G.; VISSER, B. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. Entomologia **Experimentalis et Applicata**, v.69, p.145-155, 1993.

HOUGARD, J.M. The Use of *B.t.i.* in the Onchocerciasis Control Programme in West Africa. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., 1998. Rio de Janeiro, RJ. **Resumos**. Rio de Janeiro: IOC-FIOCRUZ, 1998. p.38-40.

KELLEN, W.R.; CLARK, T.B.; LINDEGREN, J.E.; HO, B.C.; ROGOFF, M.H. ; SINGER, S. *Bacillus sphaericus* Neide as pathogen of mosquitoes. **Journal of Invertebrate Patholology**, v.7, p.442-448, 1965.

KLEIN, D.; YANAI, P.; HOFSTEIN, R.; FRIDLENDER, B.; BRAUN, S. Production of *Bacillus sphaericus* larvicide on industrial peptones. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v.30, p.580-584, 1989.

KNOWLES, B.H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ-endotoxin. **Advances in Insect Physiology**, v.24, p.275-308, 1994.

KNOWLES, B.H.; ELLAR, D.J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins with different insect specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.924, p.509-518, 1987.

KNOWLES, B.H.; DOW, J.A.T. The crystal δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. **BioEssays**, v.15, n.7, p.469-476, 1993.

KONI, P.A.; ELLAR, D.J. Cloning and characterizatiom of a novel *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxin. **Journal of Molecular Biology**, v.229, p.319-327, 1993.

KONI, P.A.; ELLAR, D.J. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic δ-endotoxins. **Microbiology**, v.140, p.1869-1880, 1994.

KUMAR, P.A.; SHARMA, R.P.; MALIK, V.S. The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Advances in Applied Microbiology**, v.42, p.1-43, 1996.

KURTAK, D.; BACK, C.;CHALIFOUR, A.; DOANNIO, J.; DOSSOU-YOVO, J.; DUVAL, J.; GUILLET, P.; MEYER, R.; OCRAN, H.; WAHLE, B. Impact of *B.t.i.* on black-fly control in the Onchocerciasis Control Programme in West Africa. **Israel Journal of Entomology**., v.23, p.21-38, 1989.

LACEY, L.A.; ORR, B.K. The role of biological control of mosquitoes in integrated vector control. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.50, n.6, p.97-115, 1994.

LECADET, M.-M.; COSMAO-DUMANOIR, V. ; HAMON, S. ; FRACHON, E. ; RIPOUTEAU, H. **Catalogue of Strains n° 1**, IEBC - Collection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* classified by "H" serotypes, Paris: WHO - Collaborating Centre, Inst. Pasteur , 1996.

LEE, M.K.; YOU, T.H.; YOUNG, B.A.; COTRILL, J.A.; VALAITIS, A.P.; DEAN, D.H. Aminopeptidase N purified from gypsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thu*ringiensis Cry IAc toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.8, p.2845-2849, 1996.

LERECLUS, D.; BOURGOUIN, C. LECADET, M.M.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Role, structure and molecular organization of the genes coding for the parasporal δ-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: SMITH,, I.; SLEPECKY, R.A.; SETLOW, P.; eds. **Regulation of Procaryotic Development**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1989. p.255-276.

LI, J.; CARROLL, J.; ELLAR, D.J. Crystal structure of insecticidal δ-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 A° resolution. **Nature**, v.353, p.815-821, 1991.

LI, J.; KONI, P.A.; ELLAR, D.J. Structure of the mosquitocidal δ-endotoxin Cyt B from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. **Journal of Molecular Biology**, v.257, n.1, p.129-152, 1996.

LIU, J-W.; HINDLEY, J.; PORTER, A.G.; PRIEST, F.G. New high-toxicity mosquitocidal strains of *Bacillus sphaericus* lacking a 100-kilodalton-toxin gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.10, p.3470-3473, 1993

LIU, J-W.; PORTER, A.G.; WEE, B.Y.; THANABALU, T. New gene from nine *Bacillus sphaericus* strains encoding highly conserved 35.8-kilodalton mosquitocidal toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.6., p.2174-2176, 1996.

LUFT, P. Mosquitoes and Dengue. In: **http:// www. Biohaven.com/dengue.html**, 1996.

MACIEL, A.; ROCHA, A.; MARZOCHI, K.B.F.; MEDEIROS, Z.; CARVALHO, A.B.; REGIS, L.; SOUZA, W.; LAPA, T.; FURTADO, A. Epidemiological Study of Bancrofti Filariasis in Recife, Northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, n.4, p. 449-455, 1996.

MARDINI, L.B.L.F.; SOUZA, M.A.T.; RABINOVITCH, L.; ALVES, R.S.A.; SILVA, C.M.B. Estudos em campo do larvicida bacteriano INPALBAC para o controle de *Simulium* sp. no Rio Grande do Sul, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94 (in press), 1999.

MARGALIT, J. ; DEAN, D. H. The story of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*B.t.i.*). **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.1, p.1-7, 1985.

MARQUES, A.C. Migrations and Dissemination of Malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, suppl. II, p. 17-30, 1986.

MOLLOY, D.; JAMNBACK, H. Field evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a black fly biocontrol agent and its effect on nontarget stream insects. **Journal of Economic Entomology**, v.74, n.3, p.314-318, 1981.

MORAES, M.A.P., CHAVES, G.M. Oncocercose no Brasil. Novos Achados entre os Índios Ianomamas. **Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.77, n.1, p.1-5, 1974.

MORAES, M.A.P.; CALHEIROS, L.B.; PORTO, M.A.S.; SHELLEY, A.J. Novas Observações Sobre o Foco de Oncocercose do Rio Auaris, Território de Roraima. **Boletin Epidemiológico da Fundação SESP**, v.9, p.13-16, 1977a.

MORAES, M.A.P.; CALHEIROS, L.B.; PORTO, M.A.S.; SHELLEY, A.J. Oncocercose no Território de Roraima: Resultados das Investigações feitas nos Rios Mucajaí e Catrimani, em janeiro de 1977. **Boletim Epidemiológico da Fundação SESP**, v.9, p.119-124, 1977b.

MORAES, M.A.P. Oncocercose: Novos Focos no Brasil ? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.19, p. 67-68, 1986.

MULLA, M.S. Activity, field efficacy, and use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes. In: de BARJAC, H.; SUTHERLAND, D; eds. **Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies: Biochemistry, Genetics and Applications of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus***. New Jersey: University Press, 1990. p.134-160.

MULLA, M.S.; DARWAZEH, H.A.; DAVIDSON, E.W.; DULMAGE, H.T.; SINGER, S. Larvicidal activity and field efficacy of *Bacillus sphaericus* strains against mosquito larvae and their safety to nontarget organisms. **Mosquito News**, v.44, n.3, p.336-342, 1984.

NICOLAS, L. Bacteriological control of mosquitoes and blackflies: Present aspects and pespective of research. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília: EMBRAPA, v.27, s/n, p.37-46, 1992.

NIELSEN-LEROUX, C. The appearance of resistance to *Bacillus sphaericus* in mosquito control programs. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., 1998, Rio de Janeiro, RJ. **Resumos**. Rio de Janeiro: IOC-FIOCRUZ, 1998. p.47-52.

NIELSEN-LEROUX, C. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* toxins. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu, PR. **Resumos**. Curitiba: EMBRAPA/CNPSo, 1996. p.264-269.

NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J.-F.; THIÉRY, I.; GEORGHIOU, G.P. Resistance in a laboratory population of *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut brush-border membranes. **European Journal of Biochemistry**, v.228, p.206-210, 1995.

NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J.-F.; GEORGHIOU, G.P.; SILVA-FILHA, M.H.; REGIS, L. Mechanism of resistance of mosquito larvae *to Bacillus sphaericus* binary toxin. In: Proceedings of International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, 6., 1994, Montpellier, França. **Resumos**. Society for Invertebrate Pathology, 1994. p.201-206.

NOBRE, A.; ANTEZANA, D.; TAUIL, P.L. Febre Amarela e Dengue no Brasil: Epidemiologia e Controle. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v.27, suplemento III, p.59-66, out-dez, 1994.

OEI, C.; HINDLEY, J.; BERRY, C. Binding of purified *Bacillus sphaericus* binary toxin and its deletion derivates to *Culex quinquefasciatus* gut: elucidation of functional binding domains. **Journal of General Microbiology**, v.138, p.1515-1526, 1992.

OLIVEIRA, E.J.; RABINOVITCH, L. A standardized protocol for the rapid detection of gelatin hydrolysis of *Bacillus sphaericus*. **Israel Journal of Entomology**, Bet Dagan, v.32 (in press), 1998.

PORTER, A.G. Mosquitocidal toxins, genes and bacteria: the hit squad. **Parasitology Today**, v.12, n.5 , p.175-179, 1996.

PORTER, A.G.; DAVIDSON, E.W.; LIU, J-W. Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. **Microbiological Reviews**, v.57, n.4, p.838-861, 1993.

PRIEST, F.G.; de MURO, M.A. Mosquitocidal *Bacillus sphaericus* strains, new varieties from the environment and laboratory. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu, PR. **Resumos**. Curitiba: EMBRAPA/CNPSo, 1996. p.310-316.

PRIEST, F.G. Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.72, p.357-369, 1992.

RABINOVITCH, L. Situação atual e necessidade de pesquisa de controle biológico de vetores de importância para a saúde pública. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.1, n.1, p.42-45, 1997.

RABINOVITCH, L; CAVADOS, C.F.G.; LIMA, M.M. Dos *Bacillus* entomopatogênicos, o que se espera? **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.6, p.40-41, 1998a.

RABINOVITCH, L; SILVA, C.M.B.; ALVES, R.S.A.; CONSOLI, R.A.G.B.; SANTOS, B.S.; LAMOUNIER, M.A. Produção de bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* e *Bacillus sphaericus*. In: Simpósio de Controle Biológico, 6., 1998. Rio de Janeiro, RJ. **Resumos**. 1998b. p. 479-483.

RAO, D.R.; MANI, T.R.; RAJENDRAN, R.; JOSEPH, A.S.; GAJANANA, A.; REUBEN, R. Development of high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.11, n.1, p.1-5, 1995.

RASSI, B.E.; LACERDA, N.; GUIMARÃES, J.A. Estudio de uma Zona de Oncocercosis em Brasil: Encuesta Realizada em Residentes Locales. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.80, p. 288-301, 1976.

RAVOAHANGIMALALA, O.; CHARLES, J.-F; SCHOELLER-RACCAUD, J. Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* toxins in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae (Díptera: Culicidae). **Research in Microbiology**, v.144, p.271-278, 1993.

RAVOAHANGIMALALA, O.; CHARLES, J-F. *In vitro* binding of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* individual toxins to midgut cells of *Anopheles gambiae* larvae (Díptera: Culicidae). **FEBS Letters**, v.362, p.111-115, 1995.

REGIS, L. Uso de Bactérias Entomopatógenas como Estratégia de Controle do Vetor da Filariose Linfática no Recife. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., 1998. Rio de Janeiro, RJ. **Resumos**. Rio de Janeiro: IOC-FIOCRUZ, 1998. p.448-451

REGIS, L.; SILVA-FILHA, M.H.N.L.; OLIVEIRA, C.M.F.; RIOS, E.M.; SILVA, S.B.; FURTADO, A.F. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, n.1, p.115-119, 1995.

RIPPERE, K.E.; JOHNSON, J.L.; YOUSTEN, A.A. DNA similarities among mosquito-pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, n.1 ,p.214-216, 1997.

ROBERTSON, S.E.; HULL, B.P.; TOMORI, O., BELE, O.; LeDUC, J.W.; ESTEVES, K. Yellow Fever - A Decade of Reemergence. **Journal of American Medical Association**, v.276, n.14, p.1157-1162, 1996.

ROCHA, E.M.M.; FONTES, G. Filariose Bancroftiana no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.32, n.1, p.98-105, 1998.

RUAS NETO, A.; SILVEIRA, S.M. Uso de inseticidas bacterianos para o controle de culicídeos e simulídeos no Rio Grande do Sul. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, Supl. III, p.39-45, 1989.

RUAS NETO, A.; OLIVEIRA, C.M. Controle biológico de culicídeos e simulídeos: inseticidas bacterianos. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v.37, p.61-75, 1985.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.775-806, 1998.

SEAWARD, M.R.S.; CROSS, T.; UNSWORTH, B.A. Viable bacterial spores recovered from an archacological excavation. **Nature**, London, v.261, p. 407-408, 1976.

SIEGEL, J.P.; SHADDUCK, J.A. Mammalian safety of *Bacillus sphaericus* In: de BARJAC, H.; SUTHERLAND, D; eds. **Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies: Biochemistry, Genetics and Applications of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus***. New Jersey: University Press, 1990b. p.321-331.

SIEGEL, J.P.; SHADDUCK, J.A. Mammalian safety of *Bacillus thuringiensis israelensis*. In: de BARJAC, H.; SUTHERLAND, D; eds. **Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies: Biochemistry, Genetics and Applications of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus***. New Jersey: University Press, 1990a. p.202-217.

SILVA, K.R.A.; MEIRELLES, M.N.S.L.; RABINOVITCH, L. Ultrastructural and entomotoxic aspects of *Bacillus sphaericus* strains isolated from Brazilian soils. **Israel Journal of Entomolology**, Bet Dagan, v.32 (in press), 1998.

SILVA-FILHA, M.H. Aspectos do uso do entomopatógeno *Bacillus sphaericus* no controle de *Culex quinquefasciatus* say (Díptera): efeitos a longo termo e desenvolvimento de resistência. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, 1994. 158p. Dissertação, Mestrado.

SILVA-FILHA, M.H.; REGIS, L.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J.-F. Low-level resistance *to Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae). **Journal of Economic Entomology**, v.88, n.3, p.525-530, 1995.

SING, G.J.; GILL, S.S. An electron microscope study of the toxic action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.52, p.237-247, 1988.

SINGER, S. *Bacillus sphaericus* for the control of mosquitos. **Biotechnology and Bioengeneering**, v.222, p.1331-1335, 1980.

SLEPECKY, R.A; LEADBETTER, E.R. On the prevalence and roles of sporeforming bacteria and their spores in nature. In: Hurst , A. & Gould, G. W. eds. **The Bacterial Spore**. v.2, London: Academic Press, 1983. p.79-99.

SNEATH, P.H.A . Longevity of micro-organisms. **Nature**,. London, v.195, p.643-646, 1962.

TABASHNIK, B.E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v.39, p.47-79, 1994.

TDR - Tropical Diseases, Progress in International Research, 1987-1988. **Ninth Programme Report of the UNDP/ World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**. Malaria, p. 43-54; Filariasis, p. 63-72, World Health Organization, Geneva, 1989.

TDR - Tropical Diseases, Progress in International Research, 1989-1990. **Tenth Programme Report of the UNDP/ World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**. Malaria, p. 29-40; Lymphatic Filariasis and Onchocerciasis, p. 49-58, World Health Organization, Geneva, 1991.

TDR - Tropical Disease Research, Progress 1991-1992. **Eleventh Programme Report of the UNDP/World Bank/Who Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**. Lymphatic Filariasis and Onchocerciasis, p. 37-46; Biological Control of Vectors, p.93-97, World Health Organization, Geneva, 1993.

THANABALU, T.; PORTER, A.G. A *Bacillus sphaericus* gene encoding a novel type of mosquitocidal toxin of 31.8kDa. **Gene**, v.170, p.85-89, 1996.

THANABALU, T.; BERRY, C.; HINDLEY, J. Cytotoxicity and ADP-ribosylating activity of the mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1: possible roles of the 27-and-70-kilodalton peptides. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.8, p.2314-2320, 1993.

TRAVERS, R.S.; MARTIN, P.A.W.; REICHELDERFER, C.F. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.10, p.1263-1266, 1987.

VAN RIE, J.; JANSENS, S.; HÖFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. **European Journal of Biochemistry**, v.186, p.239-247, 1989.

VAN RIE, J.; JANSENS, S.; HÖFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinats of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.5, p.1378-1385, 1990.

VASCONCELOS, P.F.C.; RODRIGUES, S.G.; DEGALIER, N.; MORAES, M.A.P.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; MONDET, B.; BARROS, V.L.R.S.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. An Epidemic of Sylvatic Yellow Fever in the Southeast Region of Maranhão State, Brazil, 1993-1994: Epidemiologic and Entomologic Findings. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.57, n.2, p.132-137, 1997.

VASQUEZ-GARCIA, M. Investigations of the potentiality of resistance to *Bacillus thuringiensis* ser. H-14 in *Culex quinquefasciatus* through accelerated selection pressure in the laboratory. Ph. D. Dissertation, University of California, Riverside. 1983

WEISER, J. A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from northern Nigeria. **Zentralblatt fur Mikrobiologie**, v.139, p.57-60, 1984.

WIRTH, M.C.; GEORGHIOU, G.P. Cross-resistance among CryIV toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae). **Journal of Economic Entomology**, v.90, n.6, p.1471-1477, 1997.

WIRTH, M.C.; GEORGHIOU, G.P.; FEDERICI, B.A. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America**, v.94, p.10536-10540, 1997.

WIRTH, M.C.; DELÉCLUSE, A.; FEDERICI, B.A,; WALTON, W.E. Variable cross-resistance to Cry11B from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Culex quinquefasciatus* (Díptera:Culicidae) resistant to single or multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.11, p.4174-4179, 1998.

WU, D.; DEAN, D.H. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* cry III A δ-endotoxin. **Journal of Molecular Biology**, v.255, p.628-640, 1996.

YOUSTEN, A.A. Mosquitocidal toxins from bacteria of the genus *Bacillus*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu, PR. **Resumos**. Curitiba: EMBRAPA/CNPSo, 1996. p.304-309.

YOUSTEN, A.A.; BENFIELD, E.F.; CAMPBELL, R.P.; FOSS, S.S.; GENTHNER, F.J. Fate of *Bacillus sphaericus* 2362 spores following ingestion by nontarget invertebrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.58, p.427-435, 1991.

2

CONTROLE BIOLÓGICO DE FITONEMATÓIDES POR *PASTEURIA* SPP.

Leandro Grassi de Freitas
Regina M. D. Gomes Carneiro

INTRODUÇÃO

Nematóides parasitas de plantas causam perdas estimadas em 12% na produção agrícola, sendo que aproximadamente 9% ocorrem em países desenvolvidos e cerca de 15% em países em desenvolvimento, representando cerca de 100 bilhões de dólares de prejuízo anual, em todo o mundo (Sasser e Freckman, 1987). A partir da década de 80, com a retirada de vários nematicidas do mercado, devido à persistência no solo, à contaminação da água de lençóis freáticos e aos efeitos prejudiciais aos seres humanos e à fauna do planeta, esforços têm sido concentrados para a utilização de agentes de controle biológico dentro de estratégias de controle integrado de nematóides (Jatala, 1985).

Mais de 200 diferentes organismos são considerados inimigos naturais dos fitonematóides, como fungos, bactérias, nematóides predadores, tardígrados, copepodes, colêmbolas e ácaros (Poinar & Jahnsson, 1988a,1988b; Kerry, 1990). Dentre esses, as bactérias Gram positivas e formadoras de endósporos do gênero *Pasteuria* Metchnikoff 1888 (Starr & Sayre, 1988) são consideradas por muitos pesquisadores como um dos mais promissores agentes de controle biológico de nematóides, não só pela agressividade, mas também devido à rusticidade (Stirling, 1984; Brown et al., 1985; Stirling, 1985; Sayre, 1986; Bird & Brisbane, 1988). A sobrevivência prolongada dos endósporos no solo, resistência ao calor e à dessecação,

inocuidade ao homem e a outros animais, e o possível uso em conjunto com práticas culturais são as principais vantagens deste microrganismo (Dutky & Sayre, 1978; Mankau, 1980; Stirling & Wachtel, 1980; Stirling et al., 1986; Sayre & Starr, 1988; Stirling, 1988; Oostendorp et al., 1990).

HISTÓRICO E TAXONOMIA

Cobb (1906) foi o primeiro pesquisador a relatar *Pasteuria* spp. parasitando um nematóide, *Dorylaimus bulbiferus*, porém ele a classificou erroneamente como esporozoário. Thorne (1940), também a considerou um protozoário, mas a descreveu como *Duboscqia penetrans* devido à semelhança que possuía com o organismo parasita de nematóides descrito por Micoletzky em 1929. Resultados de estudos ultra-estruturais em microscopia eletrônica levaram Mankau (1975) a reclassificar o organismo como procariota, mais especificamente como membro do gênero *Bacillus* (Sturhan, 1985). A redescoberta de *Pasteuria ramosa* Metchnikoff 1888 por Sayre et al. (1977) e a similaridade morfológica com *Bacillus penetrans* sugeriram que estas duas bactérias tivessem um relacionamento genérico em comum. Depois de extensivos estudos, Sayre & Starr (1985) foram levados a designar o organismo que parasitava *Meloidogyne incognita* como *Pasteuria penetrans* (Thorne, 1940) Sayre & Starr, 1985.

Segundo normas do Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (Lapage et al., 1975), o nome específico *Pasteuria penetrans* deve ser empregado para os isolados de *Pasteuria* spp. que se aderem e infectam nematóides da espécie *M. incognita*, hospedeiro tipo da bactéria usada na descrição original por Sayre & Starr (1985). Entretanto, isolados de *Pasteuria* spp. que parasitam *M. incognita* também parasitam outras espécies de *Meloidogyne* e vice-versa (Gowen & Ahmed, 1990). Portanto, o termo *P. penetrans* vem sendo empregado na literatura para designar a bactéria com esporângio na forma de xícara e endósporos elipsoidais, amplamente elípticos em corte, primariamente parasitas de nematóides das galhas, gênero *Meloidogyne*, e não exclusivamente de *M. incognita* (Stirling et al., 1986; Fattah et al., 1989; Minton & Sayre, 1989; Williams et al., 1989; Daudi, et al., 1990; Shahzad et al., 1990; Stirling et al., 1990; Madulu et al., 1990; Oostendorp et al., 1990; Hatz

& Dickson, 1992; Ciancio et al., 1992; Vovlas et al., 1993; Chen et al., 1994; Serracin et al., 1994; Singh & Dhawan, 1994; Tzortzakakis et al., 1994; Ciancio, 1995b; Weibelzahl-Fulton et al., 1996; Chen et al., 1996, 1997; Chen & Dickson, 1997; Freitas, 1997; Giannakou et al., 1997). Sayre & Starr (1985) e Starr & Sayre (1988) recomendam que o termo *P. penetrans* seja empregado com o significado de "membros do grupo *Pasteuria penetrans*". .

Duas outras espécies de *Pasteuria* foram descritas com base em suas características morfológicas, morfométricas e de gama de hospedeiros: *P. thornei* Starr & Sayre (1988), parasita dos nematóides das lesões das raízes, *Pratylenchus brachyurus* e *P. nishizawae* Sayre, Wergin, e Starr, 1991, parasita de nematóides formadores de cistos *Heterodera elachista*, *Heterodera glycines* e de *Globodera rostochiensis* (Sayre et al., 1991). Várias populações de *Pasteuria* spp. têm sido observadas parasitando e suprimindo populações de nematóides de cistos. Um grupo, o qual foi observado parasitando *Heterodera avenae, H. cajani, H. sorghi,* e *H. zeae,* segue um ciclo de vida similar àquele da *P. penetrans* em nematóides das galhas (Battacharya & Swarup, 1988; Sharma & Swarup, 1988); mas outra *Pasteuria* sp., parasita de *H. goettingiana*, completa seu ciclo de vida no juvenil de segundo estágio (Sayre et al., 1990; Sturhan e Winkelheide, 1990). Um outro isolado de *Pasteuria* spp., parasita de *Belonolaimus longicaudatus*, e não parasita de *Meloidogyne* spp., possui morfologia diferente das outras espécies de *Pasteuria* (Giblin-Davis et al., 1990, 1995).

Um fator que pode estar relacionado com a especificidade entre *Pasteuria* spp. e gêneros de nematóides hospedeiros é o tamanho do endósporo. Ciancio (1995) observou que as dimensões dos endósporos são diretamente correlacionadas com a espessura da cutícula, da hipoderme e da camada de músculos somáticos de seus nematóides hospedeiros e, portanto, a diferença em morfologia deve ser uma adaptação evolucionária. A taxonomia de *Pasteuria* spp., até agora baseada em morfologia, morfometria e gama de hospedeiros, deve fundamentar-se em caráteres mais homogêneos, como seqüência genética ou requerimentos metabólicos, uma vez que isolados com variada especificidade podem ser encontrados em uma ou mais espécies de *Pasteuria*.

BIOLOGIA

Ciclo de vida de *Pasteuria Penetrans*

Os endósporos de *P. penetrans* são estruturas unicelulares resistentes e sem motilidade (Fig. 1), que permanecem dormentes no solo até que o juvenil de segundo estádio do nematóide das galhas (J2), ao se locomover, entre em contato com eles. Após o contato, os endósporos aderem-se à cutícula do J2 (Fig. 2 A) e são carregados para o interior da planta quando ele penetra na raiz. Após o estabelecimento do sítio de alimentação do J2 no interior da raiz, um tubo germinativo sai da base do endósporo da bactéria e perfura a cutícula, a hipoderme e os músculos somáticos do nematóide até atingir o pseudoceloma. A extremidade do tubo germinativo ramifica-se dicotomicamente formando um micélio septado e dá origem a microcolônias vegetativas (Fig. 2 B), que se dividem em novas colônias. Durante o desenvolvimento, as colônias fragmentam-se e as células terminais engrossam-se (Fig. 2 C, D), dando origem aos endósporos, que amadurecem no interior da fêmea do nematóide (Fig 2 E) (Mankau, 1975; Mankau & Imbriani, 1975). O desenvolvimento da bactéria ocorre, na maioria das vezes, em sincronia com o desenvolvimento do nematóide das galhas, dentro do sistema radicular, e depende da temperatura (Stirling, 1981). Mais de 2 milhões de endósporos são produzidos em uma fêmea de *Meloidogyne* spp. parasitada (Fig. 3)(Sturhan, 1985; Sayre et al., 1991). Os endósporos são liberados com a morte e decomposição da fêmea do nematóide e dispersam-se primeiramente por percolação da água e por cultivo do solo (Sturhan, 1985). Em culturas perenes, podem-se observar os lóculos vazios em galhas velhas, onde fêmeas com *P. penetrans* morreram e foram decompostas (figura 4).

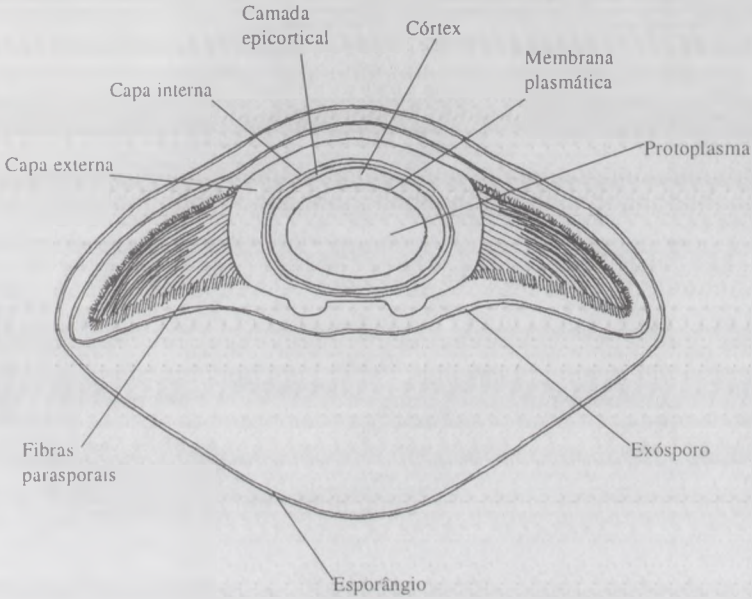


FIGURA 1. Desenho esquemático da morfologia do endósporo de *Pasteuria penetrans*.

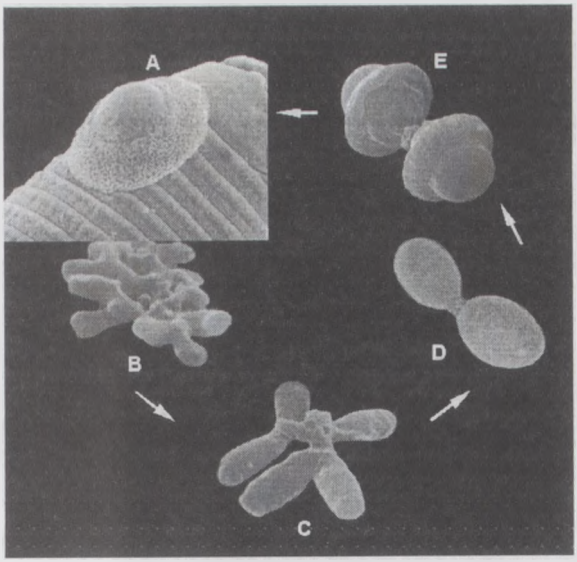


FIGURA 2. Micrografia eletrônica de varredura de *Pasteuria penetrans* em diferentes estádios do ciclo de vida. (A) Endósporo maduro de *P. penetrans* adere-se ao nematóide e penetra a cutícula. (B) Micélio bacteriano desenvolve-se em microcolônias vegetativas no interior do nematóide. (C) As microcolônias fragmentam-se e as extremidades se engrossam. (D) Células terminais assumem forma arredondada devido à formação dos endósporos. (E) Fibras parasporais são formadas e endósporos maduros são liberados ao solo, completando o ciclo da bactéria.

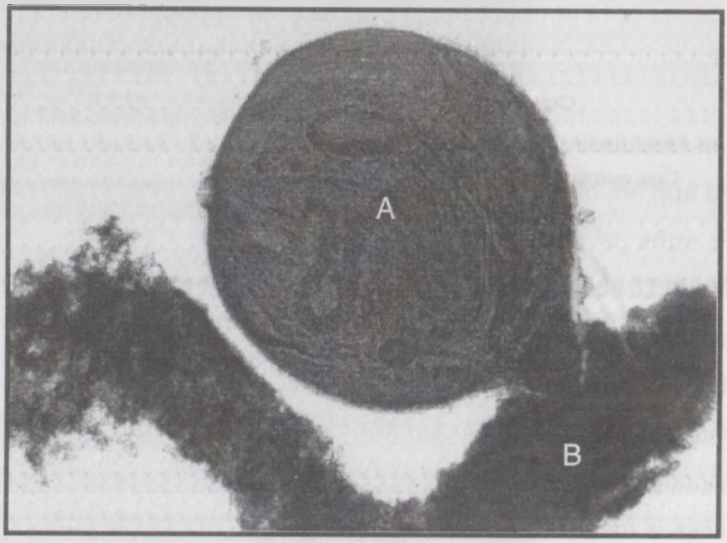


FIGURA 3. Micrografia de uma fêmea de *Meloidogyne* spp. (A), e de cerca de 2 milhões de endósporos de *Pasteuria penetrans* saindo do seu interior (B).

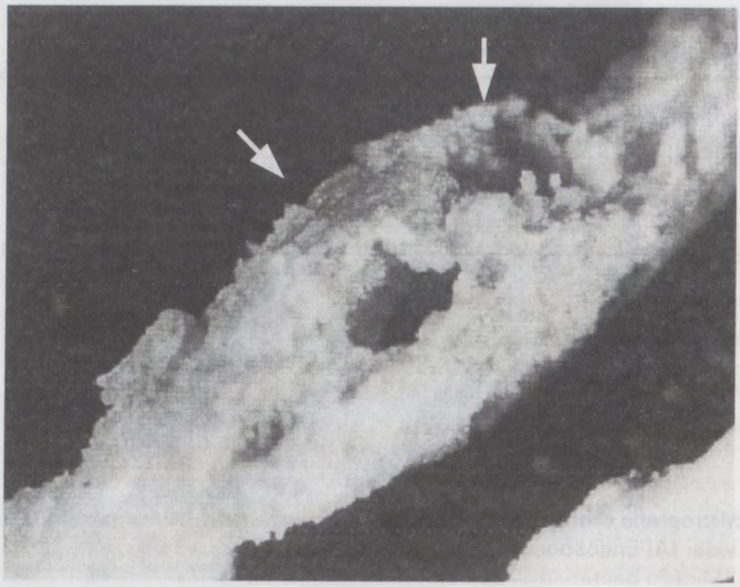


FIGURA 4. Raiz de jaborandi, *Pilocarpus microphyllus*, apresentando lóculos deixados por fêmeas de *Meloidogyne* spp. após estas entrarem em decomposição e os endósporos de *P. penetrans* serem liberados ao solo.

Carneiro et al. (1999) observaram a adesão de endósporos de um isolado de *P. penetrans* em machos de *M. hapla*, mas não em machos de outras cinco espécies de *Meloidogyne* testadas, ou em J2 de *M. hapla*. Os endósporos desse isolado germinaram, mas a maioria não foi capaz de penetrar a cutícula dos machos de *M. hapla*, e, como conseqüência, os tubos germinativos emergiram entre a borda do perispório e a cutícula do nematóide. Poucos endósporos foram capazes de penetrar o nematóide, e os machos infectados morreram após 10 a 15 dias de incubação, não havendo tempo suficiente para o desenvolvimento completo da bactéria. Hatz & Dickson (1992) observaram endósporos maduros no interior de machos de *M. arenaria*, mas a adesão dos endósporos e a penetração dos tubos germinativos ocorreram no estádio de J2, sendo que estes se transformaram em machos pelo processo de reversão sexual após algum tipo de estresse.

A esporogênese em *Pasteuria* spp. é similar à de outras bactérias gram positivas. Chen et al. (1997) compararam o processo de formação de endósporos de *Pasteuria penetrans* com a de *Bacillus thurigiensis* e dividiram este processo em sete estádios (Fig. 5). No estádio 1, ocorre o engrossamento das células terminais da microcolônia de *Pasteuria penetrans*, o que não ocorre em *B. thurigiensis*. Os demais estádios são muito semelhantes entre os dois organismos. No estádio 2, ocorre a formação de um septo, que no estádio 3 engloba o endósporo. Nos estádios 4, 5 e 6 ocorre a formação da capa do endósporo, do córtex e do exósporo e no estádio 7 ocorre a maturação do endósporo. Apesar de diferenças marcantes na morfologia dos gêneros *Pasteuria* e *Bacillus* e da penetração do hospedeiro por um tubo germinativo em *Pasteuria* spp. não ocorrer em *Bacillus* spp., estes gêneros parecem ser parentes próximos. Ebert et al. (1996) sequenciaram a molécula de rDNA 16S de *Pasteuria ramosa* e, através de análises filogenéticas, constataram que esta espécie está no grupo das bactérias gram positivas com baixo teor de C + G, estando mais próxima de *Bacillus tusciae, Alicyclobacillus cycloheptanicus* e *A. acidocaldarius*. Apesar de sua fase de crescimento miceliano, os resultados obtidos por Ebert et al (1996) refutam a classificação de *Pasteuria* como um actinomiceto da ordem Actinomycetales.

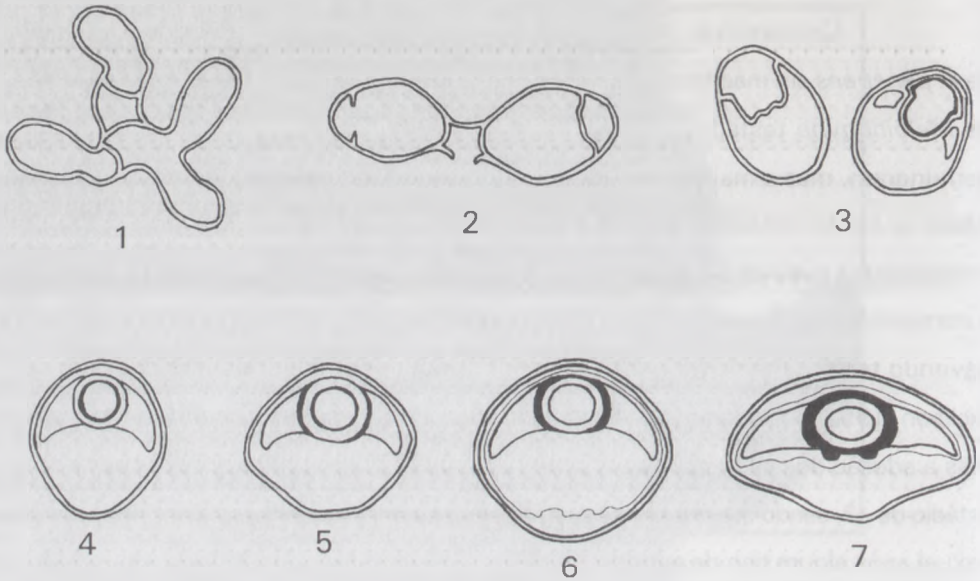


FIGURA 5. Desenho esquemático da esporogênese de *Pasteuria penetrans*. (1) Micélio vegetativo. (2) Formação de septo nas células terminais do micélio. (3) Septo transforma-se em membrana interna que originará o endósporo. (4, 5 e 6) Formação da capa do endósporo, do córtex e do exósporo. (7) Maturação do endósporo.

Preferência por hospedeiros

Os nematóides hospedeiros de *Pasteuria* spp. incluem aproximadamente 323 espécies em cerca de 116 gêneros, distribuídos em 80 países dos cinco continentes, incluindo várias ilhas dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico (Chen & Dickson, 1998). Estes diferentes nematóides possuem hábitos alimentares distintos e ciclos de vida que variam em duração. Desta forma, cada espécie de nematóide apresenta uma fisiologia ligeiramente diferente. A pressão de seleção favorece a bactéria cuja fisiologia assemelha-se à do seu nematóide hospedeiro. Segundo Stirling (1985), populações individuais dessa bactéria poderem exibir uma restrita gama de hospedeiros. Esse relacionamento íntimo sugere que o gênero *Pasteuria* possa conter inúmeras espécies (Sayre et al., 1991).

Channer & Gowen (1992), em um experimento usando populações de nematóide das galhas provenientes de quatro países, observaram que a habilidade de uma população de *P. penetrans* aderir-se ao nematóide hospedeiro no qual foi multiplicada por último aumentou dramaticamente, enquanto sua habilidade de aderir-

se a populações às quais o isolado de *P. penetrans* era originalmente mais agressivo diminuiu. De acordo com Channer & Gowen (1992), uma explicação para a aparente mudança no grau de especificidade é que populações de campo de *P. penetrans* são geneticamente heterogêneas, e a seleção ocorre quando alguns endósporos que se aderem melhor à uma determinada população do nematóide resulta em produção de muitos endósporos, que predominarão na próxima geração desse isolado da bactéria. Uma explicação alternativa para a mudança do grau de especificidade é que o nematóide hospedeiro induz a adaptação da bactéria que se desenvolve no seu interior, de forma que a progênie apresente uma melhor habilidade de reinfectar um hospedeiro em particular (Channer & Gowen, 1992).

Isolados de *P. penetrans* possuem alta especificidade aos nematóides hospedeiros de acordo com diferenças em quantidade e tipos de proteínas na superfície dos endósporos e dos nematóides (Davies et al., 1992). De acordo com Davies e Danks (1993), carboidratos presentes na superfície da cutícula do nematóide interagem com moléculas de N-acetylglucosamina presentes na superfície dos endósporos de *P. penetrans*, que por sua vez estão ligadas a proteínas ou peptidoglicanos, que são extensões da parede celular da bactéria. Em estudos mais recentes, Davies et al. (1996) destacam a importância de fibronectin, uma glicoproteína, na adesão de endósporos.

Apesar do mecanismo de adesão entre a superfície do endósporo e a cutícula do nematóide ainda não ter sido completamente desvendado, sabe-se que populações de *P. penetrans* são bastante heterogêneas e que subpopulações de endósporos aderem-se preferencialmente a diferentes populações de nematóides (Davies et al., 1994). A despeito de *P. penetrans* aderir-se em maior número às populações de nematóides nas quais foi multiplicada (Davies et al., 1994), isolados de *P. penetrans* podem aderir-se a diferentes populações, espécies e até mesmo gêneros de fitonematóides (Dickson et al., 1994). Como exemplos, Davies et al. (1988), testando 11 populações de *P. penetrans* isoladas de *Meloidogyne* spp., observaram um pequeno grau de adesão de endósporos em nematóides formadores de cistos. Dickson et al. (1994) e Carneiro et al. (1999) observaram um isolado de *Pasteuria* sp. obtido de *Pratylenchus scribneri* aderir-se a *M. incognita, M. arenaria, M. hapla, M. javanica,*

M mayaguensis, M. paranaensis e *P. brachyurus*.

A adesão de endósporos de *P. penetrans* a algumas populações de nematóides das galhas e não a outras tem uma grande importância para o seu uso como agente de controle biológico. O isolado de *P. penetrans* a ser usado para controlar uma determinada população de nematóide das galhas deve ser escolhido de acordo com sua adesão ao nematóide-problema, e deve-se preferir isolados com ampla gama de nematóides hospedeiros, uma vez que populações mistas de nematóides ocorrem naturalmente no campo (Stirling, 1985).

Teste de adesão de endósporos aos nematóides

Bioensaios podem ser feitos para se avaliar o potencial de adesão entre isolados de *P. penetrans* e populações de nematóides. Juvenis de segundo estádio são introduzidos em solo infestado com endósporos e, após serem incubados por 2 ou 3 dias, são extraídos, e a adesão é examinada com o auxílio de um microscópio invertido (Mankau, 1975; Dutky & Sayre, 1978; Slana & Sayre, 1981; Stirling, 1981; Brown & Smart Jr, 1984, 1985; Brown & Nordmeyer, 1985; Bird & Brisbane, 1988; Sigh & Dhawan, 1990; Oostendorp et al., 1990; Hatz & Dickson, 1992; Freitas et al., 1997). O borbulhamento suspensão de endósporos com nematóides é outra forma de proporcionar a adesão. Bird (1986) borbulhou suspensão aquosa de *P. penetrans* com *M. javanica* ajustada para 3 x 10^3 endósporos/J2 em frasco erlenmeyer por 18 horas em 25°C e obteve adesão em cerca de 78% dos J2. Este método também foi usado por Walia et al. (1990). A maneira mais simples de aderir *P. penetrans* ao nematóide hospedeiro, entretanto, é simplesmente colocar J2 recentemente eclodidos em suspensão bacteriana em vidro de relógio ou em uma placa rasa e deixar em temperatura ambiente para que os J2 se movimentem e entrem em contato com os endósporos (Mankau & Prassad, 1977; Stirling et al., 1986; Freitas et al., 1997; Serracin et al., 1997). Entretanto, esta técnica resulta num número desuniforme de endósporos aderidos por J2, e, até mesmo, na não adesão em alguns J2 da suspensão. O método da centrífuga, desenvolvido por Hewlett & Dickson (1993), no qual 0,1 ml de 10^5 endósporos/ml de água e 200 J2 em 0,1 ml de água são centrifugados em tubo de microcentrífuga por 2 min a 9.500 g, tem a vantagem de ser rápido e é indicado para

a determinação da gama de hospedeiros de determinado isolado de *P. penetrans*, ou para testar a adesão de diferentes isolados de *P. penetrans* sobre um nematóide-problema em questão (Davies et al., 1996; Sharma & Davies, 1996; Chen et al., 1997; Davies & Redden, 1997). Entretanto, esse método não foi testado quanto à eficiência de penetração dos J2 e, portanto, deve-se tomar cuidado ao se usar este método para inoculações de experimentos ou para a produção massal de endósporos. Observou-se que os nematóides são empurrados para o fundo do tubo pela força centrífuga, formando várias camadas de J2, mas os endósporos ficam aderidos apenas à camada superficial, proporcionando um alto coeficiente de variação entre os J2 quanto à adesão. Este método também ocasiona um emaranhado de J2 unidos uns aos outros pelos endósporos da bactéria, o que provavelmente reduz o seu movimento no solo e a penetração nas raízes (observação pessoal).

No método de agitação em "shaker", utilizado por Stirling (1985), Bird et al (1990), Davies et al. (1991) e Sayre et al. (1991), a suspensão de J2 e endósporos é agitada em tubos tampados ou em frascos tipo Erlenmeyers para proporcionar maior contato entre os organismos. Essa técnica de adesão independe do movimento dos J2 e resulta em maior uniformidade do número de endósporos aderidos por nematóide. O grau de adesão varia com a rotação do "shaker" e com o tempo de agitação.

Gomes et al. (1999) compararam a uniformidade de adesão de *P. penetrans* ao nematóide das galhas obtida pelos métodos de borbulhamento, agitação em 'shaker', centrifugação modificada e suspensão em repouso. O número de endósporos aderidos/J2 pelo método de borbulhamento apresentou um alto coeficiente de variação quando comparado aos demais. O uso de um método que possibilite uma menor variação na adesão de endósporos pode resultar em maior percentagem de J2 aderidos pela bactéria e experimentos com respostas mais consistentes.

Segundo Tzortzakakis et al. (1997), média alta de endósporos aderidos aos J2 não garante a redução de ovos produzidos, se houver alta variância em adesão e infectividade dos endósporos.

Ao comparar isolados de diferentes procedências, também deve-se levar em consideração a qualidade do pó de raiz utilizado como inóculo. Variações em

adesão de endósporos entre lotes de pó de raiz de um isolado de *P. penetrans*, em uma mesma espécie de nematóide hospedeiro e em testes com a mesma concentração de endósporos, foram obtidas por Stirling & White (1982) e Dickson et al. (1994). A qualidade do inóculo depende do estádio de maturação dos endósporos nas fêmeas no momento em que a raiz é colhida, seca e moída para a obtenção do pó.

ECOLOGIA

Inúmeros são os fatores abióticos que podem afetar a relação *P. penetrans*-nematóides, e acredita-se que muitos destes ainda são desconhecidos. Alguns dos fatores que mais se destacam são comentados a seguir.

Efeitos da temperatura

A adesão de endósporos e desenvolvimento de *P. penetrans* em *M. javanica* e *M. arenaria* ocorrem de forma mais eficiente em temperaturas entre 25 e 30°C (Stirling, 1981; Stirling et al., 1990; Hatz & Dickson, 1992; Freitas, 1997). Stirling (1981) observou que a duração do ciclo de vida de *P. penetrans* foi reduzida em cerca de 70% a 30°C, comparado a 20°C. Freitas (1997) observou que J2 de *M. arenaria* não apresentaram endósporos aderidos às suas cutículas após serem incubados em solo infestado por *P. penetrans* a 10°C ou a 50°C por 4 dias, pois temperaturas extremas, que desfavoreçam a locomoção de nematóides, podem prevenir o contato entre a bactéria e o nematóide hospedeiro. A própria receptividade da cutícula do nematóide aos endósporos é afetada pela temperatura. Freitas et al. (1997), ao incubarem J2 de *M. arenaria* em diferentes temperaturas, constataram que mais endósporos se aderem aos J2 quando estes são previamente expostos a temperaturas de 30 ou 35°C, e que a adesão decresce com o pré-tratamento de 45°C ou mais, até ser mínima depois de incubação em 50°C. Tal decréscimo em adesão é, provavelmente, resultado de uma solubilização ou denaturação de ligantes presentes na cutícula do nematóide (Davies & Danks, 1993).

A resistência de *P. penetrans* ao calor é relativa, pois o aquecimento afeta diferentemente a adesão e a infectividade da bactéria, e seu efeito depende do tempo de exposição de endósporos ou estruturas vegetativas às altas temperaturas.

Enquanto a adesão de endósporos ocorre após tratamento a 121°C por 10 minutos, a infectividade é totalmente inibida (Williams et al., 1989). Endósporos aquecidos por 30 minutos a 80°C ou por 10 dias a 70°C também perdem sua infectividade, apesar de ainda serem capazes de aderir-se aos nematóides (Dutky & Sayre, 1978; Williams et al., 1989; Freitas, 1997; Giannakou et al., 1997).

Embora *P. penetrans* forme endósporos como outras bactérias termófilas, ela é na verdade uma bactéria mesófila (Chen & Dickson, 1998). Existe uma correlação entre a resistência dos endósporos e a concentração de ácido dipicolínico (Mallidis & Scholefield, 1987). Este composto químico constitui de 5% a 15% do peso dos esporos de *Bacillus* spp. e de outras bactérias termófilas, mas os endósporos de *P. penetrans* possuem uma concentração muito menor (0,96%). Essa diferença está provavelmente correlacionada ao fato de *P. penetrans* ser menos resistente ao calor do que outras bactérias termófilas (Williams et al., 1989).

Efeitos do tipo de solo, umidade e adubação

Embora *P. penetrans* seja encontrada em vários tipos de solo, a maioria dos solos supressivos a nematóides devido à presença dessa bactéria é de textura arenosa (Williams, 1960; Stirling & White, 1982; Spaull, 1984; Minton e Sayre, 1989; Giblin-Davis et al., 1990; Minton e Baujard, 1990; Oostendorp et al. 1990; Dickson et al., 1994; Ko et al., 1995; Chen et al., 1996; Weibelzahl-Fulton et al., 1996; Freitas, 1997). Mateille et al. (1995) observaram maior adesão em solos arenosos do que em solos argilosos. A maior movimentação dos J2 em solo arenoso do que em solo argiloso aumenta a possibilidade de contato entre J2 e os endósporos imóveis da bactéria, e a maior percolação de água em solos arenosos faz com que endósporos aplicados na superfície do solo atinjam as camadas mais profundas, onde se encontram os nematóides (Oostendorp et al. 1990).

A reprodução de nematóides e de *P. penetrans* é limitada em solos encharcados. Segundo Davies et al. (1988), não só a motilidade do nematóide hospedeiro é reduzida em solo na capacidade de campo, reduzindo a penetração nas raízes, mas também o desenvolvimento da bactéria é prejudicado pelo excesso de umidade que priva de oxigênio a bactéria e o nematóide hospedeiro.

Conseqüentemente, um regime de rega adequado e solos que permitam melhor drenagem são favoráveis ao desenvolvimento da bactéria.

Alterações das características intrínsecas de determinado solo podem favorecer o controle biológico de nematóides por *P. penetrans*. Muitos tratos culturais, como irrigação, aração e gradagem, melhoram a distribuição de endósporos no campo, aumentando as chances de contato entre *P. penetrans* e nematóides. De acordo com Chen et al. (1994), a adubação com altos níveis de nitrato de amônia aumenta o número de endósporos de *P. penetrans* produzidos por fêmea de *Meloidogyne* spp. e reduz a eclosão dos J2. Entretanto, Chen & Dickson (1997) observaram redução do número de endósporos por fêmea de *M. arenaria* com o aumento da concentração de nitrato de amônia. A adição de esterco de curral curtido ao solo também reduziu o número de endósporos por fêmea, mas não impediu o desenvolvimento de *P. penetrans* (Gomes et al., 1998).

Efeito de ultra-som, dessecamento e pH

A exposição dos endósporos a ondas de ultra-som resulta no rompimento do esporângio e do exósporo, expondo as fibras parasporais (Figura 1), responsáveis pela adesão do endósporo à superfície cuticular do nematóide (Stirling et al., 1986). Estes autores observaram que o número de endósporos aderidos aos J2 aumenta proporcionalmente com o tempo de tratamento com ultra-som.

Outros fatores que rompem ou degradam o esporângio e o exósporo aumentam a taxa de adesão. O'Brien (1980) obteve endósporos de fêmeas de *M. arenaria* infectadas ao esmagá-las em água, e logo em seguida, adicionar J2 de *M. javanica* ao recipiente. Nenhuma adesão ocorreu após 4 horas de incubação. Entretanto, após secar os endósporos ao ar e ressuspendê-los em água, estes aderiram-se aos J2 de *M. javanica* adicionados em apenas 5 minutos. Manter os endósporos em suspensão aquosa e em temperatura ambiente por 24h também aumenta a adesão em relação àquela obtida com endósporos recém retirados de fêmeas (O'Brien, 1980).

Os efeitos do pH sobre *P. penetrans*, observados por alguns pesquisadores, são diversos e de difícil interpretação. Segundo O'Brien (1980), a adesão de endósporos de *P. penetrans* a cutícula de *M. javanica* e *M. arenaria* não foi

afetada por pH entre 4,5 e 8,5. Ratnasoma & Gowen (1996) obtiveram maior adesão de endósporos retirados de fêmeas infectadas e suspendidos em água com pH 8,0 do que de endósporos de pó de raiz adicionados à água, resultando em pH 3,8. Em outro teste, a adesão em pH 5,0 foi maior do que nos outros valores entre 3 e 10, porém foi oito vezes maior em pH 4 do que em pH 3 (Ratnasoma & Gowen, 1996).

Davies et al. (1988) observaram que os endósporos de *P. penetrans* aderiam-se mais à cutícula de J2 de *M. incognita* em pH neutro do que em pH 4 ou 9 quando o teste foi feito em água de torneira, porém, em água destilada, maior adesão ocorreu em pH 9, seguida de pH 4, e menor em pH 7. Após a ruptura do esporângio por meio de ondas de ultra-som, a adesão foi maior em pH 7, em água de torneira ou em água destilada, e muito maior na primeira que na segunda. Orui (1997) observou maior adesão em pH alto após tratamento com ultra-som. Segundo Davies et al. (1988), mudanças de pH e uso de água de torneira, com maior concentração de sais do que água destilada, alteram a adesão devido às mudanças no balanço de cargas elétricas entre o endósporo e a cutícula do nematóide.

Afolabi et al. (1995) estudaram o potencial eletrostático *P. penetrans* e constataram que o endósporo tem carga negativa, sendo que a maior carga negativa ocorria em pH 7 e reduzia-se à medida que se afastava do pH neutro. Como o nematóide também possui carga negativa (Himmelhoch et al., 1977), espera-se uma repulsão entre endósporos e nematóide, entretanto, ocorre uma adesão natural entre os dois organismos. Conclui-se, portanto, que outras forças, como forças hidrofóbicas de atração e forças eletrostáticas de repulsão, estão envolvidas neste processo de reconhecimento e adesão entre endósporos e a cutícula do nematóide, e que o papel do pH ainda necessita ser elucidado.

CULTIVO DE *P. PENETRANS*

In vitro

As características de *P. penetrans* como agente de biocontrole fazem desta bactéria um organismo com grande potencial para o manejo de fitonematóides, entretanto, a dificuldade de cultivo *in vitro* é o maior entrave para sua utilização

comercial como bionematicida (Williams et al., 1989; Gowen & Ahmed, 1990; Bishop & Ellar, 1991). Como muitas tentativas frustradas de reproduzir *P. penetrans in vitro* nem chegaram a ser publicadas (Mankau, comunicação pessoal a Stirling & Wachtel, 1980; Dr. James E. Maruniak, Departmento de Entomologia e Nematologia da Universidade da Florida, comunicação pessoal), é impossível precisar o número de tentativas passadas ou quantos pesquisadores estão, no momento, testando meios diversos em condições diversas de crescimento.

Williams et al. (1989) tentaram cultivar *P. penetrans* fora do corpo do nematóides hospedeiro, mas não obtiveram resultado apesar dos vários meios de cultura simples e complexos que foram testados. Esses meios são utilizados para se cultivar microorganismos fastidiosos, como *Spiroplasma citri*, *Legionella pneumophila* e *Clavibacter xily* subsp. *xily*; ou são meios contendo extrato de raízes, extrato de solo ou nematóides macerados; meios utilizados para cultivar nematóides como *Caenorhabditis briggsae* e meios contendo compostos essenciais como esteróis. Os meios testados por Williams et al. (1989) deveriam ser capazes de permitir o crescimento do mais fastidioso microrganismo. Esses autores usaram como inóculo endósporos e estruturas vegetativas, mas nenhum crescimento foi observado. No primeiro caso, os endosporos não germinaram e no segundo, especula-se que um possível estresse (choque osmótico), no momento da transferência do micélio bacteriano do nematóide para o meio de cultivo, tenha impedido o crescimento de *P. penetrans* .

Bishop & Ellar (1991) tentaram cultivar *P. penetrans* em uma seleção de meios já conhecidos e em dois meios por eles formulados. Os autores usaram meios líquidos devido à dificuldade de observação de crescimento bacteriano em meio sólido. Os meios previamente conhecidos foram escolhidos por permitirem o crescimento de microrganismos fastidiosos ou por fornecerem condições incomuns de crescimento, entretanto, nenhum crescimento foi observado nestes meios (Bishop & Ellar, 1991). Os autores desenvolveram dois meios de cultura, partindo da premissa de que *P. penetrans* é uma bactéria fastidiosa que requer uma fonte de energia, carbono orgânico, sais inorgânicos, suporte osmótico, pH equivalente ao do nematóide hospedeiro, aminoácidos, vitaminas e precursores de ácidos nucléicos. Em um destes

meios, *P. penetrans* sobreviveu por até um mês, mas sem se reproduzir. Alterações em soluções vitamínicas e de purinas e pirimidinas resultaram num meio que permitiu a multiplicação de estruturas vegetativas no estádio de couve-flor, resultando num aumento de quatro vezes o número de colônias vegetativas, porém estas estruturas não evoluíram para estádios mais avançados e morreram. Resultados semelhantes foram obtidos com extrato de células fúngicas e de *Thermoactinomyces vulgaris* (Bishop & Ellar, 1991).

Reise et al. (1991) cultivaram *P. nishizawae* por oito meses em meio de cultura com 111 ingredientes e observaram a presença de todos os estádios de desenvolvimento da bactéria. Endósporos maduros foram obtidos após cinco meses de cultivo e aderiram-se à cutícula de J2 de *Heterodera glycines* em baixo número. Este trabalho foi publicado apenas como resumo de congresso e nenhum detalhe do meio de cultura foi fornecido.

Outra forma de cultivar *P. penetrans in vitro* é através do uso de cultura oligoxênica. Verdejo & Mankau (1986) multiplicaram *P. penetrans* em raízes excisadas de tomate. Os autores colocaram sementes sobre meio de cultura em placas de Petri e removeram os epicótilos após uma semana. Uma fêmea de *M. incognita* infectada com *P. penetrans* foi axenizada superficialmente e amassada sobre um bloco de ágar para liberar os endósporos e uma massa de ovos axenizada foi colocada sobre este bloco. Os endósporos aderiram-se aos J2 que migraram dos ovos para as raízes e a bactéria desenvolveu-se normalmente nos nematóides que parasitaram as raízes. Mais de 50% das fêmeas que se desenvolveram estavam parasitadas por *P. penetrans* (Verdejo & Mankau, 1986). Este método foi aprimorado por Verdejo e Jaffee (1988) pela transformação de raízes de tomate e batata por *Agrobacterium rhizogenes*. O número de fêmeas de *M. javanica* parasitadas pela bactéria em raízes das duas espécies vegetais foi semelhante, porém o número de endósporos de *P. penetrans* por fêmea foi duas vezes maior em raízes de tomate do que em raízes de batata. Segundo Verdejo e Jaffee (1988), este método produz baixo número de endósporos e, portanto, não é viável para a multiplicação massal de *P. penetrans*. Entretanto, este sistema asséptico de três compenentes (bactéria, nematóide e planta) pode ser muito útil para estudos de relações entre patógenos e hospedeiros, pois permite maior

controle de variáveis, como pH, temperatura e nutrientes, requer pequeno número de endósporos e nematóides e permite observações não-destrutivas.

In vivo

Como nenhum método que permita a multiplicação *in vitro* de *P. penetrans* foi desenvolvido até o presente momento, sua produção ainda se baseia no método descrito por Stirling & Wachtel (1980), no qual a bactéria cresce e multiplica-se no nematóide hospedeiro em plantas envasadas. Nesse método, J2 de *Meloidogyne* spp. com endósporos aderidos às suas cutículas são adicionados a vasos contendo uma planta de tomate cada um, em casa de vegetação. Os sistemas radiculares são removidos após 7 a 8 semanas, secos ao ar, moídos e peneirados. O pó produzido serve como fonte de inóculo bacteriano (Stirling & Wachtel, 1980).

A concentração de endósporos no pó de raiz varia de acordo com a umidade, a temperatura, a textura e o teor de matéria orgânica do solo, assim como com o isolado de *P. penetrans*, a população do nematóide, a planta hospedeira, o número de nematóides por vaso e o número de endósporos/J2. Chen et al. (1996) inocularam plantas de tomate envasadas com J2 de *M. arenaria* contendo 4.9 ± 2.0 endósporos aderidos, em três aplicações de 1000 a 1500 J2/planta, em intervalos de uma semana, e obtiveram 7,9 x 10^7 endósporos/g de pó de raiz. Gomes et al. (1998) introduziram em uma inoculação 2000 J2 de *M. javanica* contendo média de 10 endósporos/J2 por planta de tomate e obtiveram 6,25 x 10^8 end./g de raiz.

Sharma & Stirling (1991) aprimoraram o método de Stirling & Wachtel (1980) ao usar bandejas com areia no lugar de vasos com solo e ao cultivar entre 50 e 100 plantas de tomate em cada bandeja, que são inoculadas com 100.000 J2 com endósporos de *P. penetrans*. Após 60 a 90 dias de inoculadas, as plantas são retiradas e o pó é produzido. Sharma & Stirling (1991) obtiveram 10^8 a 10^9 endosporos/g de pó de raiz. Outra técnica de *P. penetrans* foi desenvolvida pelos autores com a inoculação de 5000 J2 com endósporos por tubérculo de batata em saco plástico com areia. Segundo os autores, o método da bandeja mostrou-se melhor por resultar em maior número de endósporos produzidos por área.

Serracin et al. (1994) desenvolveram um sistema de cultivo de *P.*

penetrans em hidroponia para estudar os efeitos da temperatura sobre o desenvolvimento da bactéria. Como a produção final de endósporos não foi avaliada, não é possível dizer se é uma evolução do método de Stirling & Wachtel (1980). Além disto, este método requer que a planta seja inoculada em areia antes de ser colocada em solução hidropônica, pois os J2 com endósporos necessitam de suporte físico do substrato para poderem penetrar as raízes das plantas.

Em todos os métodos de produção massal, é de primordial importância que algumas fêmeas infectadas sejam retiradas das raízes, esmagadas entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio ótico para se ter certeza de que os endósporos atingiram a maturidade antes do preparo do pó. Deve-se optar por colher quando a maioria dos endósporos já se apresentam livres do esporângio.

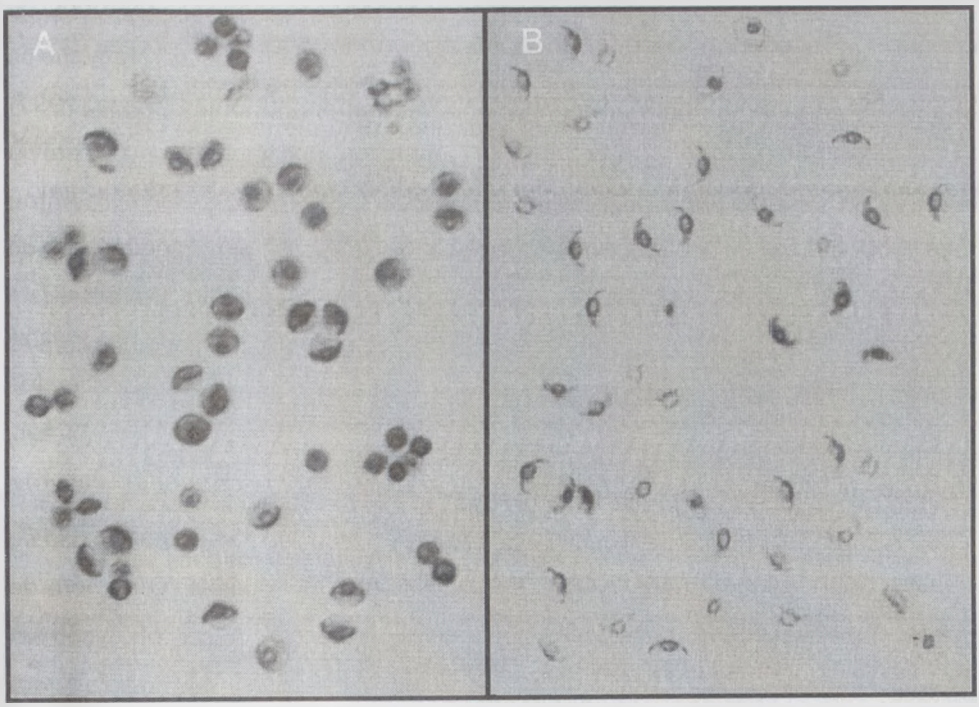


FIGURA 6. Endósporos de *P. penetrans* retirados de fêmeas de *Meloidogyne* spp. Os endósporos na figura A estão envoltos pelo esporângio, enquanto aqueles indicados na figura B estão livres do esporângio.

Determinação da concentração de endósporos de *P. penetrans* no inóculo de pó de raiz

É difícil determinar, com exatidão, o número de endósporos no pó de raiz seca e moída através de observação ao microscópio, pois resíduos de tecido radicular obstruem a visualização durante a contagem e endósporos aderem-se ao material utilizado na maceração e preparação da suspensão, o que pode gerar uma subestimação da concentração. Stirling & Wachtel (1980) estimaram esse número de forma indireta ao contar as fêmeas infectadas por grama de raiz e o número de endósporos por fêmea.

O método direto de contagem dos endósporos presentes no pó de raiz pode ser facilitado ao embeber 0,1 g de pó de raiz em 2 ml de suspensão de enzimas pectinolíticas, macerar por 5 minutos, diluir para 50 ml e contar em hemacitômetro (Sharma & Stirling, 1991). Chen et al. (1996) compararam seis métodos de determinação de concentração de endósporos de *P. penetrans* e observaram que os métodos de digestão enzimática do pó de raiz foram os mais eficientes. Souza (1997) comparou o método de digestão enzimática com a maceração sem digestão prévia com enzimas e com a simples diluição do pó em água. O mesmo pó de raiz apresentou $4,6 \times 10^7$ end./g no método de digestão enzimática, $3,2 \times 10^7$ end./g no método de trituração sem enzimas e $2,2 \times 10^7$ end./g no método de diluição. Devido a tais diferenças, é importante considerar o método de avaliação usado em estudos com *P. penetrans* por diferentes autores antes de serem estabelecidas conclusões.

No solo

A ausência de meio de cultura para *P. penetrans* não permite o uso de diluição serial para determinar a concentração da bactéria no solo. O número de endósporos no solo pode ser estimado diretamente por técnica de centrifugação em gradiente de sacarose. Uma média de 59% dos endósporos presentes no solo foram extraídos com esta técnica, mas os autores concluíram que o método é demasiado laborioso para ser usado rotineiramente (Davies et al., 1988b).

Bioensaios para detectar a presença da bactéria no solo e para estudos

de gama de hospedeiros foram desenvolvidos por Slana & Sayre (1981) e Oostendorp et al. (1988). Entretanto, estes bioensaios não permitiram determinar a concentração de endósporos. Freitas et al. (1995) desenvolveram um método de bioensaio para a determinação da concentração de endósporos no solo, que compara a adesão no solo analisado com a adesão em solo com endósporos adicionados em quantidades conhecidas. Neste bioensaio, uma amostra composta do solo de campo infestado com *P. penetrans* é separado em duas subamostras e uma delas é autoclavada duas veses por 1 hora a 120°C. As duas subamostras são acondicionadas em placas de petri e deixadas secar em temperatura ambiente para uniformizar a umidade e matar possíveis nematóides no solo não autoclavado. A umidade do solo é rescontituída por adição de suspensões de endósporos às placas de modo a resultar em concentrações de 10^3, 10^4, 10^5 e 10^6 endósporos/g de solo. Juvenis de *Meloidogyne* spp. são depositados em suspensão aquosa na superfície do solo das placas e incubados a 28°C por 3 dias. Os nematóides são extraídos e o número de endósporos aderidos à cutícula é determinado. A concentração de *P. penetrans* no solo é determinada por interpolação em curva de regressão da adesão em diferentes concentrações conhecidas (Freitas et al., 1995). Em bioensaios, temperatura, umidade e textura do solo, além de outros fatores, afetam o movimento dos nematóides e alteram a adesão (Oostendorp et al., 1990). Um aprimoramento da técnica de Freitas et al. (1995) baseia-se em agitar o solo em suspensão aquosa com os nematóides e endósporos por 24 horas para uniformizar a adesão, que ocorre independentemente do movimento dos J2 no solo (Freitas, 1997). Souza (1997) realizou um bioensaio em solo argiloso e em areia lavada e observou que em solo argiloso os endósporos de *P. penetrans* são menos disponíveis para a adesão nos J2 do que em areia lavada.

CONTROLE DE NEMATÓIDES COM *PASTEURIA PENETRANS*

Modo de ação

O processo de redução da população de nematóides por *P. penetrans* se dá em duas fases: na primeira, o número de endósporos no solo é suficiente para aderir a grande parte dos juvenis, porém em número baixo, ou seja, de um a cinco

endósporos por J2. Desta forma, a infectividade dos juvenis não é seriamente afetada (Brown & Smart, 1985, Davies et al, 1988), o nematóide penetra na planta hospedeira e desenvolve-se até a maturidade, impedindo as fêmeas de produzir ovos. Quando cada uma dessas fêmeas entram em senescência, cerca de 2 milhões de endósporos de *P. penetrans* são liberados ao solo. A segunda fase do controle do nematóide por *P. penetrans* ocorre quando o número de endósporos da bactéria no solo já se encontra alto e, por conseqüência, muitos endósporos aderem-se aos J2 (figura 7). Desta forma, a motilidade dos juvenis é muito reduzida, e estes não conseguem deslocar-se até as raízes das plantas hospedeiras e infectá-las (Stirling, 1984). Quando isto ocorre, considera-se que o solo tornou-se supressivo e a população do nematóide tende a cair drasticamente (Freitas, 1997).

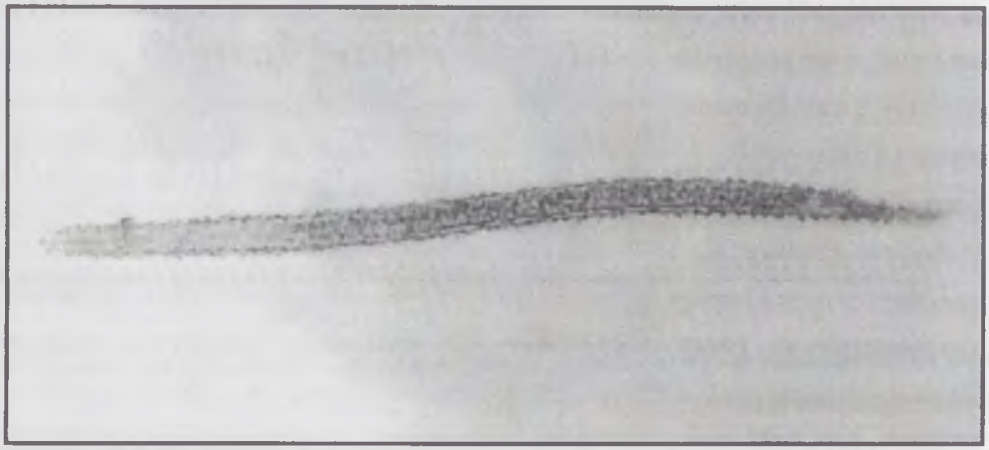


FIGURA 7. Juvenil de segundo estádio de *Meloidogyne* spp. com grande número de endósporos de *P. penetrans* aderidos à cutícula.

Como *P. penetrans* depende do encontro de seus endósporos com os J2 no solo para aderir-se e multiplicar-se, o desenvolvimento da supressividade só ocorre em solos altamente infestados pelo nematóide hospedeiro. Desta forma, todas as condições que favoreçam o desenvolvimento do nematóide são importantes para a reprodução de *P. penetrans*. Rotação de culturas com plantas más hospedeiras de *Meloidogyne javanica*, por exemplo, resultou em menor número de endósporos no solo, quando comparada ao cultivo contínuo de tomate (Madulu et al., 1994).

Aplicação no campo

Segundo Stirling (1991), existem duas estratégias de aplicação de *P. penetrans* no campo para o controle do nematóide das galhas: A forma inundativa consiste em aplicações freqüentes e em grande número de endósporos para reduzir a população de nematóides de forma direta e imediata. Como esta estratégia requer meios mais rápidos e baratos para a produção massal da bactéria, alguns autores consideram que o uso comercial de *P. penetrans* é inviável sem seu cultivo *in vitro*. A forma inoculativa envolve situações onde relativamente poucos endósporos da bactéria são aplicados ao campo e ocorre um crescimento rápido de sua densidade populacional no solo (Stirling, 1991).

Para a aplicação inundativa, é necessário selecionar populações de *P. penetrans* com amplo espectro de hospedeiros ou aplicar misturas de isolados variados para contrapor a diversidade de populações do nematóide das galhas, freqüentemente encontrada no campo. Esta especificidade também deve ser levada em conta quando a forma de aplicação é inoculativa, porém como há mais tempo para a seleção natural ocorrer, endósporos específicos para aquelas populações de nematóides presentes na área se multiplicarão e sua progênie será mais eficiente no controle das diversas populações de *Meloidogyne* spp. (Stirling, 1991). Em ambas estratégias, o pó de raiz pode ser aplicado diretamente ao solo de campo e incorporado com algum implemento agrícola, incorporado ao substrato de mudas a serem levadas ao campo, em suspensões aquosas de pó de raiz aplicadas sobre a superfície do solo com pulverizador costal ou motorizado, ou através de água de irrigação.

Movimento no solo

A eficiência de um organismo de controle biológico está diretamente ligada à sua distribuição uniforme no solo, de forma que aumente sua chance de contato com os nematóides. Os endósporos de *P. penetrans* não possuem estruturas de locomoção, portanto não têm movimento ativo. Endósporos que se aderem à cutícula de um J2 são carregados pelo nematóide até a raiz da planta a ser parasitada, entretanto a distância percorrida pelo juvenil é pequena e não seria suficiente para espalhar a bactéria por grandes áreas. Práticas culturais que movimentam o solo,

como aração e gradagem, e o trânsito de máquinas, pessoas e animais favorecem consideravelmente a disseminação de *P. penetrans* no campo. Devido ao seu diminuto tamanho, endó- oros d-sta bactéria são facilmente carregados por água em percolação no solo (Oostendorp et al., 1990). Isto é muito importante, pois facilita a aplicação da bactéria; basta aplicar os endósporos na superfície de um solo com textura arenosa que estes serão levados, por água de chuva ou de irrigação, a regiões mais profundas onde os nematóides se encontram (Stirling, 1991). Juvenis de nematóides das galhas com endósporos aderidos foram observados em solo arenoso na Flórida em profundidades de até 1,22m (Dickson et al., 1994). Segundo estes autores, *P. penetrans* dispersa-se naturalmente e com grande eficiência em solos arenosos, porém, alto teor de argila, matéria orgânica e outros fatores podem restringir o movimento vertical com a percolação da água.

Pasteuria penetrans foi aplicada ao solo, em suspensão aquosa de pó de raiz com o uso de pulverizador costal, de forma a resultar numa concentração de 10^3 endósporos/g de solo nos primeiros 20cm de profundidade, em uma área de $170m^2$ no campo no estado do Maranhão. Esta área representa uma pequena parcela de um plantio de 102,4ha de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*), irrigado por um pivô central e infestado por *Meloidogyne javanica*. Três quartos da área irrigada pelo pivô foram amostradas sistematicamente em 240 pontos, dois anos após a aplicação, e constatou-se que 72,8% dos J2 continham endósporos aderidos à cutícula, sendo que na área onde *P. penetrans* foi aplicada, 83,9% dos J2 apresentavam endósporos aderidos. Noutra área da mesma fazenda, também de 102,4ha e plantada com jaborandi, pó de raíz contendo 1×10^7 endósporos de *P. penetrans*/g foi aplicado com pulverizador costal na proporção de 6g de pó por 20 litros de água, sobre a superficie do solo 5cm próximos da linha de plantio, em cerca de 15ha. Amostrou-se toda a área irrigada pelo pivô central em 420 pontos, após um ano da aplicação, e constatou-se a presença de endósporos em 85,4% dos J2 examinados. Na área aplicada, 96,7% dos J2 continham *P. penetrans* em média de 3 endósporos/J2 (Freitas et al. 1999). Considerando-se a baixa quantidade de inóculo de *P. penetrans* aplicada ao solo e o pequeno tamanho das áreas tratadas, sua distribuição uniforme pelas áreas irrigadas por dois pivôs centrais mostra a grande capacidade de disseminação da bactéria, o

que confirma sua característica de colonizadora agressiva de solo (Davies et. al., 1991; Oostendorp et. al., 1991; Kasumimoto et al., 1993). Acredita-se que a textura arenosa do solo aliada ao trânsito intenso de máquinas, pessoas e animais na área garantiram a boa disseminação da bactéria. Altas temperaturas, culturas que toleram alta reprodução do nematóide, água em abundância e alta disseminação de *P. penetrans* são fatores que favorecem a multiplicação da bactéria e a elevação de sua densidade populacional no solo. Segundo Kasumimoto et al. (1993), mesmo densidades muito baixas de endósporos no solo podem aumentar, em condições ideais, ao ponto de tornarem o solo supressivo ao nematóide. Dickson e colaboradores (1994) só observaram reduções na população de *M. arenaria* em amendoim em microparcelas no campo, a partir de dois anos da inoculação. Os autores argumentam que se densidade mais alta de endósporos fosse aplicada, a população de nematóides decresceria mais rapidamente (Dickson et al., 1994).

Manejo Integrado

Uso de *P. penetrans* com nematicidas

De acordo com alguns autores, *P. penetrans* pode ser usada em combinação com nematicidas no controle de nematóides (Mankau & Prassad, 1972; Brown & Nordmeyer, 1985; Stirling, 1984), entretanto, nem sempre a viabilidade dos endósporos aderidos aos nematóides foi averiguada. A adesão dos endósporos, após estes terem sido expostos a nematicidas, não implica que eles venham a germinar, penetrar e colonizar o nematóde, dando origem a novos endósporos (Freitas, 1997).

Mankau e Prassad (1972) observaram que *P. penetrans* não foi afetada por aplicações de 1,3-D, aldicarb, carbofuram, etoprop e fenamifós, porém DBCP (Nemagon) foi levemente tóxico à bactéria. Já Stirling (1984) não observou efeitos negativos de 1,3-D, DBCP, EDB, ou dazomet sobre *P. penetrans*. Redução na adesão de endósporos de *P. penetrans* à cutícula de nematóides após o uso de oxamyl e fenamifós foi observada por Walker e Wachtel (1988), mas os autores sugerem que isto se deve à redução da motilidade dos juvenis de *M. javanica* causada pelos nematicidas. Tzortzakakis e Gowen (1994) chegaram à mesma conclusão em

experimento de solarização e *P. penetrans* usando os mesmos nematicidas. Portanto, é importante separar os efeitos dos nematicidas nos endósporos de *P. penetrans* dos efeitos no movimento e metabolismo dos nematóides. Soma e Gill (1991) relataram decréscimo na efetividade de *P. penetrans* em controlar nematóide das galhas quando a bactéria era aplicada em conjunto com carbofuram. Nishizawa (1986) observou redução da ocorrência de *P. nishizawae* em cistos de *Heterodera glycines* após fumigação com cloropicrina. O efeito bactericida da cloropicrina, pura ou em combinação com brometo de metila, sobre *P. penetrans* foi confirmado em experimentos de laboratório, casa-de-vegetação e campo por Freitas (1997), porém nenhum efeito de metam sodio (Vapam) sobre a bactéria foi observado.

Tais relatos nos levam a crer que *P. penetrans* tem relativa resistência a alguns nematicidas em dosagens normais, porém certas classes de nematicidas ou misturas com cloropicrina podem apresentar efeitos deletérios à bactéria.

Uso de *P. penetrans* com solarização do solo

Solarização com plástico transparente inativa os nematóides nas camadas mais superficiais do solo, porém, em camadas mais profundas os J2 de *Meloidogyne* spp. apenas se tornam mais ativos e tendem a movimentar-se mais do que em solos não solarizados. Este efeito resulta em maior adesão de endósporos de *P. penetrans* aos J2. Os J2 infestados penetram as raízes das plantas levadas ao campo após a retirada do plástico e permitem um desenvolvimento mais rápido de *P. penetrans* (Walker & Wachtel, 1988). A solarização associada ao uso de *P. penetrans* tem a vantagem de aumentar a densidade populacional da bactéria sem aumentar a densidade do nematóide hospedeiro (Walker e Wachtel, 1988). Solarização tem efeito aditivo ao efeito de *P. penetrans* no controle dos nematóides das galhas e também pode aumentar a eficiência da bactéria. (Tzortzakakis & Gowen, 1994). Em experimento de solarização de solo no campo, durante o verão na Flórida, Freitas (1997) observou temperatura máxima diária de 41°C a 20cm de profundidade, não sendo detrimental a *P. penetrans*, e possibilitando o uso da bactéria em conjunto com este método de manejo de nematóides. Entretanto, a solarização, após a incorporação de resíduos orgânicos, acelera a decomposição destes e aprisiona subprodutos tóxicos como

álcoois, aldeídos, e isotiocianatos (no caso de brássicas) que atuam como nematicidas, mas são prejudiciais ao desenvolvimento de *P. penetrans*, (Freitas, 1997).

Uso de *P. penetrans* com organismos de controle biológico

Os efeitos aditivos e sinergísticos de *P. penetrans* e fungos nematófagos no controle do nematóide das galhas já foram constatados em experimentos de casa de vegetação e campo. De Leij et al. (1992) observaram que *P. penetrans* e *Verticillium chlamydosporium* têm modos de ação complementares, sendo que o fungo ataca fêmeas e ovos e a bactéria age sobre os J2 que conseguem escapar da ação do fungo. O mesmo ocorre com a interação *P. penetrans* - *Paecilomyces lilacinus*, fazendo que a aplicação conjunta de ambos resulte em controle mais eficaz do nematóide do que se ambos fossem aplicados separadamente (Dube & Smart, 1987; Zaki & Maqbool, 1991; Shahzad et al., 1990). Entretanto, como os autores levaram em consideração a redução do número de ovos e galhas apenas após um ou dois ciclos da planta, não se sabe se, com o tempo, a aplicação isolada de *P. penetrans* não seria mais efetiva, uma vez que ela é dependente de alta densidade populacional do nematóide das galhas para tornar o solo supressivo. Além disso, *P. penetrans* possui uma capacidade de permanecer no solo maior do que fungos, já que endósporos ficam em dormência e não dependem de matéria orgânica e de competir por substrato para sobreviver. Maheswari & Mani (1988) também observaram aumento de eficácia de *P. penetrans* quando aplicada com *P. lilacinus*, porém houve redução da eficácia quando aplicada com *Talaromyces flavus* e *Bacillus subtilis* (Maheswari & Mani, 1988).

Rizobactérias podem interagir com *P. penetrans* aumentando a adesão de endósporos ao nematóide das galhas e sua reprodução no interior destes. Duponnois et al. (1999) isolaram bactérias de rizosfera de plantas de tomate em solo de campo altamente infestado com *M. javanica* e *P. penetrans*. Alguns isolados aumentaram a porcentagem de J2 infestados com *P. penetrans* e o número de endósporos aderidos por J2, em comparação com o controle sem rizobactérias. Provavelmente, este efeito é conseqüência da ação de rizobactérias na degradação dos esporângios de *P. penetrans*, expondo as fibras parasporais. Duas destas espécies de rizobactérias foram identificadas como *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas mendoncina*, e foram

consideradas PGPR por induzirem crescimento das plantas. Estas bactérias, quando aplicadas sem *P. penetrans*, reduziram o número de massas de ovos produzidos pelo nematóide por sistema radicular e, quando aplicadas com *P. penetrans*, apresentaram um efeito aditivo de controle. *Enterobacter cloacae* resultou num aumento do número de endósporos de *P. penetrans* produzidos por raíz de tomateiro.

Supressividade do solo

A supressividade de um solo ocorre quando a doença é ausente ou não severa, na presença do patógeno (Hornsby, 1983). Microrganismos de ocorrência natural no solo são responsáveis por inúmeros exemplos de supressividade do solo (Baker e Cook, 1974). Existem muitos relatos da ocorrência de parasitas e predadores de nematóides em solos cultivados, dos quais fungos e *P. penetrans* são os mais importantes (Stirling, 1988). *P. penetrans* tem sido observada em solos supressivos a nematóides (Bird & Brisbane, 1988; Minton & Sayre, 1989; Dickson et al., 1994; Chen et al., 1996; Weibelzahl-Fulton et al., 1996) e tem suprimido nematóides em casa-de-vegetação e experimentos de microparcelas (Stirling, 1984; Brown et al., 1985; Rodríguez-Kábana et al., 1986; Minton & Baujard, 1990; Davies et al., 1991; Oostendorp et al., 1991; De Leij et al., 1992). Apesar desses relatos, tem sido difícil determinar a extensão do papel de *P. penetrans* na supressão de doenças causadas por nematóides. Stirling (1984) determinou que *P. penetrans* era a responsável pelo declínio de nematóides das galhas em campos de cultivo de uva no sul da Austrália. Ao adicionar nematóides em vasos com solo de campo em estado natural ou autoclavado, ele observou que os nematóides se multiplicaram muito mais em solo autoclavado do que em solo natural, pois a autoclavagem inativou *P. penetrans*. Entretanto, isso não eliminou a hipótese de que outro organismo pode estar interagindo com *P. penetrans* na redução da população do nematóide. Chen (1994) determinou que a autoclavagem do solo por 4 minutos/kg eliminou a maioria dos fungos e bactérias do solo mas não *P. penetrans*. Esta técnica é útil para a separação dos efeitos antagônicos causados por fungos nematófagos e *P. penetrans* no controle de nematóides.

Em condições de campo, um solo cultivado com fumo, na estação experimental da Universidade da Flórida, tornou-se supressivo a *Meloidogyne javanica* e a *M. incognita* raça 1. Testes utilizando microondas determinaram que *P. penetrans* era a causa primária da supressão dos dois nematóides (Chen, 1994; Weibelzahl-Fulton et al., 1996). Nessa mesma estação experimental, um isolado de *P. penetrans* havia sido introduzido em solo de microparcelas em 1988 e levou três anos para suprimir *M. arenaria* (Oostendorp et al. 1991). Suspeita-se que endósporos desse isolado de *M. arenaria* tenham se disseminado pelo vento e trânsito de pessoas por cerca de 300m até as áreas de fumo, e lá tenham se reproduzido nas outras espécies do nematóide das galhas até tornarem o solo supressivo. Em outra área, 100m distante das microparcelas, baixos índices de galhas e altos números de endósporos aderidos aos J2 de *M. arenaria* no final do ciclo do tomate sugeriram que *P. penetrans* estaria causando a supressividade desse solo. Bioensaios em casa-de-vegetação e testes com tratamento do solo ao microondas comprovaram que *P. penetrans* era o agente causal da supressividade do solo a *M. arenaria* raça 1 (Freitas, 1997), o que indica que áreas adjacentes a sítios supressivos tendem a se tornar supressivas com o tempo, caso culturas com algum grau de tolerância ao nematóide sejam cultivadas.

Em microparcelas plantadas com amendoim a campo, Chen et al., (1996) observaram que foi necessária uma concentração de 10.000 endósporos/g de solo de *P. penetrans,* para que uma aplicação da bactéria reduzisse em 65% o número de galhas de *M. arenaria* raça 1, logo no primeiro ciclo da planta. Uma concentração de 100.000 endósporos/g de solo foi necessária para reduzir em 95% o número de galhas. No segundo ano, sem a reaplicação de *P. penetrans*, as reduções foram de 82% e 90% para as concentrações de 10.000 e 100.000 endósporos/g de solo, respectivamente (Chen et al., 1996). Reduções no número de massas de ovos puderam ser observadas em concentrações baixas da bactéria, ou seja 2,25 x 10^3 endósporos/g de solo (Daudi et al., 1990; Ahmed & Gowen, 1991). Mais pesquisas são necessárias para o conhecimento de isolados brasileiros e seu comportamento em nossas condições de solo e clima.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O avanço da irrigação para regiões com solos arenosos e altas temperaturas acarretam infestações generalizadas por espécies de *Meloidogyne*, gerando perdas na produtividade, principalmente onde variedades suscetíveis são cultivadas, a exemplo do que vem ocorrendo em grandes áreas do Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. O cultivo em estufas também favorece o aumento de populações dos nematóides das galhas, onde estes se tornam fator limitante.

O controle de fitonematóides por meio químico é muito limitado devido à inexistência de produtos eficazes e de baixo custo que não agridam a saúde humana e o meio ambiente.

As condições edáficas e de ambiente, tidas como propícias ao ataque de nematóides, são também consideradas ideais para o desenvolvimento de seu antagonista, *P. penetrans*.

O grande potencial de *P. penetrans* como uma das mais poderosas armas contra os nematóides das galhas, principalmente em regiões tropicais e sub-tropicais, vem sendo demonstrado em vários estudos que enfocam biologia, ecologia e biocontrole exercido pela bactéria. Algumas características como resistência a condições extremas de umidade e temperatura, sobrevivência prolongada na ausência do hospedeiro no solo, longa vida de armazenamento na forma de inóculo de pó de raiz, compatibilidade com outros métodos de controle e grande capacidade de disseminação, fazem com que seu uso como nematicida biológico seja muito desejado por agricultores e profissionais da área agrícola. Além disso, a especificidade de alguns isolados a nematóides fitoparasitas impede a atuação da bactéria em nematóides de vida livre, importantes na reciclagem da matéria orgânica e nas cadeias alimentares da microbiota do solo. A falta de um meio de cultura para crescimento *in vitro* impede a produção em larga escala da bactéria. Entretanto, a produção *in vivo,* em nematóides, é relativamente simples e pode corresponder a obtenção de quantidades significativas de endósporos que, se aplicados numa estratégia inoculativa, em condições ideais para o desenvolvimento da bactéria, proporcionarão o aumento gradual de *P. penetrans* no solo, reduzindo o número de nematóides abaixo do nível de dano econômico.

Portanto, se essa bactéria for aplicada ao solo em quantidades insuficientes para o controle imediato do nematóide, o agricultor poderá lançar mão de outras medidas de manejo, como cultivares tolerantes ou solarização, até que ela se espalhe e atinja alta densidade populacional no solo.

Pasteuria penetrans não é a panacéia para todos os problemas gerados pelos nematóides. Seus efeitos não são tão rápidos como os dos potentes nematicidas, que dizimam populações de campo imediatamente após a sua aplicação, mas, em contrapartida, não apresentam perigo ao homem e meio ambiente e não tem que ser reaplicada a cada cultivo, tornando seu uso mais econômico. O caráter imediatista no controle de *Meloidogyne* spp. deve ceder lugar a métodos alternativos, racionais e eficientes, pelo menos até que o cultivo *in vitro* de *P. penetrans* seja resolvido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFOLABI, P.; DAVIES, K. G.; O'SHEA, P. S. The electrostatic nature of the spore of *Pasteuria penetrans*, the bacterial parasite of root-knot nematodes. **Journal of Applied Bacteriology**, v.79, p.244-249, 1995.

AHMED, R.; GOWEN, S. R. Studies on the infection of *Meloidogyne* spp. with isolates of *Pasteuria penetrans*. **Nematologia Mediterranea**, v.19, p.229-233, 1991.

BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens.** San Francisco: W.H. Freeman, 1974. Reprinted ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1982.

BATTACHARYA, D.; SWARUP, G. *Pasteuria penetrans*, a pathogen of the genus Heterodera: its effect on nematode biology and control. **Indian Journal of Nematology**, v.18, p.61-70, 1988.

BIRD, A. F. The influence of the actinomycete, *Pasteuria penetrans*, on the host-parasite relationship of the plant-parasitic nematode, *Meloidogyne javanica*. **Parasitology**, v. 93, p.571-580, 1986.

BIRD, A. F.; WALLACE, H.R. The influence of temperature on *Meloidogyne hapla* and *M. javanica*. **Nematologica**, v.11, p.581-589, 1965.

BIRD, A. F.; BRISBANE, P.G. The influence of *Pasteuria penetrans* in field soils on the reproduction of root-knot nematodes. **Revue de Nématologie**, v.11, p.75-81, 1988.

BISHOP, A. H.; ELLAR, D.J. Attempts to culture *Pasteuria penetrans in vitro*. **Biocontrol Science and Technology**, v.1, p.101-114, 1991.

BROWN, S. M.; SMART JR., G.C. Attachment of *Bacillus penetrans* to *Meloidogyne incognita*. **Nematropica**, v.14, p.171-172, 1984.

BROWN, S. M.; SMART JR., G.C. Root penetration by *Meloidogyne incognita* juveniles infected with *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, v.17, p.23-126, 1985.

BROWN, S. M.; NORDMEYER, D. Synergistic reduction in root galling by *Meloidogyne javanica* with *Pasteuria penetrans* and nematicides. **Revue de Nématologie**, v.8, p.285-286, 1985.

BROWN, S. M.; KEPNER, J.L.; SMART JR., G.C. Increased crop yields following application of *Bacillus penetrans* in field plots infested with *Meloidogyne incognita*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.17, p.483-486, 1985.

CHANNER, A. G. de R.; GOWEN, S.R. Selection for increased host resistance and increased pathogen specificity in the *Meloidogyne-Pasteuria penetrans* interaction. **Fundamental and Applied Nematology**, v.15, p.331-339, 1992.

CHEN, S. Fungal antagonists of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. Gainesville: University of Florida, 1994. 169p. Ph.D. Dissertation.

CHEN, S.; DICKSON, D.W; WHITTY, E.B. Response of *Meloidogyne* spp. to *Pasteuria penetrans*, fungi, and cultural practices in tobacco. **Journal of Nematology**, v.26, n.4, suppl., p.620-625, 1994.

CHEN, Z. X.; DICKSON, D.W. Effect of ammonium nitrate and time of harvest on mass production of *Pasteuria penetrans*. **Nematropica**, v.27, n.1, p.53-60, 1997.

CHEN, Z. X.; DICKSON, D.W. Review of *Pasteuria penetrans*: biology, ecology, and biological control potential. **Journal of Nematology**, v.30, n.3, p.313-340, 1998.

CHEN, Z. X.; DICKSON, D.W.; FREITAS, L.G.; PRESTON, J.F. Ultrastructure, morphology, and sporogenesis of *Pasteuria penetrans*. **Phytopathology**, v. 87, p.273-283, 1997.

CHEN, Z. X.; DICKSON, D.W.; McSORLEY, R.; MITCHELL, D.J.; HEWLETT, T.E.. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, v.28, p.159-168, 1996.

CIANCIO, A. Phenotypic adaptations in *Pasteuria* spp. nematode parasites. **Journal of Nematology**, v.27, n.3, p.328-338, 1995.

COBB, N. A. Fungus maladies of the sugar cane, with notes on associated insects and nematodes. 2. ed. Honolulu: Hawaiian Sugar Planters' Association. Division of Plant Pathology and Physiology, 1906. 254p. (Bulletin, 5).

DAUDI, A. T.; CHANNER, A.G.; AHMED, R.; GOWEN, S.R.. *Pasteuria penetrans* as a biocontrol agent of *Meloidogyne javanica* in the field in Malawi and in microplots in Pakistan. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE - Pests and Diseases, 1990, Brighton, UK. **Proceedings**. Farnham: British Crop Protection Council, 1990. p.253-257.

DAVIES, K. G.; DANKS, C. Carbohydrate/protein interactions between the cuticle of infective juveniles of *Meloidogyne incognita* and spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, v.39, p.53-64, 1993.

DAVIES, K.G.; ROBINSON, M.P.; LAIRD, V. Proteins involved in the attachment of a hyperparasite, *Pasteuria penetrans*, to its plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne incognita*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.59, p.18-23, 1992.

DAVIES, K. G.; REDDEN, M. Diversity and partial characterization of putative virulence determinants in *Pasteuria penetrans*, the hyperparasitic bacterium of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). **Journal of Applied Microbiology**, v.83, p.227-235, 1997.

DAVIES, K. G.; KERRY, B.R.; FLYNN, C.A. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. **Annals of Applied Biology**, v.112, p.491-501, 1988.

DAVIES, K. G.; FLYNN, C.A.; KERRY, B.R. The life-cycle and pathology of the root-knot nematode parasite *Pasteuria penetrans*. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE - Pests and Diseases, 1988, Brighton, UK. **Proceedings**. Farnham: British Crop Protection Council, 1988. v.3, p.1221-1226.

DAVIES, K. G.; DE LEIJ, F.A.A.M.; KERRY, B.R.. Microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes in tropical agriculture. **Tropical Pest Management**, v.37, p.303-320, 1991.

DAVIES, K. G.; REDDEN, M.; PEARSON, K. Endospore heterogeneity in *Pasteuria penetrans* related to adhesion to plant-parasitic nematodes. **Letters in Applied Microbiology**, v.19, p.370-373, 1994.

DAVIES, K. G.; AFOLABI, P.; O'SHEA, P. Adhesion of *Pasteuria penetrans* to the cuticle of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) inhibited by fibronectin: a study of electrostatic and hydrophobic interactions. **Parasitology**, v.112, p.553-559, 1996.

DAVIES, K. G.; LAIR, V.; KERRY, B.R. The motility, development and infection of Meloidogyne incognita encumbered with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. **Revue de Nématologie**, v.14, p.611-618, 1991.

DE LEIJ, F.; DAVIES, K.G.; KERRY, B.R. The use of *Verticillium chlamydosporium* Goddard and *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr alone and in combination to control *Meloidogyne incognita* on tomato plants. **Fundamental and Applied Nematology**, v.15, p.235-242, 1992.

DICKSON, D. W.; OOSTENDORP, M.; GIBLIN-DAVIS, R.M.; MITCHELL, D.J. Control of plant-parasitic nematodes by biological antagonists. In: ROSEN, D.; BENNETT, F.D.; CAPINERA, J.L., ed. **Pest management in the subtropics. Biological control - A Florida perspective**. London: Intercept, 1994. p.575-601.

DUBE, B.; SMART JR., G.C. Biological control of *Meloidogyne incognita* with *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, v.19, p.222-227, 1987.

DUPONNOIS, R.; BÂ, A.M.; MATEILLE, T. Beneficial effects of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas mendocina* for biocontrol of *Meloidogyne incognita* with the endospore-forming bacterium *Pasteuria penetrans*. **Nematology**, v.1, n.1, p.95-101, 1999.

DUTKY, E. M.; SAYRE, R M. Some factors affecting infection of nematodes by the bacterial spore parasite *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, v.10, p.285, 1978 (Abstr.).

EBERT, D.; RAINEY, P.; EMBLEY, T.M.; SCHOLZ, D. Development, life cycle, ultrastructure and phylogenetic position of *Pasteuria ramosa* Metchnikoff 1988: rediscovery of na obligate endoparasite of *Dafnia magna* Straus. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B**, v.351, p.1689-1701, 1996.

FREITAS, L. G. The effects of soil solarization, organic amendment, and fumigant nematicides on *Pasteuria penetrans* and its infectivity to *Meloidogyne arenaria* race 1 in tomato. Gainesville: University of Florida, 1997. 156p. Ph.D. Dissertation.

FREITAS, L. G.; ALMEIDA, A.M.S.; CARMO, D.N.; D'ANGIERI FILHO, C.N.; SILVA, G.S.; CARNEIRO, N. Dispersão de *Pasteuria penetrans* no campo com jaborandi (*Pilocarpus microphilus*) infestado por *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v.24 (supl.), 1999. (Resumo enviado para publicação).

FREITAS, L. G.; MITCHELL, D.J.; DICKSON, D.W. Bioassay for determining the density of endospores of Pasteuria penetrans in field soil. **Nematropica**, v.25, n.2, p.88, 1995. (abstr.).

FREITAS, L. G.; MITCHELL, D.J.; DICKSON, D.W. Temperature effects on the attachment of *Pasteuria penetrans* endospores to *Meloidogyne arenaria* race 1. **Journal of Nematology**, v.29, n.4, p.547-555, 1997.

GIANNAKOU, I. O.; PEMBROKE, B.; GOWEN, S.R.; DAVIES, K.G. Effects of long-term storage and above-normal temperatures on spore adhesion of *Pasteuria penetrans* and infection of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Nematologica**, v.43, p.185-192, 1997.

GIBLIN-DAVIS, R. M.; McDANIEL, L.L.; BILZ, F.G. Isolates of the *Pasteuria penetrans* group from phytoparasitic nematodes in bermudagrass turf. **Journal of Nematology**, v.22, n.4S, p.750-762, 1990.

GIBLIN-DAVIS, R. M.; WILLIAMS, D.; HEWLETT, T.E.; DICKSON, D.W. Development and host attachment studies using *Pasteuria* from *Belonolaimus longicaudatus* from Florida. **Journal of Nematology**, v.27, p.500, 1995. (Abstr.)

GOMES, C. B.; FREITAS, L.G.; NETO, A.R.. Efeito da matéria orgânica sobre a produção de endosporos de *Pasteuria penetrans* em raízes de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, supl., p.305, 1998. (Resumo).

GOMES, C. B.; FREITAS, L.G.; ALMEIDA, A.M.S.A. Comparação de métodos para adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* à juvenis de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v.24 (supl.), 1999. (Resumo enviado para publicação).

GOWEN, S. R.; AHMED, R. *Pasteuria penetrans* for control of pathogenic nematodes. **Aspects of Applied Biology**, v.24, p.25-32, 1990.

HATZ, B. DICKSON, D. W. Effect of temperature on attachment , development, and interaction of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, v.24, p.512-521, 1992.

HEWLETT, T. E.; DICKSON, D. W. A centrifugation method for attaching endospores of *Pasteuria* spp. to nematodes. **Journal of Nematology**, v.25, suppl., p.785-788, 1993.

HIMMELOCH, S.; KISIEL, M. J.; ZUCKERMAN, B. M. *Caenorhabditis briggsae*: electron microscope analysis of changes in negative charge density of the outer cuticle membrane. **Experimental Parasitology**, v.41, p.118-123, 1977.

HORNSBY, D. Suppressive soils. **Annual Review of Phytopathology**, v.21, p.65-85, 1983.

JATALA, P. Biological control of nematodes. In: SASSER, J.N.; CARTER, C.C., ed. **An advanced treatise on *Meloidogyne***, v.1. Biology and control. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. p.303-308.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v.48, p.692, 1964.

KASUMIMOTO, T.; IKEDA, R.; KAWADA, H. Dose response of *Meloidogyne incognita* infected cherry tomatoes to application of *Pasteuria penetrans*. **Japanese Journal of Nematology**, v.23, n.1, p.10-17, 1993.

KERRY, B. R. An assessment of progress toward microbial control of plant parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v.22, p.621-631, 1990.

KO, M. P. BERNARD, E.C.; SCHMITT, D.P.; SIPES, B.S. Occurence of *Pasteuria*-like organisms on selected plant-parasitic nematodes of pineapple in the Hawaiian islands. **Journal of Nematology**, v.27, p.395-408, 1995.

LAPAGE, S. P.; SNEATH, P. H. A.; LESSEL, E. J.; SKERMAN, V. B. D.; SEELIGER, H. P. R.; CLARK, W. A. **International code of nomenclature of bacteria**. Published for the International Association of Microbiological Societies. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1975.

MADULU, J. D.; TRUDGILL, D.L.; PHILLIPS, M.S. Rotational management of *Meloidogyne javanica* and effects on *Pasteuria penetrans* and tomato and tobaco yields. **Nematologica**, v.40, p.438-455, 1994.

MAHESWARI, T. U.; MANI, A. Combined efficacy of *Pasteuria penetrans* and *Paecilomyces lilacinus* on the biocontrol of *Meloidogyne javanica* on tomato. **International Nematology Network Newsletter**, v.5, p.10-11, 1988.

MALLIDIS, C. G.; SCOLEFIELD, J. Relation of the heat resistance of bacterial spores to chemical composition and structure. I. Relation to core components. **Journal of Applied Bacteriology**, v.62, p.65-69, 1987.

MANKAU, R. *Bacillus penetrans* n. comb. causing a virulent disease of plant-parasitic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.26, p.333-339, 1975.

MANKAU, R. Biological control of Meloidogyne populations by *Bacillus penetrans* in West Africa. **Journal of Nematology**, v.12, p.230, 1980. (Abstr.).

MANKAU, R.; IMBRIANI, J.L. The life cycle of na endoparasite in some tylenchid nematodes. **Nematologica**, v.21, p.89-94, 1975.

MANKAU, R.; PRASAD, N. Possibilities and problems in the use of a sporozoan endoparasite for biological control of plant-parasitic nematodes. **Nematropica**, v.2, p.7, 1972. (Abstr.).

MANKAU, R.; PRASAD, N. Infectivity of *Bacillus penetrans* in plant-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v.9, n.1, p.40-45, 1977.

MATEILLE, T.; DUPONNOIS, R.; DIOP, M.T. Influence of abiotic soil factors and the host plant on the infection of phytoparasitic nematodes of the genus *Meloidogyne* by the actinomycete parasitoid *Pasteuria penetrans*. **Agronomie**, v.15, p.581-591, 1995.

METCHNIKOFF, E. *Pasteuria ramosa*, un représentant des bactéries à division longitudinale. **Annales de l' Institut Pasteur**, v.2, p.165-170, 1988.

MINTON, N. A.; BAUJARD, P. Nematode parasites of peanut. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J., ed. **Plant-parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 1990. p.285-320.

MINTON, N. A.; SAYRE, R.M. Suppressive influence of *Pasteuria penetrans* in Georgia soils on reproduction of *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, v.21, p.574-575, 1989. (Abstr.).

NISHIZAWA, T. On a strain of *Pasteuria penetrans* parasitic to cyst nematodes. **Revue de Nématologie**, v.9, p.303-304, 1986.

O'BRIEN, P. C. Studies on parasitism of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, v.12, n.4, p.234, 1980.

OOSTENDORP, M.; DICKSON, D.W.; MITCHELL, D.J. Soil bioassay and host specificity of populations of *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, v.26, n.4, p.654, 1988. (Abstr.).

OOSTENDORP, M.; DICKSON, D.W; MITCHELL, D.J. Host range and ecology of isolates of *Pasteuria* spp. from the southeastern United States. **Journal of Nematology**, v.22, p.525-531, 1990.

OOSTENDORP, M.; DICKSON, D.W.; MITCHELL, D.J. Population development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, v.23, p.58-64, 1991.

ORUI, Y. Effect of spore sonication on attachment and host-attachment range of *P. penetrans* to the root-knot nematode. **Applied Entomology and Zoology**, v.32, p.101-107, 1997.

POINAR JR., G. O.; JANSSON, H., ed. **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, 1988a. v.1, 149p.

POINAR JR., G. O.; JANSSON, H., ed. **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, 1988b. v.2, 139p.

REISE, R. W.; HACKETT, K.T.; HUETELL, R.N. Limited cultivation of *Pasteuria nishizawae*. **Journal of Nematology**, v.23, n.4, p.547-548, 1991. (Abstr.).

RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; WEAVER, C.F.; ROBERTSON, D.G.; SNODDY, E.L. Population dynamics of *Meloidogyne arenaria* juveniles in a field with Florunner peanut. **Nematropica**, v.16, p.185-196, 1986.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D.W. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J.; DICKSON, D.W., ed. **Vistas on nematology:** a commemoration of the twenty-fifth anniversary of the Society of Nematologists. Hyatsville: The Society of Nematologists, 1987. p.7-14.

SAYRE, R.M. Pathogens for biological control of nematodes. **Crop Protection**, v.5, p.268-276, 1986..

SAYRE, R.M.; STARR, M.P. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. rev., comb. n., sp. n., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant parasitic nematodes. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v.52, p.149-165, 1985.

SAYRE, R.M.; STARR, M.P. Bacterial disease and antagonism of nematodes. In: POINAR, G. O.; JANSSON, H.-B., ed. **Diseases of nematodes.** Boca Raton: CRC Press, 1988. v.1, p.69-101.

SAYRE, R. ; WERGIN, W.P.; DAVIS, R.E. Occurrence in *Monia rectirostris* (Cladocera: Daphnidae) of a parasite morphologically similar to *Pasteuria ramosa* (Metchnikoff, 1888). **Canadian Journal of Microbiology**, v.23, p.1573-1579, 1977.

SAYRE, R.M.; WERGIN, W.P.; SCHMIDT, J.M.; STARR, M.P. *Pasteuria nishizawae* sp. nov. a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic on cyst nematodes of genera *Heterodera* and *Globodera*. **Research in Microbiology**, v.142, p.551-564, 1991.

SAYRE, R.M.; WERGIN, W.P.; NISHISAWA, T.; STURHAN, D. Comparison of the fine structure of *Pasteuria* sp. from *Heterodera glycines* with a related bacterium parasitizing *H. goettingiana*. **Nematologica**, v.36, p.390, 1990. (Abstr.).

SERRACIN, M.; SCHUERGER, A.C.; DICKSON, D.W.; WEINGARTNER, D.P. Temperature-dependent development of *Pasteuria penertrans* in *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, v.29, p.228-238, 1997.

SERRACIN, M.; SCHUERGER, A.C.; DICKSON, D.W.; WEINGARTNER, D.P.; HEWLETT, T.E. An alternative method for culturing *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, v.26, p.565, 1994. (Abstr.).

SHAHZAD, S.; EHTESHAMUL, S.; GHAFFAR, A. Efficacy of *Pasteuria penetrans* and *Paecilomyces lilacinus* in the biological control of *Meloidogyne javanica* on mung bean. **International Nematology Network Newsletter**, v.7, n.3, p.34-35, 1990.

SHARMA, R.; STIRLING, G. R. In vivo mass production systems for *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, v.37, p.483-484, 1991.

SHARMA, R.; SWARUP, G. **Pathology of cist nematodes.** New Delhi: Malhotro, 1988.

SHARMA, S. B.; DAVIES, K.G. Characterization of *Pasteuria* isolated from *Heterodera cajani* using morphology, pathology, and serology of endospore. **Systematic and Applied Microbiology**, v.19, p.106-112, 1996.

SINGH, B.; DHAWAN, S.C. A new bacterial strain of *Pasteuria penetrans*, its host range and effect of temperature on spore attachment to second-stage juveniles of pigeon-pea cyst nematode, *Heterodera cajani*. **Indian Journal of Nematology**, v.20, p.161-166, 1990.

SIRLING, G. R. **Biological control of plant-parasitic nematodes:** progress, problems, and prospects. Wallingford, U.K: CAB International, 1991.

SLANA, L. J.; SAYRE, R.M.. A method for measuring incidence of *Bacillus penetrans* spore attachment to the second-stage larvae of *Meloidogyne* spp. **Journal of Nematology**, v.13, n.4, p.461, 1981. (Abstract).

SOMA SEKHAR, N.; GILL, J.S. Efficacy of *Pasteuria penetrans* alone and in combination with carbofuran in controlling *Meloidogyne incognita*. **Indian Journal of Nematology**, v.21, n.1, p.61-65, 1991.

SOUZA, J. T. Epidemiologia, infectividade e parasitismo de *Pasteuria* spp. em fitonematóides. Lavras: UFLA, 1997. 123p. Tese de Mestrado.

SPAULL, V. W. Observations on *Bacillus penetrans* infecting *Meloidogyne* in sugarcane fields in South Africa. **Revue de Nématologie**, v.7, n.3, p.277-282, 1984.

STARR, M. P.; SAYRE, R.M.. *Pasteuria thornei* sp. nov. and *Pasteuria penetrans* sensu stricto emend., mycelial and endospore-forming bacteria parasitic, respectively, on plant-parasitic nematodes of the genera *Pratylenchus* and *Meloidogyne*. **Annals of the Institute Pasteur of Microbiology**, v.139, p.11-31, 1988.

STEW, P. I will survive: protecting and repairing spore DNA. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.2737-2741, 1992.

STIRLING, G. R. Effect of temperature on infection of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. **Nematologica**, v.27, p.458-462, 1981.

STIRLING, G. R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. **Phytopathology**, v.74, p.55-60, 1984.

STIRLING, G. R. Biological control of plant parasitic nematodes. In: POINAR, G.O.; JANSSON, H.-B., ed. **Diseases of nematodes.** Boca Raton: CRC Press, 1988. v.2, p.93-139.

STIRLING, G. R. Host specificity of *Pasteuria penetrans* within the genus *Meloidogyne*. **Nematologica**, v.31, p.203-209, 1985.

STIRLING, G. R.; WHITE, A. M. Distribution of a parasite of root-knot nematodes in South Australian vinyards. **Plant Disease**, v.66, p.52-53, 1982.

STIRLING, G. R.; WACHTEL, M.F. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. **Nematologica**, v.26, p.308-312, 1980.

STIRLING, G. R.; BIRD, A.F.; CAKURS, A.B. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the cuticles of root-knot nematodes. **Revue de Nématologie**, v.9, p.251-260, 1986.

STIRLING, G. R.; SHARMA, R.D.; PERRY, J. Attachment of *Pasteuria penetrans* to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effects of the infectivity. **Nematologica**, v.36, p.246-252, 1990.

STIRLING, G. R. **Biological control of plant parasitic nematodes:** progress, problems and prospects. Wallingford: CAB International, 1991. 282p.

STURHAN, D. Untersuchungen über Verbreitung und Wirte des Nematodenparasiten *Bacillus penetrans*. **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft**, v.226, p.75-93, 1985.

STURHAN, D.; WINKEILHEIDE, R. Studies on a *Pasteuria* isolate from *Heterodera goettingiana*. **Nematologica**, v.36, p.395, 1990. (Abstr.).

THORNE, G. *Dubosqia penetrans* n. sp. (Sporozoa: Microsporidia, Nosematidae), a parasite of the nematode *Pratylenchus pratensis* (de Man) Filipjev. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v.7, p.51-53, 1940.

TZORTZAKAKIS, E. A.; GOWEN, S.R. Evaluation of *Pasteuria penetrans* alone and in combination with oxamyl, plant resistance and solarization for control of *Meloidogyne* spp. on vegetables grown in greenhouses in Crete. **Crop Protection**, v.13, n.6, p.455-462, 1994.

TZORTZAKAKIS, E. A.; CHANNER, A.G.R; GOWEN, S.R. Studies on the potential uso of *Pasteuria penetrans* as a biocontrol agent of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). **Plant Pathology**, v.46, p.44-55, 1994.

VERDEJO, S.; JAFFEE, B.A. Reproduction of *Pasteuria penetrans* in a tissue-culture system containing *Meloidogyne javanica* and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots. **Phytopathology**, v.78, p.1284-1286, 1988.

VERDEJO, S.; MANKAU, R. Culture of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne incognita* on oligoxenic excised tomato root culture. **Journal of Nematology**, v.18, p.635, 1986. (Abstr.).

WALIA, R. K.; BANSAL, R.K.; BHATTI, D.S. A new bacterial parasite (*Pasteuria* sp.) isolated from pigeonpea cyst nematode, *Heterodera cajani*. **International Nematology Network Newsletter**, v.7, n.3, p.30-31, 1990.

WALKER, G. E.; WACHTEL, M.F. The influence of soil solarisation and non-fumigant nematicides of infection of *Meloidogyne javanica* by *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, v.34, p.477-483, 1988.

WEIBELZAHL-FULTON, E.; DICKSON, D.W.; WHITTY, E.B. Supression of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* by *Pasteuria penetrans* in field soil. **Journal of Nematology**, v.28, p.43-49, 1996.

WILLIAMS, A. B.; STIRLING, G.R.; HAYWARD, A.C.; PERRY, J. Properties and attempted culture of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*). **Journal of Applied Bacteriology**, v.67, p.145-156, 1989.

WILLIAMS, J. R. Studies on the nematode soil fauna of sugarcane fields in Mauritius. 5. Notes upon a parasite of root-knot nematodes. **Nematologica**, v.5, p.37-42, 1960.

ZAKI, M. J.; MAQBOOL, M.A. Combined effect of *Pasteuria penetrans* and other biological control agents on the control of root-knot nematode on okra. **Pakistan Journal of Nematology**, v.9, n.1, p.49-52, 1991.

3

FUNGOS NEMATÓFAGOS NA REDUÇÃO DA DISPONIBILIDADE DE LARVAS INFECTANTES DE NEMATÓIDES TRICHOSTRONGILÍDEOS

Terezinha Padilha
Carlos Alfredo Saumell

INTRODUÇÃO

Os nematóides trichostrongilídeos, parasitas de ruminantes, são transmitidos através da ingestão de larvas infectantes presentes nas pastagens. Tradicionalmente, o controle desses nematóides era baseado na aplicação de anti-helmínticos, quando os animais apresentavam sintomas clínicos. À medida que o conhecimento sobre a epidemiologia dos nematóides nas diferentes regiões foi estabelecido, foram desenvolvidas recomendações de controle preventivo. Nestas, a aplicação de anti-helmínticos visa à redução da população de nematóides adultos, fonte da contaminação das pastagens.

A aplicação preventiva de anti-helmínticos revelou-se bem sucedida na redução de perdas ocasionadas pela verminose clínica. Contudo, a pouca taxa de adoção das recomendações (Echevarria & Pinheiro, 1989; Charles & Furlong, 1996) e o uso indiscriminado dos compostos anti-helmínticos determinaram o aparecimento de resistência nas populações de nematóides em várias regiões (Echevarria, 1996; Echevarria et al., 1996). Além da resistência aos princípios ativos dos fármacos, principal inconveniência associada ao uso contínuo na prevenção de perdas, outros problemas têm sido associados ao uso de anti-helmínticos na produção de ruminantes

nos últimos anos. Entre eles, a presença de resíduos na carne e no leite (Padilha, 1996) e o registro de efeitos ecotóxicos em organismos não-alvo, oriundos da excreção de resíduos nas fezes de animais tratados com alguns compostos (Herd, 1996; Iglesias, 1998).

O desenvolvimento de vacinas, a manipulação genética visando à resistência do hospedeiro e a utilização de microrganismos no controle das formas de vida livre presentes no ambiente são as principais medidas alternativas de prevenção dos nematóides trichostrongilídeos, atualmente em estudo (Gill & Le Jambre, 1996). O estágio de conhecimento em cada uma destas alternativas é variável, tornando igualmente variável o período necessário para um possível uso futuro dessas tecnologias, no controle dos nematóides trichostrongilídeos. O controle biológico tem apresentado melhores perspectivas de uso a curto e médio prazo (FAO, 1998).

O conhecimento gerado sobre o uso de agentes biológicos, na redução de estágios de vida livre dos nematóides trichostrongilídeos no ambiente, aumentou consideravelmente nos últimos 5-10 anos. Neste período, o fenômeno de apreensão de larvas pelos fungos nematófagos, principais agentes microbianos considerados na redução do número de larvas infectantes, passou das observações em laboratório para testes em parcelas no ambiente, testes *in vivo* e ensaios no campo. Este capítulo apresenta uma revisão do conhecimento sobre a aplicação de fungos nematófagos no biocontrole de nematóides trichostrongilídeos.

Estratégias de ação dos fungos nematófagos

Os fungos nematófagos consistem em uma grande variedade e diversidade de gêneros e espécies, capazes de infectar e se alimentar de nematóides. Eles causam a mortalidade dos nematóides afetados, devido à sua multiplicação para produção de estruturas reprodutivas. De acordo com a estratégia utilizada no nematofagismo, eles podem ser classificados em ovicidas, endoparasitas e predadores.

Os fungos ovicidas exercem sua atividade em embriões de nematóides. As hifas fixam-se nos ovos disponíveis em sua proximidade através do estabelecimento de um ponto de contato, onde ocorre a destruição do complexo quitina-proteína e a formação de uma dilatação (Lýsek & Krajší, 1987, López-Llorca & Duncan, 1988).

Neste ponto, o fungo inicia o seu crescimento, projetando ramos micelianos para o interior do ovo, culminando com a destruição do embrião. Nenhuma informação sobre a ação desses fungos em nematóides trichostrongilídeos é ainda disponível. Apesar da possibilidade desses fungos terem um papel na destruição de ovos no ambiente, os ovos de trichostrongilídeos se desenvolvem rapidamente após a deposição do bolo fecal nas pastagens (menos de 24 horas), o que pode, portanto, limitar a atuação dos fungos que utilizam-se desta estratégia. Entretanto, seu uso poderia ser de interesse sobre ovos de outros helmintos, tais como os do gênero *Ascaris*, que necessitam permanecer um longo tempo no ambiente até completar o seu desenvolvimento embrionário (Lýsek & Krajší, 1987; Araújo et al., 1995).

A atuação e potencialidade dos fungos endoparasitas nas formas de vida livre de trichostrongilídeos são pouco conhecidas. Dentre eles, algumas informações são disponíveis para *Harposporium anguillulae* e *Drechmeria coniospora*. *H. anguillulae* é um fungo cosmopolita que ocorre em uma variedade de habitats (Glockling, 1993). Para infectar nematóides, seu conídio necessita ser ingerido pelas larvas de primeiro e segundo estágio. Uma vez ingerido, ele se multiplica, ocasionando a absorção do conteúdo do corpo da larva e, conseqüentemente, a sua morte. Seu conidióforo se exterioriza (Figura 1) e os conídios são produzidos (Figura 2). Clamidósporos são observados no corpo do nematóide em estágios adiantados da infecção. O fato de necessitar ingestão faz com que os conídios tenham que estar disponíveis em quantidade suficiente no ambiente fecal, para que as larvas de primeiro e segundo estágio, que desenvolvem-se rapidamente (24-48 horas), possam ingeri-los. Em um bioensaio preliminar, esse fungo demonstrou ser capaz de promover uma redução de 99,5% das larvas de *H. contortus*, quando 300.000 conídios foram adicionados a cada grama de fezes (Charles et al., 1996). O mesmo foi observado com *D. coniospora*, um fungo que necessita ter seus conídios aderidos à região cefálica das larvas, nas proximidades da cavidade bucal (Figura 3). Contudo, para que o processo ocorra com eficiência na natureza, a densidade de conídios presentes nas fezes necessita ser muito maior (10^8 conídios em cada grama de fezes) (Santos & Charles, 1995).

A atividade dos fungos nematófagos que efetuam o nematofagismo através da predação das larvas de nematóides trichostrongilídeos no ambiente fecal

(fungos predadores) é a mais conhecida. Esses fungos possuem um desenvolvimento hifal intenso e produzem, ao longo das hifas, estruturas especializadas (armadilhas), aderentes ou não (Nordbring-Hertz, 1972), com a finalidade de executar a captura dos nematóides (Figura 4). Essas estruturas podem ser produzidas espontaneamente (Blackburn & Hayes, 1966), estarem disponíveis no ambiente ou serem produzidas em resposta a múltiplos fatores, como motilidade (Jansson & Nordbring-Hertz,1980), concentração (Gronvold,1989), substâncias derivadas dos nematóides (Wotton & Pramer,1966; Nordbring-Hertz, 1973), escassez de água e/ou nutrientes (Balan & Gerber,1972) e o chamado ritmo endógeno, em que as hifas vegetativas crescendo são ritmicamente predispostas para produção de picos de armadilhas (Lysek & Nordbring-Hertz,1981).

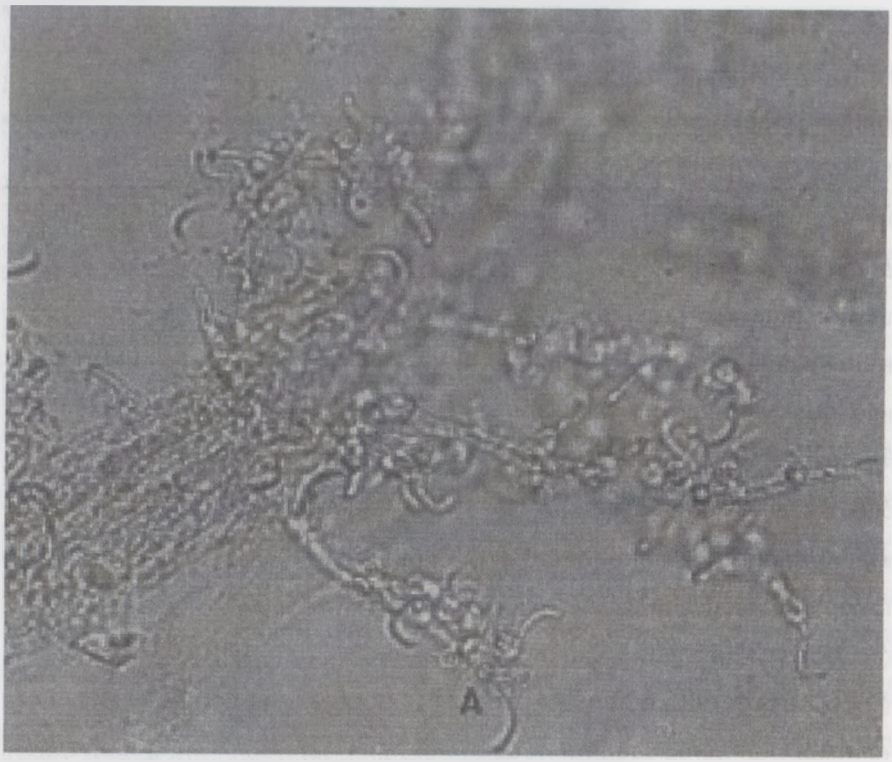


FIGURA 1. Conidióforos de *Harposporium anguillulae* projetando-se através da cutícula de um nematódeo afetado. A – conído e célula conidiogênica.

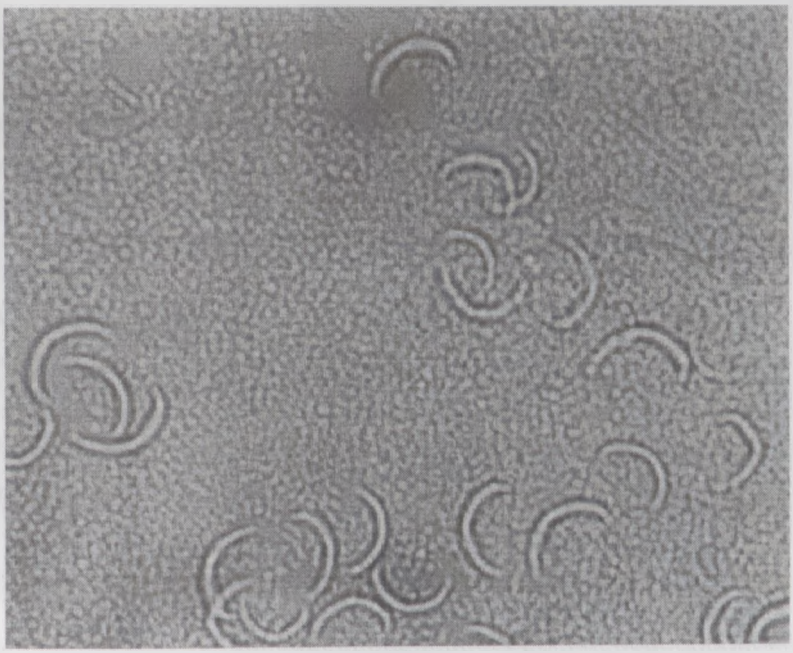


FIGURA 2. Conídio de *Harposporium anguillulae*.

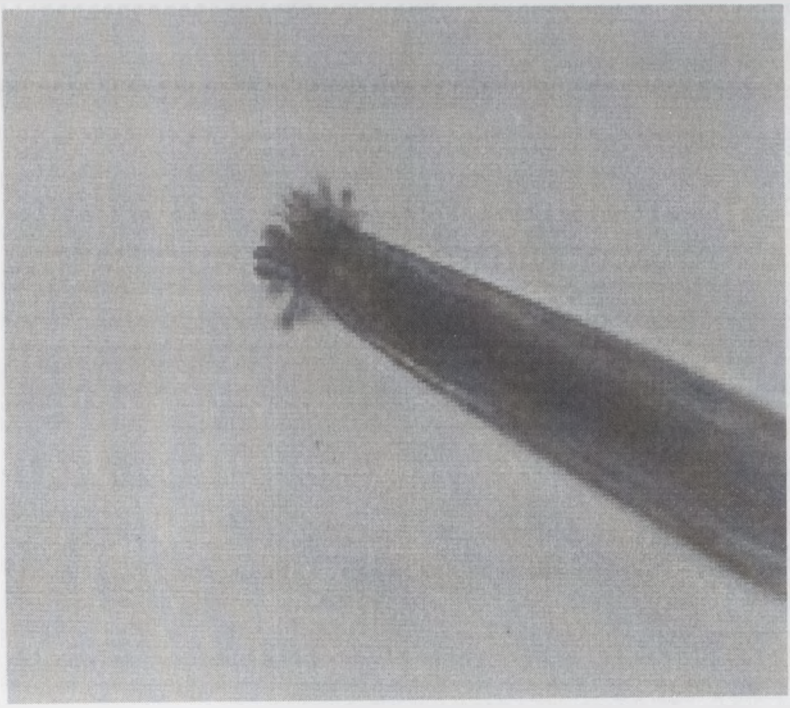


FIGURA 3. Conídio de *Drechmeria coniospora* aderido a região cefálica de larvas de primeiro estágio de *Haemonchus contortus*.

FIGURA 4. Nematódeos apreendidos em armadilhas de fungo predador.

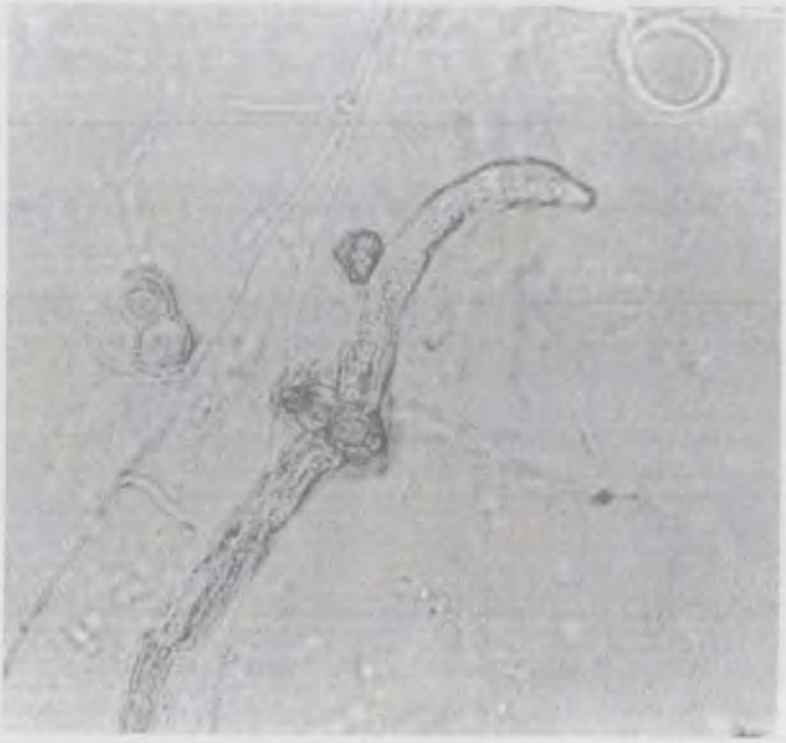


FIGURA 5. Nematódeo capturado por anel constritor.

Os tipos de armadilhas presentes nas hifas dos fungos predadores são variados. Eles podem ter ação ativa ou passiva e serem ou não recobertos por substâncias adesivas. As armadilhas em forma de anel podem ter ação ativa (anéis constritores) ou passiva (não-constritores). Os anéis constritores apreendem os nematóides através da expansão das suas células, promovendo o estrangulamento do nematóide apreendido em menos de 0,1 segundo (Rubner, 1996) (Figura 5). Os anéis não-constritores têm ação passiva, no entanto como eles são revestidos por uma substância adesiva, os nematóides apreendidos não conseguem se liberar dos anéis, facilitando o processo de infecção. No início desta, os nematóides nadam sem que sua motilidade seja afetada pelos anéis, favorecendo assim a disseminação do fungo no ambiente (Barron, 1977). Nos dois tipos de anéis, os nematóides ao penetrarem no seu interior se enrolam e não conseguem sair, seja devido à fixação ocasionada pela expansão celular ou à fixação na camada adesiva superficial.

O processo de apreensão efetuado pelos fungos nematófagos predadores inicia-se no momento em que os nematóides são atraídos e apreendidos nas estruturas especializadas. Substâncias hidrolíticas produzidas pelo fungo auxiliam na imobilização do nematóide, facilitando o processo de infecção. Um bulbo é formado no ponto de contato e o crescimento da hifa se inicia. Pouco tempo depois, todo o corpo do nematóide é tomado pelo crescimento hifal, ocorrendo então a mortalidade do nematóide. No gênero *Arthrobotrys*, por exemplo, as larvas são atraídas e capturadas nas armadilhas, aderentes ou não, dependendo da espécie (Jansson & Nordbring-Hertz, 1979; 1980). Após esse contato físico inicial, vários eventos bioquímicos são iniciados (ativação de receptores de lectina, modificação de polímeros na superfície de contato, ativação de enzimas específicas e produção de substâncias hidrolíticas), facilitando a ligação entre o nematóide e o fungo e o processo de infecção (Nordbring-Hertz & Matiasson, 1979; Borrebaeck et al., 1984, 1985; Nordbring-Hertz, 1988; Rosén et al., 1991; Tunlid & Jansson, 1991; Tunlid et al., 1991, 1992). Em seguida, o fungo penetra na cutícula da larva, formando um bulbo, e inicia o crescimento da hifa que preenche todo o corpo do nematóide, ocasionando alteração das suas funções vitais e, conseqüentemente, a sua morte (Drechsler, 1937).

Arthrobotrys oligospora e *Duddingtonia flagrans*

Dentre os fungos predadores, *Arthrobotrys oligospora* e *Duddingtonia flagrans* são os mais estudados visando à redução dos estágios de vida livre de nematóides trichostrongilídeos nas pastagens. Esses fungos formam armadilhas tanto na presença de larvas de primeiro e segundo estágio, como na de larvas infectantes. As espécies cujas larvas infectantes são de maior motilidade, tais como *Cooperia oncophora*, *Ostertagia ostertagi*, *Haemonchus contortus* ou *Cyathostoma* spp., estimulam a produção de armadilhas mais rapidamente que larvas de *Oesophagostomum dentatum*, *O. quadrispinulatum* ou *Nematodirus dubius*, de movimentos mais lentos (Nansen et al., 1988). As armadilhas geralmente são formadas em cerca de três a seis horas, após o contato do fungo com as larvas e em doze a quinze horas a maioria das larvas pode estar aprisionada e infectada (Nansen et al., 1986). As larvas de primeiro e segundo estágio são mais suscetíveis e morrem rapidamente. Já as larvas infectantes, devido à proteção conferida pela retenção da cápsula da larva de segundo estágio, demoram um tempo maior para morrer, permanecendo em movimento por cerca de 20 horas após o aprisionamento (Nansen et al., 1986).

A atividade predatória de *A. oligospora* e *D. flagrans* em nematóides gastrointestinais de ruminantes foi demonstrada em vários ensaios laboratoriais e de campo. Neles ficou evidente que essas duas espécies produzem reduções significativas das larvas, quando presentes em densidades adequadas no ambiente fecal. *A. oligospora* é um fungo cosmopolita presente em uma ampla variedade de habitats (Estey & Olthof, 1965), nas quais forma micélio septado e cresce saprofiticamente. Numerosos conídios uniseptados são produzidos e distribuídos em forma de cachos, ao longo de um conidióforo erecto. Na presença de nematóides, esse fungo elabora uma armadilha altamente adesiva, com aspecto de uma rede tridimensional (Drechsler, 1933). As redes podem secretar substâncias que paralisam ou matam os nematóides capturados (Olthof & Estey, 1963).

Uma cepa de *A. oligospora*, isolada na Suécia, foi utilizada nos primeiros estudos na Dinamarca, com o objetivo de avaliar sua eficácia contra formas larvares de vida livre dos helmintos parasitas dos animais domésticos. Em uma primeira etapa,

estudos em nível laboratorial sobre a ecologia do fungo foram desenvolvidos para conhecer a influência de fatores, tais como pH, temperatura e tensão de oxigênio, sobre a taxa de crescimento (Grønvold et al., 1985); e temperatura, tensão de oxigênio, luz, nível de nutrientes e concentração de larvas, sobre a indução de armadilhas (Grønvold, 1989). Diferentes níveis de inoculação foram testados, observando-se que quanto maior a concentração do fungo, maior era o número de larvas apreendidas (Grønvold et al., 1985). Várias espécies de nematóides parasitas em diferentes espécies animais foram testadas *in vitro*, comprovando a atividade nematófaga de *A. oligospora* (Nansen et al., 1988). A partir dos resultados obtidos, experimentos preliminares em nível de campo foram conduzidos. Neles, bolos fecais bovinos contendo ovos de *Cooperia oncophora* e inoculados com *A. oligospora* foram depositados em pastagens livres de parasitos para comparação com bolos fecais sem fungos, revelando ser esse fungo capaz de reduzir em 86% o número de larvas infectantes, nas pastagens ao redor dos bolos (Grønvold et al., 1987). Estudos posteriores confirmaram a eficácia de *A. oligospora* para *Ostertagia ostertagi*, na qual se observou uma redução de até 89% no número de larvas disponíveis nas pastagens contendo bolos fecais tratados (Grønvold et al., 1988). Em testes com animais, bezerros mantidos em pastagens contendo bolos fecais inoculados com fungos adquiriram um grau menor de parasitismo, já que o número de ovos por grama de fezes e o nível de pepsinogênio sérico foram menores que nos animais controles e o peso corporal foi maior (Grønvold et al., 1989).

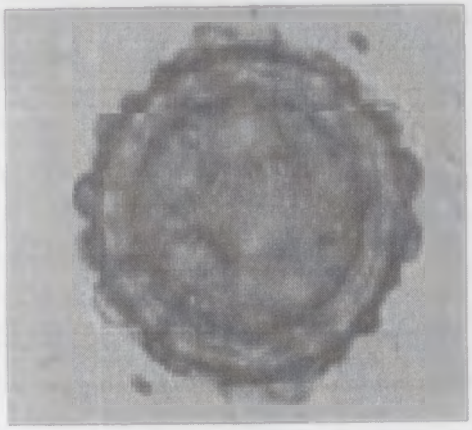


FIGURA 6. Clamidósporo de *Duddingtonia flagrans*.

Como o objetivo essencial do uso de fungos nematófagos é atingir as larvas que se desenvolvem nas fezes, a sobrevivência durante a passagem pelo trato gastrointestinal do animal é desejável, já que, desta maneira, o fungo é eliminado nas fezes frescas, no momento da deposição. Uma cepa de *A. oligospora* utilizada em experimentos preliminares não sobreviveu ao estresse digestivo de diversas espécies animais (Larsen et al., 1992). Assim, a busca por novos isolados com essa característica foi iniciada.

A capacidade de diversos isolados em sobreviver em condições *in vitro* que simulavam o trato digestivo de bovino foi também avaliada. Em um experimento inicial, seis de treze isolados do gênero *Arthrobotrys* (Larsen et al., 1991) e sete de oito do gênero *Duddingtonia* foram capazes de sobreviver ao estresse digestivo. Quando foi comparada a eficácia de *A. oligospora e D. flagrans* após a sobrevivência ao estresse digestivo, verificou-se uma redução de 75% e 96% no número de larvas infectantes nos cultivos fecais, respectivamente (Larsen et al., 1991). Considerando os resultados iniciais, testes *in vivo* foram implementados e confirmaram a capacidade do gênero *Duddingtonia* em atravessar o trato gastrintestinal de bovinos, mantendo sua eficácia nematófaga (Larsen et al., 1992), observação feita previamente por Peloille (1991), em um isolado de *D. flagrans*, na França. Estas observações e a capacidade de produzir clamidósporos em abundância em meios de cultura diversos ocasionaram a concentração das pesquisas nas espécies do gênero *Duddingtonia*, com ênfase em *D. flagrans*.

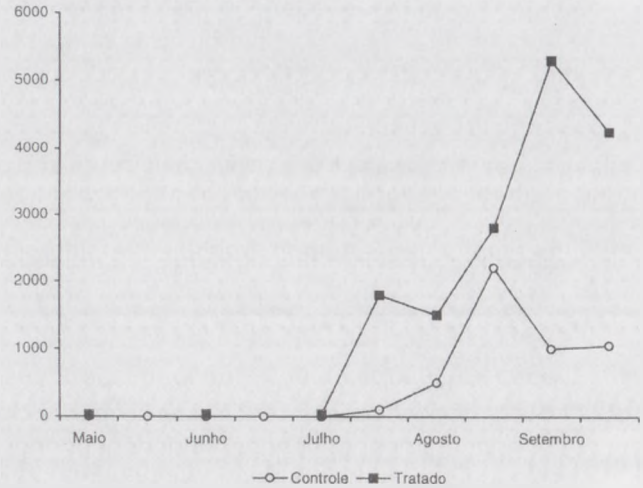


FIGURA 7. Disponibilidade de larvas de nematódeos trichostrongilídeos em pastagens onde bovinos foram alimentados (Tratado) com *Duddingtonia flagrans* ou receberam suplementação sem *D. flagrans* (Controle) (Modificado de Wolstrup et al., 1994).

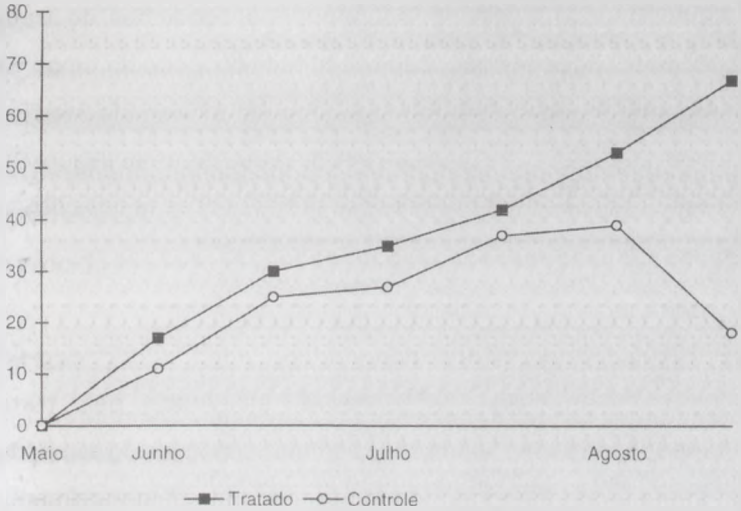


FIGURA 8. Ganho de peso de bovinos alimentados com *Duddingtonia flagrans* (Tratados) e bovinos controle (Modificado de Nansen et al., 1995).

A espécie *D. flagrans* tem sido estudada exaustivamente em alguns países (Faedo et al., 1997,1998; Mendoza de Gives et al., 1998; Larsen, 1999). Essa espécie de fungo desenvolve-se rapidamente em meios de cultura e produz clamidósporos em grande quantidade (Duddington, 1950) (Figura 6) e esses capacitam o fungo a sobreviver à passagem pelo trato digestivo, quando oferecidos em mistura à suplementação alimentar (Waller, 1998).

A possibilidade de adicionar clamidósporos de *D. flagrans* na suplementação alimentar dos animais domésticos tem sido testada como aditivo ao controle integrado da nematodiose gastrointestinal. Após a comprovação em nível laboratorial e em alguns ensaios de campo das possibilidades da espécie *D. flagrans* como agente no controle biológico, testes de campo foram desenvolvidos demonstrando que quando bovinos foram alimentados com material fúngico a contaminação das pastagens com as larvas infectantes de trichostrongilídeos reduziu significativamente (Grønvold et al., 1993; Wolstrup et al., 1994; Larsen et al., 1995b; Nansen et al., 1995) (Figura 7). Experimentos posteriores avaliaram a eficácia de *D. flagrans* sobre larvas de nematóides de eqüinos (Larsen et al., 1995a, 1996; Santos, 1996; Fernández et al., 1997, 1999), ovinos (Faedo et al., 1997; Githigia et al., 1997) e suínos (Nansen et al., 1996; Petkevicius et al., 1998), obtendo-se o mesmo sucesso que em bovinos

e demonstrando a capacidade do fungo em sobreviver às condições do trato gastrointestinal de diversas espécies animais. Como resultado do efeito do fungo na redução da disponibilidade de larvas infectantes nas pastagens, os animais tratados obtiveram maiores ganhos de peso em comparação aos do grupo controle (Figura 8). Ensaios em nível de campo estão atualmente em andamento em várias regiões (FAO, 1998).

Outros fungos nematófagos predadores

A capacidade dos fungos predadores de atravessar pelo trato gastrointestinal dos animais, mantendo sua atividade nematófaga, tem sido estudada em outras espécies. *Arthrobotrys musiformis*, uma espécie encontrada naturalmente em fezes frescas de bovinos (Saumell et al., 1999), foi recuperada das fezes de duas bezerras entre o terceiro e quarto dia após a ingestão de material fúngico. A presença do fungo nas fezes ocasionou uma redução de até 99% na contagem de larvas infectantes nas coproculturas efetuadas com fezes colhidas no terceiro dia, após a ingestão do fungo (Santos et al., 1996). O tratamento de bovinos com uma suspensão de 23 e 150 milhões de conídios de *Arthrobotrys cladodes*, administrada via oral, demonstrou que esse fungo pode ser recuperado das fezes na oitava hora após a ingestão, quando o percentual de redução no número de larvas infectantes nas coproculturas foi de 41%. Já 20 horas após a administração, o percentual de redução no número de larvas foi de 62% (Santos et al., 1997). Bezerros tratados via oral com uma dose individual de 2×10^6 conídios de um isolado de *Arthrobotrys robusta*, administrada duas vezes por semana ao longo de seis meses, apresentaram ao final do estudo um número médio de ovos por grama de fezes significativamente inferior aos que não receberam o tratamento. A contagem de nematóides recuperados em animais livres de infecção, adicionados mensalmente nas pastagens utilizadas pelos bezerros tratados, foi 70,5% inferior ($P<0,05$) (Araújo, 1996). Um isolado mexicano de *Arthrobotrys superba* mostrou ser capaz de atravessar o trato gastrointestinal de ovinos. Após a administração oral de uma suspensão aquosa, contendo aproximadamente 560.000 conídios, o fungo foi detectado nas fezes entre 27 e 46 horas após a administração, sem perder sua capacidade nematófaga (Llerandi-Juárez

& Mendoza de Gives, 1998). Apesar destas espécies não formarem clamidósporos como *D. flagrans*, elas mantêm a atividade predatória contra larvas de trichostrongilídeos, após a passagem pelo trato digestivo. Entretanto, esses fungos apenas foram produzidos para ensaios com poucos animais. A continuação da avaliação da capacidade nematófaga dessas espécies dependerá inicialmente do desenvolvimento de processos de produção de inóculos em maior escala.

Perspectivas de utilização

A utilização de fungos nematófagos na redução da disponibilidade de larvas infectantes de nematóides trichostrongilídeos é um método alternativo de controle promissor. Os resultados obtidos até o momento, principalmente com o fungo *D. flagrans*, são alentadores e oferecem perspectivas de uso em nível de campo a médio prazo. Vários estudos, contudo, precisam ser implementados para que o biocontrole seja uma realidade no controle integrado da verminose gastrointestinal de ruminantes. Diversos aspectos sobre a biologia e ecologia dos fungos nematófagos necessitam ser ainda conhecidos, tais como mecanismos de interação com o habitat; capacidade de adaptação a diferentes nichos ecológicos; efeito da inundação maciça das fezes com uma espécie de fungo no ambiente fecal, na colonização natural das fezes por outros fungos e demais habitantes da massa fecal em decomposição no ambiente; mecanismos de potenciação da capacidade nematófaga dos isolados; e métodos de produção massal, entre outros.

Algumas tentativas foram iniciadas com o objetivo de estudar aspectos ecológicos. Como a inundação das fezes com uma espécie de fungo poderá ocasionar alterações no equilíbrio ecológico do complexo habitat onde esses fungos irão atuar, alguns estudos procuraram verificar possíveis efeitos em outros alvos. Por exemplo, o possível efeito do uso contínuo de *D. flagrans* em nematóides do solo foi avaliado não tendo sido encontrada qualquer alteração (Yeates et al., 1997). Roque (1998) também trabalhando com um nematóide do solo, *Panagrellus* sp, observou que altas concentrações de *Harposporium anguillulae* em culturas de fezes contendo ovos de *Haemonchus contortus* não ocasionaram impacto na população deste nematóide, até a concentração de 2×10^5 conídios por grama de fezes. Em um outro estudo, Fernández

et al. (1999) demonstraram que a presença maciça de *D. flagrans* em bolos fecais não afetou os valores de matéria seca e o conteúdo de matéria orgânica. Contudo, pesquisas adicionais precisam ser intensificadas para que efeitos ecológicos possam ser prevenidos ou evitados, principalmente se a potencialização da atividade dos fungos envolver manipulação e conseqüente alteração genética.

Por enquanto, espécies de fungos nematófagos têm sido avaliadas isoladamente. A possibilidade de uso de combinação de espécies de fungos deve ser examinada, já que é possível que estratégias de ação diferentes possam promover uma melhor eficácia nematófaga, como foi sugerido por Larsen (1991).

A busca por fungos que possam efetuar sua atividade com um inóculo reduzido deve ser incentivada. A alternativa de produção de fungos geneticamente modificados, visando a capacitá-los para incrementar suas características nematófagas no ambiente, sobrevivência ao trato digestivo e propriedades que facilitem a produção em escala industrial deve igualmente ser considerada.

Até o momento, os testes de campo têm sido conduzidos com fungos produzidos em meio sólido composto, principalmente, por grãos contendo o material fúngico, em geral seco. Entretanto, a produção em meio sólido é limitada e pouco viável para a produção em escala comercial. Técnicas de produção em escala que promovam a multiplicação rápida com baixo custo necessitam ser desenvolvidas. Etapas preliminares de estudos nesta direção devem visar a abordagens que assegurem a manutenção da virulência dos fungos, ao longo do processo de produção.

A produção de fungos em grãos, efetuada para os testes de campo conduzidos até o momento, condicionou a oferta do material juntamente com a suplementação alimentar diária. Esta forma de administração é viável para suínos e eqüinos, nos quais a suplementação diária é rotineira nos sistemas produtivos, mas não se aplica totalmente na produção de ruminantes, na qual outras formas de administração oral podem ser mais práticas e de utilização mais ampla, tais como bolos de liberação, blocos de sais minerais ou melaça, entre outros. Assim, mecanismos que facilitem a incorporação do material fúngico em formulações direcionadas aos sistemas de produção de ruminantes precisam ser considerados nos programas de pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J.V. Interação entre larvas infectantes de *Cooperia punctata* e fungos predadores do género *Arthrobotrys*, caracterização de isolados de *Arthrobotrys* e seu uso no controle biológico de nematóides parasitos gastrintestinais de bovinos. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1996. 120p. Tese, Doutorado.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.47, p.37-42, 1995.

BARRON, G.L. The nematode-destroying fungi. In: TOPICS in mycobiology. Guelph: Canadian Biological Publications, 1977. v.1, 140p.

BLACKBURN, F.; HAYES, W.A. Studies on the nutrition of *Arthrobotrys oligospora* Fres. and *Arthrobotrys robusta* Dudd. I. The saprophytic phase. **Annals of Applied Biology**, v.58, p.43-50, 1966.

BORREBAECK, C.A.; MATTIASSON, B.; NORDBRING-HERTZ, B. Isolation and partial characterization of a carbohydrate-binding protein from a nematode-trapping fungus. **Journal of Bacteriology**, v.159, p.53-56, 1984.

BORREBAECK, C.A.K.; MATTIASSON, B.; NORDBRING-HERTZ, B. A fungal lectin and its apparent receptors on a nematode surface. **FEMS Microbiology Letters**, v.27, p.35-39, 1985.

BURNEY, K.; ESTEY, H. A note on the non-difusibility of a substance produced by nematodes that induced *Arthrobotrys oligospora* to form nematode traps. **Phytoprotection**, v.66, p.163-164, 1985.

CHARLES, T.P.; FURLONG, J. A survey of dairy cattle worm control practices in Southeast Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.65, p.65-73, 1996.

CHARLES, T.P.; ROQUE, M.V.C.; SANTOS, C.P. Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by *Harposporium anguillulae* in sheep faecal cultures. **International Journal of Parasitology**, v.26, p.509-510, 1996.

DRECHSLER, C. Morphological features of some more fungi that capture and kill nematodes. **Journal of Washington Academy of Science**, v.23, p.267-270, 1933.

DRECHSLER, C. Some hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. **Mycologia**, v.29, p.552, 1937.

DUDDINGTON, C.L. A new predacious species of *Trichothecium*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.32, p.284-287, 1950.

ECHEVARRIA, F. Resistência anti-helmíntica. In: PADILHA, T., ed. **Controle dos nematóides gastrintestinais em ruminantes**. Coronel Pacheco: EMBRAPA- CNPGL, 1996. p.53-75.

ECHEVARRIA, F.; PINHEIRO, A. A. Avaliação de resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos no município de Bagé, RS. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.9, n.3/4, p.69-71, 1989.

ECHEVARRIA, F.; BORBA, M.F.S.; PINHEIRO, A.C.; WALLER, P.J.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.62, p.199-206, 1996.

ESTEY, R.H.; OLTHOF, Th.H.A. The ocurrence of nematophagous fungi in Quebec. **Phytoprotection**, v.46, p.14-17, 1965.

FAO. **Biological control of gastro-intestinal nematodes of ruminants using predacious fungi**. Rome: FAO, 1998. p.1-93. (FAO Animal Production and Health Paper, 141).

FAEDO, M.; LARSEN, M.; WALLER, P.J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: comparison between Australian isolates of *Arthrobotrys* spp. and *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v.72, p.149-155, 1997.

FAEDO, M.; BARNES, E.H.; DOBSON, R.J.; WALLER, P.J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: Pasture plot study with *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v.76, p.129-135, 1998.

FERNÁNDEZ, A.S.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; WOLSTRUP, J. Effect of the nematode-trapping fungus *Duddintonia flagrans* on the free-living stages of horse parasitic nematodes: a plot study. **Veterinary Parasitology**, v.73, p.257-266, 1997.

FERNANDEZ, A.S., LARSEN, M.; NANSEN, P.; HENNINGSEN, E.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; BJØRN, H. The ability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce the transmission of infective *Ostertagia ostertagi* larvae from faeces to herbage. **Journal of Helminthology**, 1999 (no prelo).

GILL, H.S.; LE JAMBRE, L.F. Novel approaches to the control of helminth parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**, v.26, 797-1007, 1996.

GITHIGIA, S.M., THAMSBORG, S.M.; LARSEN, M.; KYVSGAARD, N.C.; NANSEN, P. The preventive effect of the fungus *Duddingtonia flagrans* on Trichostrongyle infections of lambs on pasture. **International Journal for Parasitology**, v.27, p.931-939, 1997.

GLOCKLING, S.L. Eelworm-eaters the *Harposporium* and the host. **Micologist**, v.7, p.139-142, 1993.

GRONVOLD, J.; KORSHOLM, J.; WOLSTRUP, P.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S.A. Laboratory experiments to evaluate the ability of *Arthrobotrys oligospora* to destroy infective larvae of *Cooperia* species, and to investigate the effect of physical factors on the growth of the fungus. **Journal of Helminthology**, v.59, p.119-125, 1985.

GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; NANSEN, P. Field experiments on the ability of *Arthrobotrys oligospora* (Hyphomycetales) to reduce the number of larvae of *Cooperia oncophora* (Trichostrongylidae) in cows pats and surrounding grass. **Journal of Helminthology**, v.61, p.65-71, 1987.

GRONVOLD, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S.A.; THYLIN, J.; WOLSTRUP, J. The capability of the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora* (Hyphomycetales) to reduce numbers of infective larvae *Ostertagia ostertagi* (Trichostrongylidade) in cow pats and herbage during the grazing season Denmark. **Journal of Helminthology**, v.62, p.271-280, 1988.

GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J.; THYLIN, J. Attemps to control infection with *Ostertagia ostertagi* (Trichostrongylidae) in grazing calves by adding mycelium of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* (Hyphomycetales) to cow pats. **Journal of Helminthology**, v.63, p.115-126, 1989.

GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S.A.; LARSEN, M.; BRESCIANI, J. Biological control of nematode parasites in cattle with nematode-trapping fungi: a survey of Danish studies. **Veterinary Parasitology**, v.48, p.311-325, 1993.

HERD, R. Impactos ambientais associados aos compostos endectocidas. In: PADILHA, T.P., ed. **Controle dos nematóides gastrintestinais em ruminantes**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. p.95-111.

IGLESIAS, L.E. Colonização de bolos fecais de bovinos tratados com ivermectin durante a época seca em condições simuladas de campo. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora, 1998. 69p. Tese, Doutorado.

JANSSON, H.B.; NORDBRING-HERTZ, B. Attraction of nematodes to living mycelium of nematophagous fungi. **Journal of General Microbiology**, v.112, p.89-93, 1979.

JANSSON, H.B.; NORDBRING-HERTZ, B. Interactions between nematophagous fungi and plant -parasitic nematodes: attraction, induction of trap formation and capture. **Nematologica**, v.26, p.383-389, 1980.

LARSEN, M. Studies on the capability of microfungi to destroy animal parasitic nematodes. Copenhagen, 1991. 61p. Ph.D. Thesis.

LARSEN, M. Biological control of helminths. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.139-146, 1999.

LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; DACKMAN, C.; GRØNVOLD, J.; NANSEN, P. In vitro stress selection of nematophagous fungi biocontrol of parasitic nematodes in ruminants. **Journal of Helminthology**, v.65, p.193-200, 1991.

LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; GRØNVOLD, J.; NANSEN, P. In vivo passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. **Journal of Helminthology**, v.66, p.137-141, 1992.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S.A.; WOLSTRUP, J.; GRØNVOLD, J.; ZORN, A.; WEDO, E. Predacious activity of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against cyathostome larvae in faeces after passage through the gastrointestinal tract of horses. **Veterinary Parasitology**, v.60, p.315-320, 1995a.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; ZORN, A. Biological control of trichostrongyles in calves by the fungus *Duddingtonia flagrans* fed to animals under natural grazing conditions. **Veterinary Parasitology**, v.60, p.321-330, 1995b.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRØNDHAL, C.; THAMSBORG, S.M.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; MONRAD, J. The capacity of the fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture. **Parasitology**, v.113, p.1-6, 1996.

LLERANDI-JUÁREZ, R.D.; MENDOZA DE GIVES, P. Resistance of chlamydospores of nematophagous fungi to the digestive processes of sheep in Mexico. **Journal of Helminthology**, v.72, p.155-158, 1998.

LÓPEZ-LLORCA, L.V.; DUNCAN, G.H. A scanning electron microscopy study fungal endoparasitism of cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*). **Canadian Journal of Microbiology**, v.34, p.613-619, 1988.

LYSEK, G.; NORDBRING-HERTZ, B. An endogenous rhythm of trap formation in the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Planta**, v.152, p.50-53, 1981.

LYSEK, H.; KRAJŠÍ, D. Penetration of ovicidal fungus *Verticillium chlamydosporium* through the *Ascaris lumbricoides* egg-shells. **Folia Parasitologica**, v.34, p.57-60, 1987.

MENDOZA DE GIVES, P.; FLORES CRESPO, J.; HERRERA RODRÍGUEZ, D.; VAZQUEZ PRATS, V.; LIEBANO HERNÁNDEZ, E.; ONTIVEROS, FERNÁNDEZ, G.E. Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces by administering an oral suspension of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to sheep. **Journal of Helminthology**, v.72, p.343-347, 1998.

NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; WOLSTRUP, J. Predacious activity of the nematode-destroying fungus, *Arthrobotrys oligospora*, on preparasitic larvae of *Cooperia oncophora* and on soil nematodes. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v.53, p.237-243, 1986.

NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; WOLSTRUP, J. Interaction between the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora* and third-stage larvae of a series of animal-parasitic nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.26, p.329-337, 1988.

NANSEN, P.; LARSEN, M.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; ZORN, A.; HENRIKSEN, S.A. Prevention of clinical trichostrongylidosis in calves by strategic feeding with the predacious fungus *Duddingtonia flagrans*. **Parasitology Research**, v.81, p.371-374, 1995.

NANSEN, P.; LARSEN, M.; ROEPSTORFF, A.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A. Control of *Oesophagostomum dentatum* and *Hyostrongylus rubidus* in outdoor-reared pigs by daily feeding with the microfungus *Duddingtonia flagrans*. **Parasitology Research**, v.82, p.580-584, 1996.

NORDBRING-HERTZ, B. Scanning electron microscopy of the nematode-trapping organs in *Arthrobotrys oligospora*. **Physiologia Plantarum**, v.26, p.279-284, 1972.

NORDBRING-HERTZ, B. Peptide-induced morphogenesis in the nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Physiologia Plantarum**, v.29, p.223-233, 1973.

NORDBRING-HERTZ, B. Nematode-induced morphogenesis in the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Nematologica**, v.23, p.443-451, 1977.

NORDBRING-HERTZ, H.; MATIASSON, B. Action of the nematode-trapping fungus shows lectin-mediated host-microrganism interaction. **Nature**, v.281, p.477-479, 1979.

NORDBRING-HERTZ, B. Nematophagous fungi: Strategies for nematode exploitation and for survival. **Microbiological Sciences**, v.5, p.108-116, 1988.

OLTHOF, H.A.; ESTEY, R.H. A nematoxin produced by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* Fresenius. **Nature**, v.197, p.514-515, 1963.

PADILHA, T. Resíduos de anti-helmínticos na carne e leite. In: PADILHA, T., ed. **Controle dos nematóides gastrintestinais em ruminantes**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. p.77-93.

PELOILLE, M. Selection of nematode-trapping fungi for use in biological control. **Bulletim OILB/SROP**, v.14, n.2, p.13-17, 1991.

PETKEVIIUS, S.; LARSEN, M.; KNUDSEN, K.E.B.; NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; WOLSTRUP, J. The effect of the nematode-destroying fungus *Duddingtonia flagrans* against *Oesophagostomum dentatum* larvae in faeces from pigs fed different diets. **Helminthologia**, v.35, p.111-116, 1998.

ROQUE, M.V.C. Avaliação de *Harposporium anguillulae* (Mycota: Deuteromycetes) no biocontrole de estágios pré-parasitários de *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae). Itajaí: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1998. 52p. Dissertação, Mestrado.

ROSÉN, S.; EK, B.; RASK, L.; TUNLID, A. Purification and characterization of a surface lectin from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Journal of General Microbiology**, v.138, p.2663-2672, 1992.

RUBNER, A. Revision of predacious Hyphomycetes in the *Dactylella-Monacrosporium* complex. **Studies in Mycology**, v.39, p.1-134, 1996.

SANTOS, C.de P. Atividade predatória de *Arthrobotrys oligospora* e *Arthrobotrys flagrans* nos estádios larvares pré-parasíticos de cyathostominae em diferentes temperaturas. Itajaí: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. 51p. Dissertação, Mestrado.

SANTOS, C. de P.; CHARLES, T.P. Efeito da aplicação de conídios de *Drechmeria coniospora* em cultivos de fezes contendo ovos de *Haemonchus contortus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.47, p.123-128, 1995.

SANTOS, C. de P.; PADILHA, T.; SAUMELL, C.A. Efficacy of *Arthrobotrys musiformis* in reducing infective larvae of trichostrongylid nematodes in fecal cultures after passage through bovine gastrointestinal tract. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz de Iguaçu. **Anais**... Foz de Iguacu: Embrapa-CNPSo, 1996. p.65.

SANTOS, C. de P.; PADILHA, T.; SAUMELL, C.A. Persistência de *Arthrobotrys cladodes* à passagem pelo sistema digestivo de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.6, p.184, 1997.

SAUMELL, C. A ; PADILHA, T.; SANTOS, C. DE P.; ROQUE, M.V. C. Nematophagous fungi in fresh feces of cattle in the Mata Region of Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.217-220,1999.

TUNLID, A.; JANSSON, S. Proteases and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.2868-2872, 1991.

TUNLID, A.; ROSÉN, S.; NORDBRING-HERTZ, B. Molecular mechanisms of adhesion in the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Journal of Mycology Médicine**, v.2, p.36-42, 1992.

WALLER, P.J. **Possible means of using nematophagous fungi to control nematode parasites of livestock**: proceedings of a workshop organized by FAO and the Danish Centre for Experimental Parasitology, Ipoh, Malaysia, 5-12 October 1997. [S.l.], 1998. p.11-14.

WOLSTRUP, J.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; NANSEN, P.; LARSEN, M.; BØGH, H.O.; ILSØE, B. An attemp to implement the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* in biological control of trichostrongyle infections of first year grazing calves. **Journal of Helminthology**, v.68, p.175-180, 1994.

YEATES, G.W.; WALLER, P.J.; KING, K.L. Soil nematodes as indicators of effect of management on grasslands in the new england tablelands (NSW): effect of measures for control of parasites of shepp. **Pedobiologia**, v.41, p.537-548,1977.

4

CONTROLE BIOLÓGICO DE CARRAPATOS

Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

INTRODUÇÃO

Os carrapatos são parasitas de grande importância para o homem, para os animais domésticos e silvestres, pois, além da espoliação sangüínea, são vetores de bactérias, protozoários, rickétsias e vírus em quase todo o mundo. A doença de Lyme no homem e a babesiose em animais domésticos são doenças transmitidas exclusivamente por carrapatos (Kalsbeek et al., 1995).

Os principais carrapatos de importância econômica que ocorrem no Brasil pertencem à família Ixodidae. Uma das espécies mais importantes encontrada no nosso país é o *Boophilus microplus*, que apresenta grande relevância para a pecuária bovina. Os prejuízos exatos causados por esta espécie são de difícil mensuração. As perdas diretas e indiretas causadas por este parasita são mortalidade, principalmente das raças européias; desenvolvimento lento de animais parasitados, acarretando baixa produtividade; transmissão de agentes patogênicos; elevados gastos com carrapaticidas e perdas na produção de couro. As técnicas empregadas no controle da fase não-parasitária desta espécie estão correlacionadas ao manejo de pastagens, e as medidas para o controle da fase parasitária baseiam-se principalmente no uso de acaricidas sobre os animais infestados. Com relação à distribuição geográfica, podemos afirmar que todo o território brasileiro está incluído em zona potencialmente favorável ao desenvolvimento de altas infestações desta espécie de carrapato. Kalsbeek et al.

(1995) afirmam que na maioria das áreas tropicais do mundo não é possível a criação econômica de gado sem o controle carrapaticida apropriado.

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* é um ixodídeo transmissor de uma variedade de agentes patogênicos, principalmente para canídeos, tais como *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* e *Ehrlichia canis*. Além disto, seus fluidos e toxinas salivares produzem reações de irritação acentuada no hospedeiro, o que provoca alterações metabólicas e comportamentais, ferimentos na pele susceptíveis a infecções bacterianas secundárias, miíases e anemia. Como esse conjunto de fatores pode levar os animais à morte, é importante o controle desse parasita. Foi descrito pela primeira vez na África e hoje em dia está amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do mundo inteiro. O controle dessa espécie de carrapato baseia-se principalmente no uso de acaricidas sobre os animais e também no ambiente onde vivem os cães infestados.

O carrapato *Amblyomma cajennense*, conhecido como carrapato estrela, é encontrado principalmente sobre o corpo de equídeos, mas também pode alimentar-se em outros mamíferos, tais como bovinos, cervídeos, canídeos e o próprio homem. Afora os danos diretos causados pela espoliação sangüínea e lesões cutâneas, esta espécie amplamente distribuída na América de Sul e Central ao longo da costa Atlântica, atingindo o Golfo do México e o Sul dos Estados Unidos, é considerada vetora de importantes agentes infecciosos, como a Ehrlichiose Bovina (Massard, 1984) e Tifo Exantemático (Monteiro et al., 1931).

Anocentor nitens acomete principalmente eqüinos, mas pode ser encontrada também sobre outras espécies animais e é responsável pela transmissão de vários agentes causadores de enfermidades em eqüídeos. Denning (1988) cita esta espécie como transmissora de babesiose eqüina. Além disso, a lesão causada por sua picada, associada a secreções do hospedeiro, origina supurações que podem servir de porta de entrada para bactérias e miíases, que mutilam o pavilhão auricular de eqüídeos. Atualmente, essa espécie é encontrada em todas as regiões brasileiras.

Além das espécies citadas, no Brasil ocorrem outras que são mais freqüentes em animais silvestres, porém sua importância econômica na transmissão de agentes patogênicos ainda não foi bem avaliada. Em outros países, várias espécies

de carrapatos apresentam grande importância econômica como transmissoras de agentes patogênicos. Entre elas, podemos citar o *Amblyomma variegatum, A. hebraeum, A. americanum, A. maculatum, Boophilus annulatus, B. decoloratus, B. geigyi, Ixodes scapularis, I. dammini, I. ricinus, I. persulcatus, I. pacificus, Dermacentor andersoni, D. albipictus, D. marginatus, D. pictus, D. variabilis, Hyalomma marginatum, H. detritum, H. anatolicum,, H. scupense, H. dromedari, Rhipicephalus evertsi, R. appendiculatus, R. bursa, Haemaphysalis leporispalustris* da família Ixodidae e *Argas persicus, A. reflexus, Ornithodorus moubata, O. papillides, Otobius megnini* da família Argasidae.

Apesar do avanço da ciência, até o presente momento as infestações de carrapatos em animais domésticos são controladas principalmente por acaricidas químicos, os quais, quando utilizados de forma indiscriminada, podem acarretar problemas no que se refere à poluição do ambiente e ao desenvolvimento de resistência. Portanto, a utilização exclusiva dos carrapaticidas é cada dia menos viável em termos práticos e econômicos, tornando necessária a adição de métodos alternativos a serem empregados em sistemas integrados de controle (Barros & Evans, 1989).

CICLO BIOLÓGICO DOS CARRAPATOS

O ciclo de vida dos carrapatos da família Ixodidae é constituído dos estágios de ovo, larva, ninfa e adultos macho e fêmea. Os ovos são pequenos, de cor âmbar, ovais ou arredondados, pesam cerca de 50 mcg e são recobertos pela secreção produzida pelo órgão de Gené, que os mantêm unidos e protegidos da dessecação. O período de incubação é variável de acordo com a espécie e com os fatores bióticos. O percentual de eclosão das larvas em condições ótimas de temperatura e umidade é superior a 80%. As larvas de carrapatos ficam aproximadamente cinco dias junto aos ovos, aguardando o endurecimento da cutícula e, posteriormente, buscam um hospedeiro para sua alimentação. Após esta, que dura em média cinco dias, ocorre a muda para ninfa, que pode ser no hospedeiro ou no solo. O processo de muda é caracterizado pela parada de movimentos e da alimentação, ocorrendo a formação de nova cutícula sob a antiga. A cutícula antiga se abre liberando o estágio de ninfa. A ninfa emergida também se alimenta da mesma forma que a larva por

aproximadamente seis dias e passa por novo processo de muda para o estágio de adulto. Os machos recém-emergidos procuram as fêmeas para o acasalamento, e as fêmeas fecundadas se ingurgitam por completo soltando-se do hospedeiro, realizando, assim, a oviposição no solo. As fêmeas de carrapatos ovipositam em média 2500 ovos antes da sua morte (Cordovés, 1997).

As principais espécies de carrapatos de importância médico-veterinária são parasitos monoxenos ou heteroxenos. Os carrapatos monoxenos passam toda a sua fase parasitária sobre um hospedeiro, incluindo as mudas de larva para ninfa e de ninfa para adulto. As espécies *Boophilus microplus* e *Anocentor nitens* possuem ciclo biológico tipicamente monoxeno. Estes carrapatos vão ao solo apenas para fazer a postura, sempre seguida de morte da fêmea. Posteriormente, ocorre o desenvolvimento dos ovos até a eclosão das larvas, que buscam novamente um hospedeiro, como já foi descrito. Os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* eb *Amblyomma cajennense* possuem ciclo biológico heteroxeno. Estas espécies vão ao solo não apenas para a postura, como também para a realização das mudas de larva para ninfa e de ninfa para adulto e, após as mudas, buscam novamente um hospedeiro.

Segundo Cordovés (1997), o tipo de ciclo mais evoluído e adaptado à vida parasitária sobre animais domésticos é, aparentemente, o monoxeno, já que estes carrapatos exploram com maior eficiência o encontro de um hospedeiro adequado. Os carrapatos heteroxenos exploram com maior eficiência o ambiente, variando sua seletividade sobre o hospedeiro nos diferentes estágios evolutivos, o que lhes permite utilizar uma gama mais ampla de hospedeiros.

CONTROLE BIOLÓGICO

Predadores invertebrados, vertebrados e parasitóides

Vários predadores naturais de carrapatos já foram descritos na literatura. Rocha et al. (1984) verificaram que os dípteros Phoridae, das espécies *Megaselia sacaralis* e *M. scalaris,* eram atraídos pelas fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*, principalmente quando se trabalhava com umidade elevada, em condições naturais e experimentais. Rocha (1984) também listou esse díptero como predador natural de

carrapatos e citou as formigas das espécies *Solenopsis saevissima* como o mais importante predador da espécie *Boophilus microplus*, pois foi verificado que elas cortavam a cutícula das fêmeas ingurgitadas e consumiam todo o conteúdo da hemocele; *Camponotus rengeri* foi citada como predadora natural de ninfas e fêmeas ingurgitadas apenas em dias muito úmidos; *Ectatoma quadridens* também foi citada como predadora natural. As aranhas das espécies *Phoneutria nigriventer* e *Lycosa erythrognatha,* quando mantidas em condições experimentais, alimentaram-se exclusivamente de ninfas e fêmeas ingurgitadas de várias espécies de carrapatos, durante vários meses. Goulart et al. (1986) verificam em seu trabalho que insetos da família Forficulidae, conhecidos popularmente como tesourinha, também são ávidos predadores de ovos de carrapatos. Holm & Wallace (1989) verificaram que na Austrália e na Indonésia alguns ácaros identificados como pertencentes à família Anystidae foram encontrados predando naturalmente estágios ingurgitados de carrapatos.

Dentre os predadores vertebrados, Ihering (1940) cita a ave *Crotophaga ani*, o anum, e até relata que uma delas foi encontrada com 74 carrapatos no papo; o anum branco (*Guira guira*) também é citado como predador. Segundo Menegheti & Arigony (1982), a perdiz é ávida predadora de carrapatos em condições naturais e experimentais no Rio Grande do Sul. Faleiros et al. (1983) citam que *Rattus rattus* e *Mus musculus* são ávidos predadores de fêmeas ingurgitadas de carrapatos, sendo que estas foram utilizadas como iscas em ratoeiras de mola localizadas em estábulos e celeiros, com enorme sucesso. Matthewson (1984) relata que entre os predadores vertebrados naturais dos carrapatos foram verificados pássaros e lagartos. Rocha (1984) cita que nas suas necrópsias realizadas em aves as espécies encontradas contendo carrapatos no tubo digestivo foram *Milvago chimachina,* conhecido como gavião cará-cará, *Gallus gallus*, galinha doméstica, *Numida meleagridis, a* galinha d'angola e o gavião pomba. Harlapur & Hiregoudar (1985) narram o encontro de um urso indiano da espécie *Melursus ursinus ursinus* em Karnataka, Índia, sentado sob uma árvore, coletando seus carrapatos e comendo-os. Os autores relatam que o animal ingeriu grande número de larvas, ninfas e adultos, inclusive os que caíram no solo e que em 15 a 20 minutos, após o início da ingestão, o número de carrapatos do animal decresceu consideravelmente. Branco & Pinheiro (1987) relatam que no Rio

Grande do Sul a ave mais importante predadora de carrapatos é o chimango, *Milvago chimango*, e recomendam ainda medidas de proteção a estas aves, devido ao seu importante papel no controle biológico de carrapatos.

Quanto aos parasitóides, Mwangi et al. (1991) realizaram um extenso trabalho de revisão sobre o controle biológico de carrapatos. Nele, as espécies *Ixodiphagus texanus*, *I. mysorensis*, *I. hirtus*, *I. biroi*, *Hunterellus hookeri* foram listadas como parasitóides recuperados de carrapatos naturalmente infectados; os autores sugerem que estudos taxonômicos mais profundos devam ser realizados, pois todos estes parasitóides podem pertencer ao mesmo gênero. Realmente, todos pertencem ao gênero *Ixodiphagus* e a espécie mais encontrada em vários países é *I. hookeri*. Mwangi et al. (1994) avaliaram em laboratório alguns aspectos do ciclo biológico de *I. hookeri*, utilizando o carrapato *Amblyomma variegatum* como hospedeiro e concluíram que esta espécie de parasitóide é bastante eficaz no controle do carrapato avaliado em temperaturas controladas (22 a 28°C). Essa mesma espécie de parasitóide também foi encontrada em Connecticut, EUA, em populações de *Ixodes scapularis*, com elevada densidade (Stafford et al., 1996). O único trabalho que avalia o potencial de utilização em campo do *I. hookeri* foi realizado por Mwangi et al. (1997); os autores liberaram no campo 150.000 parasitóides e comprovaram a redução da população de *A. variegatum* em até 95%; paralelamente, outra população de carrapatos presentes (*Rhipicephalus appendiculatus*) cresceu; ficou a dúvida se o parasitóide possui especificidade para uma espécie de carrapato ou se houve uma competição entre as duas espécies.

Matthewson (1984) faz um extenso trabalho de revisão sobre as opções para controle de carrapatos e cita que os predadores naturais, sejam eles invertebrados ou vertebrados, têm importante papel no controle biológico natural e que em programas integrados para controle destes ectoparasitos os predadores devem ser incluídos. As conclusões obtidas por Mwangi et al. (1991) são semelhantes: eles afirmam que todos os agentes de controle biológico, sejam eles predadores, parasitóides ou patógenos, se usados de forma isolada, não terão sucesso no controle de carrapatos. Existe um consenso entre os autores ao afirmar que programas isolados para controle de carrapatos não surtem os efeitos necessários e podem causar danos ambientais

ou o aparecimento de resistência, enquanto os programas integrados de controle tendem a ser mais eficazes e duradouros.

MICRORGANISMOS

Nematoides

Na literatura mundial existem poucos trabalhos relatando a ocorrência natural e também as infecções artificiais por nematoides em carrapatos de várias espécies, que não ocorrem no Brasil. Visando a conhecer melhor a relação entre carrapatos e nematoides, Samish & Glazer (1991) realizaram infestação artificial com aproximadamente 1000 nematóides da espécie *Steinernema carpocapsae* em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus annulatus* e observaram uma mortalidade de 100% após três dias do início do tratamento. Estes autores sugerem que os nematoides possam ser úteis no controle integrado de carrapatos, já que o estágio infectante do nematoide busca seu hospedeiro, possui capacidade de sobrevivência por longos períodos na natureza sem achar um hospedeiro e possui, ainda, grande facilidade de disseminação em locais com umidade elevada constante; entretanto, não sobrevive por longos períodos em climas tropicais quentes.

As espécies pertencentes aos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* vêm recebendo marcada atenção, pois, nestes casos, os nematoides introduzem na hemocele do hospedeiro parasitado bactérias do gênero *Xenorhabdus*, com as quais mantêm relação de mutualismo; essas bactérias desenvolvem-se na hemolinfa, causando septicemia e morte dos hospedeiros, no período compreendido entre 24 a 48 horas após sua introdução na hemocele (Glazer & Samish, 1993). A elevada susceptibilidade de fêmeas de *B. annulatus* a infecções pela espécie *S. carpocapsae* e a presença da bactéria simbiótica *Xenorhabdus sp*, nos cadáveres dos carrapatos, serviram como subsídio inicial para os estudos destes pesquisadores.

Mauleon et al. (1993), utilizando 17 espécies de nematoides dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* em infecção experimental em fêmeas ingurgitadas dos carrapatos *B. annulatus, B. microplus* e *Amblyomma variegatum*, observaram resistência das duas últimas espécies a todas as cepas de nematoides testadas,

comprovando que existem diferenças com relação à susceptibilidade da espécie de carrapato aos nematoides entomopatogênicos.

Glazer & Samish (1993) infectaram fêmeas ingurgitadas de *B. annulatus*, com aproximadamente 2500 formas infectantes juvenis de *S. carpocapsae* e verificaram que quanto maior o tempo de exposição ao nematoide, maior era a mortalidade dos carrapatos, porém a quantidade de nematoides encontrada nos carrapatos mortos não era proporcional ao tempo decorrido entre a morte e o dia da dissecação. Verificaram, também, que não havia relação entre a taxa de mortalidade e o número de nematoides por cadáver.

As espécies de nematoides *S. carpocapsae* e *S. glaseri* foram patogênicos para fêmeas ingurgitadas de *Ixodes scapularis* e mostraram potencial bioinseticida, mas somente em condições ideais de temperatura e umidade do ambiente, para o estágio de desenvolvimento acima citado (Zhioua et al., 1995). Segundo esses mesmos autores, os nematoides utilizados em controle biológico são capazes de parasitar artrópodes, desenvolvendo-se e reproduzindo-se em vida livre ou parasitária, no interior do hospedeiro. Esses nematoides podem ser encontrados nas traquéias, glândulas anexas ao tubo digestivo ou na hemocele, sendo que a principal forma de penetração em carrapatos é através da abertura genital. Ferraz (1998) afirma que algumas dessas espécies de nematoides entomopatogênicos estabelecem relacionamento estritamente nutricional, causando danos aparentemente restritos aos hospedeiros; outros porém, causam má formação de órgãos, castração parasitária ou mesmo esterilização sexual, apresentando interesse no controle biológico de certas pragas.

Vírus

A principal vantagem dos bioinseticidas virais é a sua grande especificidade, o que os torna extremamente atrativos do ponto de vista de segurança e preservação do meio ambiente (Fuxa & Tanada, 1987). O grupo de vírus mais estudado visando ao controle biológico de artrópodes é aquele que compreende os Baculovírus, sendo estes amplamente aplicados como bioinseticidas em nível de campo em várias regiões. É o único grupo de vírus que sofreu extensivos testes de segurança, provando ser inofensivo a microrganismos, outros invertebrados, vertebrados e plantas

(Groner, 1989).

A infecção do artrópode ocorre através da ingestão de alimento contaminado com o vírus. No ambiente alcalino do intestino médio do artrópode as partículas virais são liberadas, dando início à infecção das células epiteliais do intestino médio (Volkman & Keddie, 1990), que geralmente se espalha para outros tecidos a partir do sistema traqueal, causando a morte do hospedeiro em poucos dias. Após isso, seu tegumento se desintegra, liberando novas formas no meio ambiente (Payne, 1986).

O único relato existente na literatura sobre vírus patogênicos para carrapatos foi feito por Megaw (1978), que estudando a estrutura das glândulas salivares de *Boophilus microplus* através de técnicas de avaliação de ultra-estrutura, visando a encontrar vírus patogênicos para mamíferos que fossem transmitidos por estes, verificou a presença de partículas virais. O autor relata que estas partículas virais produzem danos no citoplasma de células das glândulas salivares infectadas e, em alguns casos, afetam a competência das glândulas salivares do carrapato *B. microplus,* podendo ocorrer, em casos extremos, a obstrução da glândula.

Bactérias

Poucas espécies de bactérias foram isoladas de carrapatos, sendo que todas as encontradas e identificadas estavam em fêmeas ingurgitadas, mortas ou doentes. Brown et al. (1970) observaram mortalidade elevada em todos os estágios de *Dermacentor andersoni* em colônias laboratoriais. O material foi isolado em meio de cultura e, após testes específicos, a bactéria foi identificada como *Proteus mirabilis.* Em ensaio laboratorial, através da inoculação de um mililitro de uma suspensão com esporos desta bactéria, utilizando 150 esporos por ninfa da mesma espécie, observou-se o percentual de 100% de mortalidade.

Hendry & Rechav (1981) coletaram no campo fêmeas ingurgitadas de *Boophilus decoloratus* naturalmente infectadas com bactérias e após a inoculação de cinco microlitros de suspensão na hemocele de fêmeas de *B. decoloratus, Amblyomma hebraeum, Hyalomma marginatum rufipes* e *Rhipicephalus evertsi evertsi* cerca de 90% dos carrapatos reproduziram a doença. As bactérias isoladas foram *Proteus*

sp., P. mirabilis, Klebisiella pneumoniae, Pseudomonas sp. (gram negativas) e *Staphilococus sp.* (gram positivas). Ahmed & Dosoky (1986) isolaram, em condições naturais, bactérias do carrapato *B. annulatus*, que não foram identificadas. Posteriormente, Ammou et al. (1987) também isolaram bactérias da hemolinfa, ovos e larvas de carrapatos das espécies *B. decoloratus* e *B. geigyi* em condições naturais e conseguiram transmitir a infecção para as mesmas espécies, porém aquelas isoladas não foram identificadas.

O primeiro relato de bactérias patogênicas para carrapatos no Brasil foi realizado por Brum (1989), utilizando a bactéria *Cedecea lapagei* (Enterobacteriaceae), que foi isolada de secreção vaginal de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus,* naturalmente infectadas. A bactéria isolada foi utilizada para fazer uma suspensão, contendo aproximadamente 20 x 10^8 bactérias/ml, na qual um grupo de fêmeas ingurgitadas foi imerso, enquanto que outro grupo foi inoculado com um microlitro da mesma suspensão na hemocele. Os autores observaram infecção e/ou mortalidade e os ovos das fêmeas ingurgitadas que conseguiram realizar postura apresentaram eclodibilidade de 60 a 70%. As fêmeas inoculadas apresentaram 100% de mortalidade, 48 horas após a inoculação. Esses autores verificaram também que esta bactéria causava infecção em fêmeas no campo, principalmente nos meses frios, apresentando uma prevalência de 40% (Brum et al., 1991a). Posteriormente, Brum et al. (1991b) revelaram, através da dissecação de fêmeas ingurgitadas e cortes histológicos da porção final do aparelho genital de fêmeas de *B. microplus*, que o epitélio vaginal daquelas estava destruído e que ocorria uma redução de 47,4% na postura das teleóginas, quando estas eram imersas em uma suspensão da bactéria *Cedecea lapagei*.

Mwangi et al. (1995) revelaram a presença de *Serratia marcescens, Proteus mirabilis e Escherichia coli* em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus appendiculattus* que foram mantidas no campo durante oito dias, morrendo mais tarde no laboratório. Em uma colônia de *Boophilus decoloratus*, o autor isolou a bactéria *Staphylococcus aureus*. Os autores afirmam que infecções bacterianas são encontradas seis vezes mais que infestações por fungos em carrapatos, em condições naturais.

O trabalho mais recente encontrado na literatura a este respeito foi realizado com uma bactéria entomopatogênica quando ingerida por alguns grupos de artrópodes, o *Bacillus thuringiensis*. Neste experimento, Hassanain et al. (1997) testaram a atividade potencial de três variedades de *B. thuringiensis* (*kurstaki, israelensis e thuringiensis*) em duas espécies diferentes de carrapatos, *Argas persicus* e *Hyalomma dromedari*. Estas duas são hematófagas, mas possuem uma grande diferença com relação à espessura da cutícula; o *A. persicus* não possui placas no dorso, sendo vulgarmente conhecido como carrapato mole, enquanto o *H. dromedari* possui estas placas e a cutícula mais espessa. Os autores observaram o tempo letal de 36 horas a cinco dias para *A. persicus* e de dois a dez dias para *H. dromedarii*. *Argas persicus* foi mais afetado que *H. dromedarii* por todas as variedades de *B. thuringiensis* testadas, e a justificativa para esse achado é que a cutícula desta espécie é mais fina. Portanto, os autores afirmam que a infecção ocorreu através da cutícula, mas não explicam qual o mecanismo de ação que tornou o *B. thuringiensis* patogênico por via cutânea.

Habib & Andrade (1998) detalham a sintomatologia e a fisiopatologia das doenças causadas por bactérias para artrópodes. Os sintomas mais observados inicialmente são perda de apetite e abandono do alimento; em seguida, ocorrem regurgitação e diarréia e, em alguns casos, disfunção e paralisia intestinal; o tegumento perde o brilho, adquirindo coloração fosca; posteriormente, o tegumento adquire coloração marrom-escura em função da invasão do patógeno na hemolinfa. Em todos os casos, nos estágios mais avançados da doença, o hospedeiro não responde a estímulos externos, tornando-se flácido e parando totalmente os movimentos. Após a morte, toma a coloração preta e rapidamente inicia-se o processo de deterioração dos tecidos, porém sem rompimento do tegumento. A atividade tóxica do gênero *Bacillus* se manifesta quando ocorre a ingestão dos cristais protéicos. Assim, quando estes chegam ao intestino médio do hospedeiro, são solubilizados, clivados por proteases intestinais e liberam toxinas que, por sua vez, interagem com o epitélio intestinal, causando o rompimento da membrana, o desequilíbrio iônico e outras alterações. Com a lise das células intestinais, ocorre o contato do esporo com a hemolinfa do hospedeiro, causando morte por septicemia, já que a hemolinfa é um meio propício à

proliferação dos bacilos.

Rickétsias

A literatura encontrada sobre rickétsias patogênicas pa carrapatos é muito pobre e, algumas vezes, o material encontrado não é nem identificado. Segundo Neves & Alves (1998), a sintomatologia de um artrópode infectado por rickétsias caracteriza-se inicialmente pela perda ou diminuição da atividade, locomoção e alimentação; o hospedeiro passa a apresentar uma aparência flácida, com o tegumento apresentando coloração azul, branca ou leitosa; posteriormente, próximo à morte, o hospedeiro adquire coloração leitosa, ocasionada pela turgidez da hemolinfa. A infecção ocorre por via oral, com a ingestão de alimento contaminado, sendo a forma infectante pequena e densa. No intestino do hospedeiro, a rickétsia penetra nos vacúolos celulares por fagocitose. Geralmente, o ataque de Rickétsias restringe-se às células gord rosas e da hemolinfa. Entretanto, algumas espécies podem atacar outros tecidos, como hipoderme, traquéias, músculos, nervos, túbulos de Malpighi e epitélio intestinal; portanto, a doença provocada é geralmente crônica e pouco virulenta, porém a invasão massiva de simbiontes pode causar mortalidade.

A *Richettsia prowazeki*, que é um patógeno de mamíferos, foi utilizada experimentalmente em carrapatos das espécies *Dermacentor marginatus* e *D. pictus* (Rehacek 1965), dos quais fêmeas infectadas morreram prematuramente e, conseqüentemente, a produção de ovos foi reduzida, tendo sido encontrado alto índice de rickétsias em todos os órgãos dos carrapatos.

Burgdorfer et al. (1973) isolaram e caracterizaram simbiontes de *Dermacentor andersoni* e estes foram identificados como uma nova espécie pertencente à tribo Wolbachiae da família Rickettsiaceae. Os tecidos ovarianos deste carrapato foram injetados em ovos embrionados e uma suspensão destes foi inoculada em carrapatos sadios, a fim de observar o mecanismo de ação desse microrganismo. Verificou-se desenvolvimento rápido e produção massiva em hemócitos, tecido hipodérmico, glândulas salivares, tecidos conectivos do epitélio intestinal, túbulos de Malpighi e ovário. Por conseguinte, a invasão massiva do simbionte provocou a morte dos carrapatos.

A *Wolbachia persicus* foi encontrada no interior do trato intestinal de *Ornithodoros moubata*. Os carrapatos morreram após algumas semanas, com a multiplicação da rickétsia na hemolinfa. Esses elementos ricketisiais foram excretados com o líquido coxal e também encontrados em ovos desses carrapatos (Weyer, 1973).

Fungos

Os trabalhos referentes ao controle biológico que relacionam os fungos entomopatogênicos com os carrapatos são os mais freqüentes na literatura. Mesmo assim, muito pouco foi realizado até o momento, para que possamos recomendar a utilização de fungos entomopatogênicos em programas de controle integrado de carrapatos.

O primeiro trabalho encontrado sobre o assunto foi o de Kolomiec (1950), citado por Lipa (1971), no qual o fungo *Aspergillus fumigatus* causava mortalidade em colônias laboratoriais de *Hyalomma scupense* e *Dermacentor marginatus*. O autor também verificou que as fêmeas ingurgitadas morriam antes ou logo após o fim da postura. Posteriormente, Samsinakova (1957) observou em suas coletas uma fêmea de *Ixodes ricinus* trazida do campo para o laboratório, infectada pelo fungo *Beauveria bassiana*. A fêmea, mesmo infectada, fez postura e após sua morte o autor verificou uma hifa deste fungo saindo da sua cavidade bucal.

Boycev & Rizvanov (1960) observaram que a *B. bassiana* inviabilizava os ovos de *I. ricinus*. Uma cultura do fungo foi colocada juntamente com fêmeas em postura e levadas à câmara climatizada a 25°C e 90% de umidade relativa. Depois de vinte dias, após uma postura média de 750 ovos, todas as fêmeas estavam mortas. O período de incubação no grupo testemunha foi de 27 dias, enquanto que no grupo tratado foi de 40 dias e o percentual de eclosão foi de 6,5% no grupo tratado. Posteriormente, Gorskova (1966) promoveu a infecção artificial por fungos em fêmeas ingurgitadas de *I. ricinus*, utilizando as espécies *B. bassiana, Botritis cinerea* e *Penicillium insectivorum*. Observou que os fungos estudados não alteraram a duração do período de postura, mas aumentaram o período de incubação dos ovos, promoveram a diminuição do número de ovos colocados por fêmea e do percentual de eclosão dos ovos, observando que a infecção por *B. bassiana* acentua a mortalidade dos carrapatos.

Cerepanova (1964) isolou 15 gêneros de fungos em ovos, larvas, ninfas e adultos dos seguintes carrapatos: *Argas persicus, A. reflexus, Ornithodorus papillides* e *Rhipicephalus bursa*. O autor isolou o fungo *Aspergillus fumigatus* de todas as espécies e o *Penicillium insectivorum* das seis primeiras espécies, caracterizando-os como mais importantes, e infectando todos os estádios evolutivos dos carrapatos estudados.

O carrapato *Boophilus microplus* foi avaliado pela primeira vez por Connole (1969), que testou 156 extratos de diferentes fungos mantidos em coleções e obtidos através de centrifugação. O material obtido foi inoculado na hemocele de carrapatos e os resultados mais promissores foram obtidos com o *Aspergillus niger*, que promoveu a inibição da postura, em média, em 50% em relação ao grupo-controle, apesar do autor ter trabalhado com fungos considerados entomopatogênicos, como *Beauveria bassiana*. Com relação a produtos metabólicos, Krylova (1977), citado por Mwangi et al. (1991), usou toxinas produzidas por *B. bassiana, M. anisopliae* e *Paecilomyces fumosoroseus* sobre o carrapato *A. persicus,* que foi tratado por 15 segundos em toxinas de extratos fúngicos; constatou-se apenas 10% de mortalidade, após 96 horas do tratamento.

Mais recentemente, Tian (1984) avaliou a efetividade de *B. bassiana, M. anisopliae* e *A. fumigatus* em ninfas ingurgitadas de *Hyalomma* sp. Os dois primeiros foram altamente eficazes e o último foi significante, quando utilizados com formulações em pó, porém quando o autor trabalhou com suspensões o resultado não foi expressivo.

Nesta última década, os trabalhos envolvendo o controle microbiano de carrapatos com fungos multiplicaram-se. Estrada-Penã et al. (1990) encontraram em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus,* infecção natural com o fungo *Aspergillus ochraceus,* que impediu a ovoposição, levando esse carrapato à mumificação e morte. O autor deduziu através de estudos histopatológicos e de microscopia eletrônica de transmissão que *A. ochraceus* colonizou o carrapato via ânus e, posteriormente, intestino e túbulos de Malpighi.

Bittencourt et al. (1992) verificaram a patogenicidade de um isolado do fungo *M. anisopliae* em fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, observando elevada mortalidade e obtendo um percentual de controle de 96,6% para o isolado identificado como Ma 959, utilizado em suspensões com 10^8 conídios/ml. A concentração letal

(CL) 50 do isolado 959 de *M. anisopliae*,para promover o controle de fêmeas ingurgitadas, foi de 1,1 X 10^6. A ação *in vitro* do fungo *M. anisopliae* para o carrapato *B. microplus* foi avaliada através da utilização de dois isolados distintos desse fungo, quando foi verificado que o mesmo causa alterações para todos os estádios de carrapatos que são encontrados nas pastagens, tais como ovos, larvas não-ingurgitadas e fêmeas ingurgitadas (Bittencourt et al., 1994a), promovendo as seguintes alterações da fase não-parasitária: elevação dos períodos de pré-postura, incubação, eclosão e diminuição do período de postura, índice de produção de ovos e do percentual de eclosão de larvas, comprometendo, assim, a formação de gerações sucessivas desse carrapato (Bittencourt et al., 1994b).

A dinâmica da infecção do *M. anisopliae* sobre o carrapato *B. microplus* também foi avaliada por Bittencourt et al. (1995a , b), que verificaram que este entomopatógeno, no segundo dia após a infecção artificial, era evidenciado e isolado na hemolinfa; no terceiro e quarto dias, após a infecção, era isolado e evidenciado, respectivamente, a partir de órgãos internos. Paralelamente, não foi verificada a presença de estruturas do fungo através de estudos histológicos das cavidades naturais. Com base neste experimento, os autores afirmam que a principal forma de penetração do *M. anisopliae* em carrapatos é através do tegumento, como já foi descrito para outros artrópodes.

A maioria dos fungos é altamente especializada na penetração via tegumento, o que é uma grande vantagem quando comparado com outros patógenos, que só penetram no hospedeiro por via oral, caindo na hemocele, via mesêntero. No caso específico de carrapatos, a penetração através do tegumento é de grande importância, já que a infecção oral é praticamente nula para artrópodes hematófagos. A penetração via tegumento está ligada à síntese e secreção de enzimas, como proteases e quitinases. Na maioria dos casos, a ação da penetração física do grampo de penetração auxilia nesse processo (Charnley & St. Leger, 1991). Após a penetração da cutícula pelos tubos germinativos, o fungo rapidamente invade os órgãos internos e, por fim, causa a morte do carrapato hospedeiro (Kaaya et al., 1991). Esses fungos também produzem micotoxinas que contribuem para a mortalidade do hospedeiro, provocando diminuição do ingurgitamento, da fecundidade e do percentual de eclosão

dos ovos. A mortalidade de carrapatos parece estar relacionada à concentração de conídios, ou seja, ocorre uma relação entre o percentual de mortalidade e o número de conídios que recobre a cutícula: quanto maior o número de conídios, maior a mortalidade (Kaaya et al., 1996). Parece haver uma correlação entre a densidade da suspensão e a germinação, sendo necessária uma certa densidade de conídios para que ocorra o efeito de penetração da cutícula dos artrópodes, demonstrando um mecanismo de ação em massa (Zhioua et al., 1997).

O mecanismo de penetração do isolado 959 do *M. anisopliae* em carrapatos da espécie *B. microplus* foi demonstrado por Bittencourt et al. (1999a), que evidenciaram a ocorrência da fixação dos conídios na cutícula das fêmeas ingurgitadas, da germinação do conídio, da formação do tubo germinativo a partir de conídios germinados e o início da dilatação da extremidade deste tubo, formando uma estrutura denominada de apressório. Estes resultados confirmam a hipótese de que esse fungo entomopatogênico penetra no artrópode pela cutícula. A confirmação da infecção do carrapato pelo entomopatógeno, através da cutícula, indica que a forma de utilização indicada para produtos formulados a partir desse fungo é por pulverização dos ínstares susceptíveis de *B. microplus,* com as suspensões contendo conídios viáveis de *M. anisopliae*.

Mwangi et al. (1995) trabalharam com esporos de *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae* em todas as fases de desenvolvimento do carrapato *R. appendiculatus,* em condições laboratoriais, através da imersão de adultos em jejum por um minuto em uma suspensão de 10^9 esporos/ml do fungo *B. bassiana* e observaram mortalidade de 73% após duas semanas. Uma concentração similar de *M. anisopliae* matou apenas 35%. O uso de suspensões de conídios de *Verticillium lecanii, M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre os estágios parasitários de *B. microplus* foi avaliado por Camacho & Martinez (1995). Os fungos mencionados foram aplicados sozinhos, associados, ou com uma mistura de melado sobre o corpo de bovinos, por meio de aspersão, uma vez por semana, durante dois meses. Os melhores resultados neste trabalho foram obtidos com isolado de *V. lecanii* e da sua associação com a mistura de melado.

Kalsbeek et al. (1995) avaliando a presença de fungos entomopatogênicos em *Ixodes ricinus* coletados da vegetação de pequenos roedores e de cervídeos

concluíram que uma alta proporção de carrapatos coletados no outono estava infectada, e que os fungos entomopatogênicos isolados teriam um impacto significante no controle da população de *I. ricinus*, já que o estágio de fêmea ingurgitada era o mais freqüentemente afetado. *Paecilomyces farinosus* e *V. lecanii* foram as espécies que predominaram entre os fungos isolados, estando presentes em todos os estágios de desenvolvimento do carrapato. Outras espécies de fungos foram encontradas somente em fêmeas ingurgitadas, como é o caso de *B. bassiana, B. brongniartii, P. fumosoroseus* e *V. aranearum.*

A ação *in vitro* de dois isolados da *B. bassiana* (isolados 986 e 747) para ovos do carrapato *B. microplus* também foi avaliada. Observou-se que o percentual de eclosão verificado nos grupos tratados com ambos os isolados do fungo foi muito menor que o observado nos grupos-controles. Nestes, obteve-se um percentual de eclosão de 93,3%, enquanto que naqueles este percentual variou entre 20% a 86,6%, de acordo com o isolado e a concentração da suspensão utilizada. Nos bioensaios com larvas, observou-se nos grupos-controle que o percentual de mortalidade ficou em torno de 13% a 16,5%, enquanto que nos tratados o percentual de mortalidade variou de 18,8% a 88%. Na análise de próbites, realizada com os dados referentes ao percentual de eclosão dos ovos tratados com o isolado 986, verificou-se a CL_{50} de $2,46 \times 10^7$, e com o isolado 747, a CL_{50} de $2,49 \times 10^7$. Com os dados referentes à mortalidade das larvas tratadas com o isolado 986 verificou-se uma CL_{50} de $6,83 \times 10^6$ e com o isolado 747, uma CL_{50} de $1,01 \times 10^7$ (Bittencourt et al., 1996).

Os mesmos isolados de *B. bassiana* também foram testados em fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* e foi verificado que o período de pré-postura das fêmeas expostas a ambos os isolados de *B. bassiana* não variou significativamente entre os diferentes tratamentos. As fêmeas ingurgitadas demonstraram uma diminuição do período de postura de acordo com o aumento na concentração de conídios, mas somente quando expostas ao isolado 986. Com relação ao período de incubação, observou-se um aumento significativo no número de dias, à medida que se aumentava a concentração de conídios do isolado 986, mas não houve diferença entre os tratamentos do isolado 747. Quanto aos índices de eficiência reprodutiva e nutricional, observou-se uma tendência a sua diminuição, de acordo com o aumento na

concentração de conídios de ambos os isolados. Quando o índice de eficiência reprodutiva for baixo, significa que a fêmea fez uma postura menor que o seu potencial de oviposição. Esses resultados têm elevada importância no controle desta espécie de carrapato, pois demonstram a possibilidade de redução da taxa de crescimento de sua população no campo. Os resultados também evidenciaram um baixo índice de eclosão nos grupos tratados, ocorrendo um decréscimo progressivo neste percentual, conforme os índices de concentração aumentavam. Conseqüentemente, o percentual de controle foi mais elevado nos grupos tratados com as concentrações 10^8 e 10^7, sendo estas as mínimas indicadas para avaliação desse entomopatógeno em condições de campo (Bittencourt et al., 1997a , b).

Em teste de estábulo realizado com duas suspensões do *M. anisopliae* e o carrapato *B. microplus*, Castro et al. (1997) verificaram que o grupo-controle apresentou maior sobrevivência de fêmeas que os grupos tratados. Na análise estatística, verificou-se diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo-controle. Com relação à concentração 10^8 conídios/ml, observou-se maior efeito de *M. anisopliae* sobre o carrapato *B. microplus*, obtendo-se mortalidade acima de 65% entre os dias +8 a +11 e +19 a +20, após o tratamento. Com relação ao tratamento com a suspensão 10^7 conídios/ml, observou-se um maior percentual de eficácia, também acima de 65% entre os dias +7 a +10 e nos dias +12 e +15, após o tratamento. A eficácia total média encontrada para as concentrações 10^8 e 10^7 conídios/ml foi, respectivamente, de 54,8% e 50,4%. Os resultados obtidos mostram que nos experimentos realizados em laboratório a eficácia observada é mais elevada que nos experimentos em campo. A eficácia total média na concentração 10^8 para a fase adulta, ninfal e larval foi de 41%, 69,4% e 47,7%, respectivamente, e na concentração 10^7 para as mesmas fases descritas acima foi de 39,4%, 57,4% e 46,1%. Os resultados demonstram que existe uma atividade maior desse fungo entomopatogênico nos estádios evolutivos logo após as mudas, visto que a principal forma de penetração desse patógeno deve ser pela cutícula. Portanto, os diferentes estádios evolutivos, quando infectados no período que precede a ecdise, são menos afetados devido ao crescimento de uma nova cutícula e saída da exúvia do ínstar anterior durante o processo de muda. Correia et al. (1998) também desenvolveram

testes de estábulo com o isolado E9 do fungo *M. anisopliae,* nas concentrações 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 conídios/ml, contra o carrapato *B. microplus.* Neste teste, no qual o fungo foi aspergido em bovinos estabulados de forma similar à realizada por Castro et al. (1997), não houve diferença significativa entre as concentrações, porém a concentração 10^8 causou maior mortalidade (79,04%), menor oviposição (54,5%) e maior período de pré-postura (14,3 dias) em relação ao grupo-controle (0%, 88,57% e 3,75 dias). Cabe aqui ressaltar que os autores não fizeram a coleta de fêmeas completamente ingurgitadas e, sim, de fêmeas parcialmente ingurgitadas, portanto apenas os dados de eficiência reprodutiva foram avaliados.

Castro et al. (1998) desenvolveram um experimento visando a conhecer a patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre larvas do carrapato *B. microplus* em pastagens. Foram avaliadas as concentrações de 10^{10}, 10^9 e 10^8 conídios/ml de suspensão para o primeiro ensaio e 10^9, 10^7 e 10^5 conídios/ml para o segundo. O fungo *M. anisopliae* foi aspergido em canteiros de *Brachiaria decumbens,* previamente infestados com 20.000 larvas de *B. microplus*. A recuperação das larvas foi efetuada com o auxílio de uma flanela colocada sobre os canteiros e elas foram contadas com o auxílio de uma seringa acoplada a uma bomba de vácuo. Verificou-se que não houve diferença significativa entre as concentrações utilizadas e o grupo-controle, embora o segundo ensaio tenha apresentado uma recuperação decrescente de acordo com as concentrações, na qual se observou que o grupo-controle apresentou maior número de larvas, seguido do grupo 10^5, 10^7 e 10^9 conídios/ml, o que não foi observado no primeiro ensaio.

Bittencourt et al. (1999b) avaliaram a ação do isolado 959 de *M. anisopliae* sobre o *B. microplus*, pulverizando a suspensão conidial sobre animais naturalmente infestados. Para tal, foram selecionados três grupos compostos de dez animais cada um, sendo um deles tratado com concentração 10^8 conídios/ml, outro com carrapaticida comercial e o outro, o grupo-controle. Após o tratamento, contaram-se todos os carrapatos fêmeas adultos de todos os grupos, registrando-se o número contado por animal e por grupo nos dias +1, +7, +14, +21 e +28, sendo os dados avaliados através do cálculo de percentual de controle. Também foram coletadas 30 fêmeas ingurgitadas por grupo, nos dias +1, +7 e +14, sendo estas levadas ao laboratório

para avaliação dos seguintes parâmetros: peso de fêmeas, período de pré-postura, período de postura, índice de eficiência reprodutiva e índice de eficiência nutricional. Os resultados evidenciaram não haver diferenças significativas entre os tratamentos em relação ao percentual de controle a campo; no entanto, em nível laboratorial, constatamos diferença significativa entre os tratamentos no índice de eficiência reprodutiva, no índice de eficiência nutricional (dia + 1) para os períodos de eclosão, incubação, peso das fêmeas e índice de eficiência reprodutiva (dia + 7) e peso das fêmeas (dia + 14). A possibilidade do uso deste fungo para o controle do *B. microplus* a campo ainda requer maiores estudos, porém a sua atividade na alteração de alguns parâmetros da fase não-parasitária está confirmada.

A ação dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* em adultos de *Rhipicephalus appendiculatus*, que se alimentavam em coelhos, foi observada por Kaaya et al. (1996) quando foi verificado que causavam mortalidade de 30% dos carrapatos. Os autores colocaram sacos fixados na base da orelha dos coelhos e introduziram no seu interior 50 carrapatos adultos. Dois dias após a infestação, quando os carrapatos já estavam fixados e alimentando-se, foram borrifados 5ml de uma suspensão contendo 10^8 conídios/ml; os carrapatos que se desprendiam foram coletados e levados ao laboratório para observação da mortalidade, peso e viabilidade da massa de ovos. Esses índices, no entanto, não apresentaram uma redução significativa em relação ao grupo-controle. Os autores ainda testaram esses fungos em bovinos infestados com *R. appendiculatus* seguindo a mesma metodologia descrita acima, porém na concentração de 10^9 conídios/ml, ele causou 77 a 83% de mortalidade das fêmeas, 85 a 99% de redução da produção de ovos e 94 a 100% na viabilidade dos ovos, concluindo que esse entomopatógeno possui elevada atividade carrapaticida e persistência de uma a três semanas após a aplicação, dentro do pavilhão auditivo de bovinos naturalmente infestados. As duas espécies de fungos reduziram o ingurgitamento, a fecundidade e a postura em *Amblyomma variegatum* alimentados em coelhos.

Zhioua et al. (1997) avaliaram a patogenicidade do fungo *M. anisopliae* para *Ixodes scapularis*. Os autores utilizaram suspensões com 10^8 conídios/ml para larvas ingurgitadas e 10^7 conídios/ml para fêmeas ingurgitadas, gerando 100% de mortalidade duas semanas após a infecção experimental, sendo observado que todas

as larvas e fêmeas encontravam-se recobertas por micélio e conídios. O valor da CL_{50} calculado para larvas ingurgitadas foi de 10^7 conídios/ml.

Barbosa et al. (1997) relataram que larvas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus,* tratadas com suspensões do fungo *B. bassiana*, diminuíam o percentual de ecdise conforme se aumentava a concentração de conídios da suspensão. Ainda com relação à mesma espécie de carrapato, Monteiro et al. (1998a, b) avaliaram a eficácia dos fungos *B. bassiana* (isolados 747 e 986) e *M. anisopliae* (isolados 959, E9 e 319) sobre ovos e larvas imersos em suspensões com diferentes concentrações e mantidos em condições de temperatura e umidade distintas. Os períodos de incubação e eclosão de todos os ovos tratados com as suspensões não obtiveram diferença significativa entre os isolados e/ou controles. A porcentagem de eclosão de larvas oriundas de ovos tratados foi inversamente proporcional à concentração utilizada. Quanto maior a concentração, menor a porcentagem de eclosão, sendo que ovos mantidos em temperatura ambiente tiveram índices de eclosão menores do que aqueles mantidos em temperatura controlada (± 27°C) e as CL_{50} e CL_{90}, para inibição dessa eclosão, foram menores para a maioria dos isolados mantidos em condição ambiente. O resultado da porcentagem de mortalidade das larvas tratadas refletiu o inverso do resultado com ovos; a maioria das larvas tratadas mantidas em temperatura ambiente foram mais resistentes aos isolados do que as mantidas em temperatura controlada e as CL_{50} e CL_{90} foram distintas de acordo com a temperatura. Demonstrou-se, assim, a necessidade de uma concentração maior de conídios na suspensão mantida em temperatura ambiente, para se obter o mesmo resultado daquelas mantidas em temperatura controlada.

Experimentos conduzidos em laboratório com os fungos *Metarhizium anisopliae* (isolados 959, E9 e 319) e *Beauveria bassiana* (isolados 986 e 747) e os carrapatos *Anocentor nitens* (Carneiro et al., 1997; Mascarenhas et al., 1998; Menezes et al., 1998; Monteiro et al., 1997; Monteiro et al., 1998c;) e *Amblyomma cajennense* (Reis et al., 1998; Souza et al., 1998) foram realizados recentemente e mostraram que, para todos os estágios testados ocorreu uma ação de patogenicidade dos agentes microbianos, causando mortalidade ou variações em parâmetros da fase não-parasitária, o que normalmente acarreta diminuição da geração seguinte.

Considerações gerais

Os agentes de controle biológico que afetam os ixodídeos e sua ação patogênica ainda são muito pouco estudados. Estudos mais profundos das doenças que afetam os carrapatos e sobre o funcionamento do seu sistema imune são necessários para a formação de uma base para a aplicação eficaz do controle biológico. Como já vimos, vários autores demonstraram que alguns patógenos desempenham papel importante no controle natural, principalmente em países de clima quente e úmido, que são propícios ao desenvolvimento de fungos e outros patógenos.

Os estudos *in vitro* dos efeitos causados pelos principais patógenos isolados em carrapatos já foram realizados. Nesses trabalhos, verificou-se que os fungos são os agentes de controle biológico mais promissores, devido ao seu mecanismo de penetração via cutícula. A justificativa para esta afirmação é a de que os carrapatos são artrópodes hematófagos, o que dificulta a utilização de patógenos que atuam por via oral (bactérias e vírus). Outra vantagem a ser atribuída aos fungos seria a sua capacidade de multiplicação e dispersão no meio ambiente através de carrapatos infectados e presentes no solo, assumindo um caráter enzoótico, além da sua capacidade de causar epizootias em determinadas circunstâncias. Alves (1998) também afirma que as principais vantagens dos fungos entomopatogênicos, quando comparados com outros entomopatógenos, estão relacionadas ao seu largo espectro, podendo causar epizootias naturais. Nas populações de artrópodes, os fungos podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento, como ovos, larvas, ninfas e adultos, sendo esta característica desejável e peculiar desse grupo. A grande variabilidade genética dos fungos entomopatogênicos pode ser considerada uma das principais vantagens no controle microbiano de artrópodes. Com técnicas apropriadas de bioensaios, é possível selecionar isolados de fungos altamente virulentos, específicos ou não, com características adequadas para serem utilizados como inseticidas microbianos. Ainda segundo este autor, os conídios dos fungos também possuem alta capacidade de disseminação horizontal, podendo ser levados pelos diferentes agentes de disseminação para locais muito distantes, embora a relação patógeno – hospedeiro seja dependente de condições ambientais, como temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta e, ainda, de condições nutricionais e susceptibilidade do hospedeiro.

Barci (1997) realizou uma revisão de literatura que aborda aspectos pertinentes ao controle biológico do carrapato dos bovinos, *Boophilus microplus*, na qual enfatiza não só o controle e suas implicações, como também as possibilidades da utilização do controle biológico por meio de nematóides, bactérias e fungos entomopatogênicos. A autora afirmou que há necessidade de implementação de testes de controle biológico em nível de campo, pois atualmente seus resultados diferem significativamente daqueles obtidos em testes de laboratório.

Os resultados obtidos no controle de carrapatos a campo, até o momento, são apenas promissores, visto que o Ministério da Agricultura indica eficácia acima de 90% para credenciar produtos a serem comercializados no Brasil, enquanto que os resultados obtidos são absolutamente inferiores a este número. É necessário que se realize uma adaptação da metodologia, preconizada pelo Ministério da Agricultura, específica para produtos biológicos; seria um grande passo para o desenvolvimento do controle biológico, pois por mais que existam estudos, não haverá uma formulação capaz de causar mortalidade de carrapatos num curto período de tempo. Não se pode comparar um produto químico, que causa a morte de carrapatos em alguns minutos, com produtos biológicos que produzem este mesmo efeito num prazo maior (até dez dias).

De qualquer forma, mais estudos são necessários para a avaliação do efeito carrapaticida do isolado 959 de *M. anisopliae* a campo, mas podemos afirmar, com base nos resultados já obtidos, que esse é o isolado com melhor potencial para ser utilizado em programas de manejo integrado de carrapatos em bovinos.

Em um futuro próximo, as pesquisas devem ser direcionadas para a busca de novos patógenos em condições naturais, isolados e adaptados em cada região, na associação de produtos biológicos com produtos químicos visando a uma ação sinérgica, na busca de novas formulações que propiciem maior estabilidade dos patógenos (principalmente dos fungos) em condições de campo e nos estudos mais profundos sobre a segurança de produtos biológicos para uso em animais e também para o homem. Tudo isso, visando ao uso desses produtos em programas integrados de controle de carrapatos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, L. S.; DOSOKY, R. M. Some bacterial isolates from *Boophilus annulatus* ticks under natural conditions in Assiut Governorate. **Assiut Veterinary Medical Journal**, v.15, n.30, p.199-203, 1986.

ALVES, S. B., ed. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

AMMOU, A. O. J.; DIPEOLU, O. O.; AKINBOADE, A. O.; ADEYEMI, A. Bacterial isolation from and transmission by *Boophilus decoloratus* and *Boophilus geigyi*. **Folia Parasitologica**, v.34, n.1, p.69-74, 1987.

BARBOSA, J. V.; DAEMON, E.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; FACCINI, J. L. H. Efeitos de dois isolados do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre a muda larval e a sobrevivência de ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n.1, p.53-56, 1997.

BARCI, L. A. G. Controle biológico do carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.64, n.1, p.95-101, 1997.

BARROS, T. A. M.; EVANS, D. E. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infestantes do carrapato dos bovinos, *Boophilus microplus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 9, n.1/2, p.17-21, 1989.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; LIMA, A. F.; MASSARD, C. L. Uso do *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.15, n. 2, p.197-202, 1992.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASCARENHAS, A. G.; FACCINI, J. L. H. Mecanismo de penetracão do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus*, em condições experimentais. **Revista Ciência Rural**, v. 29, n.2, 1999a. (No prelo).

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v.16, n.1 -2, p.32-38, 1994a.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Ação do *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não-parasitária do ciclo biológico do *Boophilus microplus*. **Revista da Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v.16, n.1-2, p. 39-45, 1994b.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v.17, n.1, p.83-88, 1995a.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F.; VIEGAS, E. C. Isolamento e produção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, a partir de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v.17, n.2, p.55-60, 1995b.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; PERALVA, S. L. F. S.; SOUZA, E. J.; MASCARENHAS, A. G.; ALVES, S. B. Ação *in vitro* de dois isolados do fungo *Beauveria bassiana* em alguns parâmetros da fase não-parasitária de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*. **Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v.19, n.2, 1997b. (No prelo).

BITTENCOURT, V. R. E. P.; PERALVA, S. L. F. S.; VIEGAS, E. C.; ALVES, S. B. Avaliação dos efeitos do contato de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. com ovos e larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 5, n. 2, p.81-84, 1996.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; SOUZA, E. J.; PERALVA, S. L. F. S.; MASCARENHAS, A. G.; ALVES, S. B. Avaliação da eficácia *in vitro* do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari:Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.**, v. 6, n.1, p.49-52, 1997a.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; SOUZA, E. J.; PERALVA, S. L. F. S.; REIS, R. C. S. Avaliação da eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 em teste de campo com bovinos infestados com o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 21, n.3, 1999b. (No prelo).

BOYCEV, D.; RIZVANOV, K. Relation of *Botrytis cinerea* to ixodid ticks. **Zoologie Zeitschrift Ukranien**, v.39, p.460, 1960.

BRANCO, F. P. J. A.; PINHEIRO, A. C. Controle biológico do carrapato (*Boophilus microplus*) através do chimango (*Milvago chimango*) In: SEMINÁRIO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 5., 1987, Belo Horizonte, MG. **Anais**. Belo Horizonte: CBPV, 1987. p.20.

BROWN, R. S.; ANDERSON, W. R. An endemic disease among laboratory populations of *Dermacentor andersoni* (= *venustus*) (Acarina. Ixodidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.16, p.142-143, 1970.

BRUM, J. G. W. Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) por *Cedecea lapagei* (GRIMONT,1981): etiopatogenia e sazonalidade. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1989. 44 p. Tese Doutorado.

BRUM, J. G. W.; FACCINI, J. L.; AMARAL, M. M. Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). II Histopatologia e testes "in vitro". **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43, p.31-37, 1991b.

BRUM, J. G. W.; TEIXEIRA, M. O.; SILVA, E. G. Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). I - Etiologia e Sazonalidade. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43, p.25-30, 1991a.

BURGDORFER; W.; BRINTON, L. P.; HUNGHES, L. E. Isolation and characterization of symbiotes from the Rock Mountain Wood Tick *Dermacentor andersoni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 22, p.424-434, 1973.

CALBERG, G. *Bacillus thuringiensis* and microbial control of flies. **Mircen Journal**, v. 2, p.267-274, 1986.

CAMACHO, E. R.; MARTINEZ, J. R. Effectiveness of biological preparations based on entomopathogenous fungi in the control of *Boophilus microplus*. In: LA FUENTE, J., ed. **Recombinant vaccines for the control of cattle tick**. Havana: Elfos Scientiae, 1995. p.36-43.

CARNEIRO, M. E.; MONTEIRO, S.G.; MENEZES, G. C. .R.; DAEMON, E.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Ação do fungo *Beauveria bassiana* sobre ovos do carrapato *Anocentor nitens* em laboratório. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 10., 1997, Itapema, SC. **Anais**. São Paulo: CBPV, 1997. p.160.

CASTRO, A. B. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DAEMON, E.; VIEGAS, E. C. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre larvas não alimentadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em pastagens. **Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v. 20, n. 1-2, 1998. (No prelo).

CASTRO, A. B. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DAEMON, E.; VIEGAS, E. C. Eficácia *in vivo* do fungo *Metarhizium anisopliae* (isolado 959) sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v. 19, n. 1-2, 1997. (No prelo).

CEREPANOVA, N. P. Fungi which are met on ticks. **Bothanic Zeitschrift Kiev**, v. 49, p. 696-699, 1964.

CHARNLEY, A. K.; St. LEGER, R. J. The role of cuticle – degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: COLE, G. T.; HOCH, H. C., ed. **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York: Plenum Press, 1991. p.267-286.

CONNOLE, M. D. Effect of fungal extracts on the cattle tick *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 45, p.207, 1969.

CORDOVÉS, C. O. **Carrapato**: controle ou erradicação. 2. ed. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 1997. 176p.

CORREIA, A. C. B.; FIORIN, A. C.; MONTEIRO, A. C.; VERÍSSIMO, C. J. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Stabled Cattle. **Journal of linvertebrate Pathology**, v.71, p.189-191, 1998.

DENNING, F. Unsuccessul attemps to transmit *Amblyomma cajennense*. Hannover: Escola de Medicina Veterinária, 1988. 112p. Tese Doutorado.

ESTRADA-PEÑA, A.; GONZALEZ, J.; CASOLAS, A. The activity of *Aspergillus ohraceus* (Fungi) on replete females *of Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in natural and experimental conditions. **Folia Parasitologica**, v.37, p.331-336, 1990.

FALEIROS, R.; ROCHA, U. F.; ROCHA WOELZ, C. Ecologia dos carrapatos. II: Predatismo de ratos e camundongos sobre o carrapato comum dos bovinos. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA, 8., 1983, São Paulo, SP. **Anais**. São Paulo: SBP, 1983. p.134.

FERRAZ, L. C. C. B. Nematóides entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. , ed. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.541-570.

FUXA, J. R.; TANADA, Y. Epidemiological concepts applied to insect epizootiology. In: FUXA, J.R.; TANADA, Y. ed. **Epizootiology of insect diseases**. New York: Wiley-Interscience, 1987. p. 3-21.

GLAZER, I.; SAMISH, M. Suitability of *Boophilus annulatus* replete female ticks as hosts of the nematode *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 61, p.220-222, 1993.

GORSKOVA, G. J. Reduction of fecundity of ixodid ticks females induced by fungal infection. **Vetsnik Leningraskogo Universitik**, v. 21, p.13-16, 1966.

GOULART, S.; CHRISTOFORO, M. T.; AMEIXEIRO, A. R. Ecologia de carrapatos. XVII. Predatismo de insetos forficulidae sobre ovos de *Boophilus .microplus* (Canestrini). **Ars Veterinária**, v. 2, p.233-236, 1986.

GRONER, A. Safety to nontarget invertebrates of baculoviruses. In: LACEY, L.; DAVISON, E. W., ed. **Safety of microbial insecticides**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p.135-147.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. ed. **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.383-432.

HARLAPUR, S.; HIREGOUDAR, L. S. The indian bear *Melursus ursinus ursinus* for the control of ticks (Acari: Ixodidae). **Journal of the Bombay Nature History Society**, v.82, p. 636-637, 1985.

HASSANAIN, M. A.; EL GARHY, M. F.; ABDEL – GHAFFAR, F. A.; EL – SHARABY KADRIA, A.; ABDEL MEGEED, N. Biological control studies of soft and hard ticks in Egypt. I. The effect of *Bacillus thuringiensis* varieties on soft and hard ticks (Ixodidae). **Parasitology Research**, v.83, n.3, p.209-213, 1997.

HENDRY, D. A.; RECHAV, Y. Acaricidal bacteria infecting laboratory colonies of the tick *Boophilus decoloratus* (Acarina: Ixodidade). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.38, p.149-151, 1981.

HOLM, E.; WALLACE, M. M. H. Distribuition of some anystid mites (Acari: Anystidae) in Australia and Indonesia and their role as possible predators of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.6, p.77-83, 1989.

IHERING, F. **Dicionário dos animais do Brasil**. São Paulo: Publicações Agrícolas da Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de São Paulo, 1940. 898p.

KAAYA, G. P.; KOKWARO, E. D.; MURITHI, J. K. Mortalities in adult *Glossina morsitans* experimentally infected with the entomogenous fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Discovery Innovation**, v.3, p.55-60, 1991.

KAAYA, G. P.; MWANGI, E. N.; OUNA, E. A. Prospects for Biological Control of Livestock Ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, Using the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopiae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, p.15-20, 1996.

KALSBEEK, V.; FRANDSEN, F.; STEENBERG, T. Entomopathogenic fungi associated with Ixodes ricinus ticks. **Experimental & Appied Acarology**, v.19, p.45-51, 1995.

LIPA, J. Microbiological control of mites and ticks. In: BURGES, H. D.; HUSSEY, N. W., eds. **Microbial control of insects and mites**. 2. ed. London: Academic Press, 1971. p.357-374.

MASCARENHAS, A. G.; MENEZES, G. C. R.; MONTEIRO, S. G.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Ação *in vitro* do *Metarhizium anisopiae* e *Beauveria bassiana* sobre ovos do carrapato *Anocentor nitens*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., 1998, Rio de Janeiro, RJ. **Anais**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998. p.076.

MASSARD, C. A. *Ehrlichia bovis* (Donatien & Lestoquard, 1936) diagnóstico, cultivo in vitro e aspectos epidemiológicos em bovinos no Brasil. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 1984. 113p. Tese Doutorado.

MATTHEWSON, M. D. The future of tick control: a review of the chemical and non chemical options. **Preventive Veterinary Medicine**, v.2, p.559-568, 1984.

MAULEON, H.; BARRE, N.; PANOMA, S. Pathogenicity of 17 isolates of entomophagous nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for the ticks *Amblyomma variegatum* (FABRICIUS), *Boophilus annulatus* (SAY). **Experimental and Applied Acarology**,. v.17, n.11, p. 831-838, 1993.

MEGAW, M. W. J. Virus-like particles pathogenic to salivary glands of the tick Boophilus microplus. **Nature**, v.271, p.483-484, 1978.

MENEGHETI, J. O.; ARIGONY, T. H. A. Insetos, aranhas e carrapatos na alimentação da perdiz. **Natureza em Revista**, v.9, p.40-45, 1982.

MENEZES, G. C. R.; MASCARENHAS, A. G.; MONTEIRO, S. G.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Patogenicidade do *Metarhizium anisopliae* em larvas do carrapato *Anocentor nitens*. (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., 1998, Rio de Janeiro, RJ. **Anais**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998. p. 078.

MONTEIRO, S. G.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DAEMON, E. Patogeniciade do fungo *Beauveria bassiana* em larvas do carrapato *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., 1998c, Rio de Janeiro, RJ. **Anais**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998c. p. 002.

MONTEIRO, S. G.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DAEMON, E.; FACCINI, J. L. H. Ação dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em ovos do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) **Revista Ciência Rural**, v.28, n.3, p.461-466, 1998a.

MONTEIRO, S. G.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DAEMON, E.; FACCINI, J. L. H. Patogenicidade dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em larvas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.7, n.2, 1998b. (No prelo).

MONTEIRO, S. G.; CARNEIRO, M. E.; MENEZES, G. C. R., DAEMON, E.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Ação do fungo *Beauveria bassiana* sobre fêmeas ingurgitadas do carrapato *Anocentor nitens* em laboratório. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 10., 1997, Itapema, SC. **Anais**. São Paulo: CBPV, 1997. p.162.

MONTEIRO, J. L.; FONSECA, F.; PRADO, A. Pesquisas epidemiológicas sobre o tifo exantemático de São Paulo. **Memórias do Instituto Butantã**, v.6, p.139-173, 1931.

MWANGI, E. N.; DIPEOLU, O. O.; NEWSON, R. M.; KAAYA, G. P.; HASSAN, S. M. Predators, parasitoids and pathogens of ticks: a review. **Biocontrol Science and Technology**, v.1, p.147-156, 1991.

MWANGI, E. N.; HASSAN, S. M.; KAAYA, G. P.; ESSUMAN, S. The impact of *Ixodiphagus hookeri*, a tick parasitoid, on *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in a field trial in Kenya. **Experimental and Applied Acarology**, v.27, n.2, p.117-126, 1997.

MWANGI, E. N.; KAAYA, G. P.; ESSUMAN, S. Experimental infections of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with entomopatthogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, and natural infections of some ticks with bacteria and fungi. **Journal of. African Zoology**, v.1 09, n.2, p.151-160, 1995.

MWANGI, E. N.; KAAYA, G. P.; ESSUMAN, S.; KIMONDO, M. G. Parasitism of *Amblyomma variegatum* by an Hymenopteran Parasitoid in the laboratory and some aspects of its basic biology. **Biological Control**, v.4, p.101 - 104, 1994.

NEVES, P. J.; ALVES, S. B. Rickétsias e mollicutes associados a insetos. In: ALVES, S. B., ed. **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.605-618.

PAYNE, C. C. Insect pathogenic viruses as pest control agents. **Fortschritteder Zoologie**, v.32, p.183-200, 1986.

REHACEK, J. Development of animal viruses and rickettsiae in ticks and mites. **Annual Review of Entomology**, v. 10, p.1-24, 1965.

REIS, R. C. S.; SOUZA, E. J.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Avaliação da eficácia *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre larvas não alimentadas do carrapato *Amblyomma cajennense*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., 1998, Rio de Janeiro, RJ. **Anais**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998. p.005.

ROCHA, U. F. Biologia e controle biológico do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini). **Boletim Técnico da Faculdade. Ciências Agrícolas e Veterinárias de Jaboticabal**, v. 3, p.1-32, 1984.

ROCHA, U. F.; BELO, M.; MORAES, J.R.E.; SOGORB, A.; BARUCH, A. Ecologia de carrapatos VI - Influência da umidade ambiente sobre a invasão de fêmeas de *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari, Ixodidae) por larvas de *Megaselia scalaris* Loew (Diptera, Phoridae) e sobre a prolificidade desses artrópodes. **Naturália**, São Paulo, n.9, p.93-100, 1984.

SAMISH, M.; GLAZER, J. Killing ticks with parasitic nematodes of insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.58, p.281-282, 1991.

SAMSINAKOVA, A. *Beauveria globulifera* (Speg) Pic. Iako Parasit Klistete *Ixodes ricinus L.* **Zoologie Lisy**, v. 6, p. 329-330, 1957.

SOUZA, E. J.; REIS, R. C. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Ação *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre ovos do carrapato *Amblyomma cajennense*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., 1998, Rio de Janeiro, RJ. **Anais**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998. p.079.

STAFFORD, K. C.; DENICOLA, A. J.; MAGNARELLI, L.A. Presence of *Ixodiphagus hookeri* (Hymenoptera: Encyrtidae) in two Connecticut populations of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n.1, p.183-188, 1996.

TIAN, G. F. Infecting and killing *Hyalomma detritum* with fungi. **Journal of Veterinary Science and Tecnology**,.v. 7, p.11-13, 1984.

VOLKMAN, L. E.; KEDDIE, B. A. Nuclear polyedrosis virus pathogenesis. **Seminars in Virology**, v.133, p.249-256, 1990.

WEYER, F. Versuche zur Ubertragung von *Wolbachia persica* auf keiderlause. **Zeitschrift für Angewandte Zoologie**, v. 60, p.77-93, 1973.

ZHIOUA, E.; BROWNING, M.; JOHNSON, P. W.; GINSBERG, H. S.; LEBRUN, R. A. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Parasitology**, v. 83, n.5, p.815-818, 1997.

ZHIOUA, E.; LEBRUN, R. A.; GINSBERG, H. S.; AESCHLIMANN, A. Pathogenicity of *Steinernema carpocapsae* and *Steinemema glasen* (Nematoda: Steinernematidae) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.32, p.900-905, 1995

5

CONTROLE MICROBIANO DE GAFANHOTOS

Bonifácio P. Magalhães
Marcos R. de Faria
João Batista T. da Silva

INTRODUÇÃO

Historicamente, os gafanhotos (Orthoptera: Acrididae) são mencionados como pragas relevantes no agroecossistema de muitos países, principalmente em regiões áridas, fazendo com que as autoridades responsáveis pela proteção de plantas fiquem em estado de alerta permanente. As espécies-praga mais sérias são *Schistocerca gregaria*, na África e Índia (Showler, 1995); *Locusta migratoria*, na África (Prior & Streett, 1997; Showler, 1995; Zimmermann et al., 1994); *Chortoicetes terminifera* e *Phaulacridium vittatum*, na Austrália (Milner, 1997); *Melanoplus sanguinipes*, na América do Norte (Inglis et al., 1997); e *Schistocerca pallens* e *Rhammatocerus schistocercoides*, na América do Sul (Miranda et al., 1996; Cozensa et al., 1994). A maioria das espécies é polífaga e normalmente elas são citadas como capazes de consumir diariamente o equivalente ao seu próprio peso. Na África, o controle dessa praga demanda doações substanciais da comunidade internacional, já que muitos países não possuem recursos suficientes para cobrir os custos (Prior & Streett, 1997). Mesmo nas Américas, o controle é, via de regra, subsidiado pelo governo. No Brasil, por exemplo, na década de 80, o Estado gastou entre 1 e 2 milhões de dólares na aplicação de inseticidas químicos em cada situação de emergência relacionada a surtos ocorridos nos estados de Mato Grosso e Rondônia. Nesses valores,

não estão computados os custos relacionados às perdas econômicas de agricultores, àquelas decorrentes do impacto ambiental dos inseticidas em recursos hídricos, reservas indígenas, biodiversidade, entre outros.

O combate a essa praga tem sido feito através de aplicações maciças de inseticidas químicos, sendo que, nos últimos anos, o produto mais utilizado no mundo foi o fenitrotion, seguido de malation. Fenitrotion é um composto organofosforado de moderada toxicidade para mamíferos; é pouco persistente no meio ambiente (meia-vida < 3 dias), mas apresenta alta toxicidade a artrópodes aquáticos e terrestres não-alvos (Prior & Streett, 1997). Como resultado do efeito combinado entre alto custo de aplicação, danos ao ambiente e envenenamento de pessoas, tem havido um aumento significativo nas tentativas de substituir os inseticidas químicos por métodos alternativos de controle.

Os gafanhotos sofrem predação e parasitismo por inúmeros inimigos naturais, incluindo predadores (aves, insetos e outros artrópodes), parasitóides e patógenos. Os predadores e parasitóides podem contribuir significativamente para seu declínio populacional, mas não são capazes de prevenir surtos, devido à sua lenta velocidade de crescimento populacional (Prior & Streett, 1997; Greathead, 1992; Prior & Greathead, 1989; W. D. Guerra & B.P. Magalhães, não publicado). É possível que dentre os inimigos naturais já identificados os patógenos apresentem o maior potencial para compor um programa de manejo integrado dessa praga. Os microrganismos patogênicos já são investigados há vários anos como agentes potenciais de controle biológico de acridídeos.

Os patógenos de gafanhotos mais mencionados na literatura pertencem aos grupos das rickétsias, nematóides, bactérias, vírus, protozoários e fungos. As rickétsias são organismos intracelulares de uso potencial bastante limitado. Os nematóides ocorrem enzooticamente em populações de ortópteros, apresentam pequena mobilidade e são de difícil produção massal. Isso pode ser a razão por terem sido pouco considerados em programas de controle microbiano. Existem vários relatos que atribuem às bactérias a causa de mortalidade elevada sobre populações de acridídeos, embora os registros de campo careçam de comprovação científica (Zelazny et al., 1997; Bucher, 1959). As pesquisas para desenvolver esses patógenos como

agentes de controle microbiano, iniciadas nos anos 50, não tiveram continuidade. Entre os vírus, os entomopoxvírus são os mais freqüentes. No entanto, o modo lento de ação associado às dificuldades de produção em larga escala e a um espectro limitado de hospedeiros têm restringido o seu desenvolvimento como agentes de controle microbiano (Streett et al., 1997). Os protozoários possuem limitações semelhantes, além de apresentarem baixa virulência. Mesmo assim, esses patógenos podem ser considerados como parte dos componentes de um sistema de manejo integrado de gafanhotos, pois podem ser transmitidos aos descendentes (Johnson & Dolinski, 1997). Os fungos se destacam devido ao seu modo de ação, isto é, sua capacidade de penetração através da cutícula, sem necessidade de ingestão pelo hospedeiro, como os demais patógenos. Mesmo sendo produzidos em larga escala com relativa facilidade, ainda existem alguns entraves relativos à produção e comercialização dos fungos como bioinseticidas. Em vista disso, esses agentes têm sido estudados com o objetivo de minimizar ou mesmo substituir os inseticidas químicos recomendados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação (FAO), para controle de gafanhotos em áreas ambientalmente sensíveis (Bateman, 1997).

De acordo com Prior & Greathead (1989), um patógeno ideal para aplicação em larga escala contra gafanhotos seria aquele de fácil produção massal a baixo custo e inócuo sobre mamíferos e organismos não-alvo. A principal razão para isso é que mesmo numa campanha em que a estratégia de controle leve a uma evidente economia de ingrediente ativo, centenas ou milhares de toneladas de propágulos do patógeno serão necessárias. Além disso, esse patógeno deveria ser facilmente formulável para uso com a tecnologia de aplicação a ultra baixo volume (UBV), apresentar boa persistência ambiental e atuar por contato, ao invés de ingestão. Neste capítulo, serão apresentados e discutidos os diferentes grupos de patógenos de gafanhotos, assim como aspectos relacionados à utilização desses organismos como agentes de controle microbiano.

Rickétsias

As rickétsias são partículas baciliformes ou discóides gram-negativas. Infectam os gafanhotos por via oral e normalmente se replicam por fissão binária no citoplasma

de células do tecido gorduroso. As formas infectivas entram na célula hospedeira por fagocitose e crescem no interior de um vacúolo. Células em estado adiantado de infecção se rompem, liberando as partículas infectivas na hemocele para iniciar outro ciclo. Os sintomas da doença se tornam evidentes em 25-28 dias após a inoculação. Os insetos infectados têm aparência letárgica e em insetos moribundos a hemolinfa se mostra turva. A espécie mais comum é *Rickettsiella grylli* que pode infectar várias espécies, incluindo *S. gregaria*, *L. migratoria* e *Zonocerus variegatus*. O potencial de rickétsias como agentes de controle microbiano de gafanhotos ainda não foi demonstrado (para maiores detalhes, vide Streett & McGuire, 1990).

Nematóides

Os nematóides, aqui considerados como patógenos, representam um grupo com relativo potencial de controle biológico de gafanhotos. Os mermitídeos, conhecidos como patógenos de acridídeos em várias regiões do mundo, são importantes agentes de controle natural em pastagens na Europa, Américas do Sul e do Norte, África e Austrália (Baker & Capineira, 1997). *Mermis nigrescens* e *Agamermis decaudata* são os dois nematóides mais relatados infectando esses insetos (Streett & McGuire, 1990). Poucos estudos básicos e aplicados têm sido realizados com esse grupo. Verificou-se, por exemplo, que a ecdise de *S. gregaria* pode ser inibida pela ação do nematóide *M. nigrescens* (Craig & Webster, 1974). Houve um decréscimo na síntese de proteínas do corpo gorduroso, muito embora não tenham sido observadas alterações nos níveis do hormônio ecdisona. Gordon et al. (1973) também determinaram para essa espécie que 21 dias após a inoculação o nível de proteína na hemolinfa foi significativamente diminuído pelo parasitismo. Embora não tenha sido encontrado infectando gafanhotos, o nematóide *Steinernema scapterisci* (Rhabdita: Steinernematidae) é um eficiente regulador de populações da paquinha *Scapteristicus* sp. (Orthoptera: Gryllotalpidae), praga subterrânea de gramíneas em alguns países (Parkman & Smart, 1996). Apesar dos nematóides serem considerados, em algumas situações, como bons agentes naturais de controle de gafanhotos, sua utilização em programas aplicados de controle é bastante limitada pela dificuldade de produção massal e pela necessidade de água livre no ambiente de atuação.

Bactérias

Inúmeras bactérias, principalmente das famílias Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Streptococcaceae e Bacillaceae, mostram-se patogênicas a insetos (Benintende & Marquez, 1996). Epizootias sobre populações de gafanhotos, atribuídas às bactérias, foram observadas na América do Norte já no início do século (Glaser, 1918; Herelle, 1914). Entretanto, pesquisas têm demonstrado a ineficiência desses agentes como agentes reguladores de populações acridianas (Zelazny et al., 1997).

Os gafanhotos mostram considerável resistência às infecções bacterianas. Bactérias ingeridas não se multiplicam e são rapidamente eliminadas do intestino (Bucher & Stephens, 1957). Uma exceção é *Serratia marcescens* (Enterobacteriaceae), que ocorre naturalmente sobre populações de acridídeos (Krieg, 1987). Em ensaio de campo com *S. gregaria*, a aplicação dessa bactéria, veiculada em iscas ou pulverizada em plantas, causou uma infecção específica em espécimens mortos aos oito dias após tratamento, mas nenhuma redução populacional significativa foi registrada (Stevenson, 1959). Elevada incidência em colônias de laboratório, conseqüência do hábito necrófago (consumo de cadáveres) dos insetos confinados, tem sido observada (Stevenson, 1959; Streett & McGuirre, 1990).

A bactéria não-esporulante *Pseudomonas aeruginosa* foi também observada causando infecção em gafanhotos e sua virulência é comparável à de *S. marcescens* (Stephens, 1959; Bucher & Stephens, 1957). *P. aeruginosa* tem baixo poder invasivo quando no intestino do inseto, mas, uma vez dentro da hemocele, é altamente patogênica (Tanada & Kaya, 1993). Em ensaios com os acridídeos *Melanoplus bivittatus* e *Camnula pellucida,* a DL_{50} variou de 8.000 a 29.000 bactérias por inseto adulto quando adicionada à alimentação; em contrapartida, quando a bactéria foi injetada na hemocele, esse número foi de 10 a 20 células (Bucher & Stephens, 1957). Estes autores observaram que a injeção de pequeno número de células na hemocele pode resultar em uma densidade de 10^9 bactérias/inseto. Rupturas na parede intestinal têm sido o provável mecanismo de penetração do patógeno na hemocele, e isso parece acontecer durante as ecdises (Zelazny et al., 1997). *P. aeruginosa* tem sido relatada causando mortalidade elevada em populações de insetos

em condições de laboratório, especialmente em locais com umidade e temperatura elevadas (Bucher, 1963). A aplicação no campo de *P. aeruginosa*, veiculada em iscas para o controle de ninfas e adultos, resultou em baixa infecção e só foram observadas mortes em ninfas mantidas em gaiolas (Baird, 1958). Outras espécies de bactérias, como *Aerobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris, Proteus mirabilis* e *Proteus rettgeari*, foram relatadas como patogênicas a gafanhotos, contudo são ineficazes em condições de campo (Krieg, 1987).

Bacillus thuringiensis (Bt) é o mais importante e conhecido entomopatógeno empregado no controle biológico de insetos-praga, sendo produzido em escala comercial há mais de 50 anos e utilizado em inúmeros países (Krieg, 1987; Dias, 1992). Apesar do grande número de insetos suscetíveis a essa bactéria, nenhuma cepa foi relatada até o momento como efetiva contra gafanhotos (Zelazny et al., 1997; Streett & Henry, 1990). De 393 cepas de Bt testadas contra *L. migratoria* ou *S. gregaria,* isoladas de solos e de *L. migratoria, S. gregaria* e *Z. variegatus*, nenhuma mostrou-se patogênica, apesar de algumas terem apresentado atividade em outros insetos (Zimmermann et al., 1994). *B. thuringiensis* caracteriza-se pela produção de cristais protéicos (d-endotoxinas) durante o processo de esporulação, alguns dos quais tóxicos e específicos para certos grupos de insetos, principalmente lepidópteros e dípteros (Krieg & Langenbruch, 1981). As d-endotoxinas atuam, somente após a sua dissolução e digestão proteolítica, em insetos que possuem trato intestinal com pH alcalino. O pH intestinal dos gafanhotos, levemente ácido, parece ser o responsável pela não-dissolução da proteína cristal de Bt (Prior & Greathead, 1989). Em ensaios de laboratório, a exotoxina denominada b-toxina, termoestável, encontrada no sobrenadante de uma cultura de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis,* mostrou atividade tóxica *per os* em ninfas de *L. migratoria* var. *migratorioides,* quando pulverizada sobre plantas de trigo (Burgerjon et al., 1964). A b-toxina, produzida por certas cepas de Bt, é tóxica a várias ordens de insetos, ácaros, nematóides e também vertebrados, com efeitos teratogênicos e mutagênicos (Sebesta et al., 1981). Segundo Beegle & Yamamoto (1992), citado por Zelazny et al. (1997), cepas que produzem toxinas específicas, particularmente d-endotoxinas, são consideradas mais desejáveis para o controle de insetos-praga.

Em ensaios preliminares, verificou-se uma mortalidade de 10 a 30% de adultos de *R. schistocercoides* alimentados com dieta contaminada com suspensões concentradas de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (2 isolados), var. *israelensis* (1), var. *entomocidus* (1), var. *kenyae* (1), var. *kurstaki* (1), ou *Bacillus sphaericus* (1) (J.B.T. da Silva, não publicado). Alguns coleópteros com pH intestinal similar ao de gafanhotos têm apresentado suscetibilidade a outras cepas de Bt (Krieg et al., 1983). As recentes descobertas de cepas dessa bactéria toxigênicas para várias ordens de insetos têm estimulado a busca de novas cepas com potencial para o controle de gafanhotos.

Vírus

Os gafanhotos podem ser infectados por diferentes tipos de vírus, incluindo vírus com genoma constituído de RNA. Um vírus de poliedrose citoplasmática, membro da família Reoviridae e originalmente isolado do gafanhoto *Caledia captiva*, mostrou-se patogênico a *L. migratoria* (Colgan, 1986), embora exista a suspeita de que a mortalidade pudesse estar associada à bactéria *Enterobacter cloacae*. Um representante da família Picornaviridae foi isolado de *Melanoplus bivittatus* e sua patogenicidade a outras espécies de acridídeos foi demonstrada, embora semelhanças com picornavírus de vertebrados tenham levado à descontinuidade dos estudos (Jutila et al., 1990, mencionado por Streett & McGuire, 1990).

Os vírus da família Poxviridae que apresentam extenso genoma constituído de moléculas de DNA dispostas em dupla fita linear têm sido os únicos considerados para o controle biológico de ortópteros. Poxvírus que atacam insetos, denominados entomopoxvírus (EPVs), foram primeiramente descritos por Vago (1963) e ocorrem em aproximadamente 35 espécies de insetos em 5 ordens (Tanada & Kaya, 1993). Os corpos de inclusão desses vírus, também denominados esferóides, uma matriz protéica rica em esferoidina, contêm um número variável de vírions, normalmente de 100 a 500 (Streett & McGuire, 1990). Quando ingeridos, os esferóides são degradados no trato digestivo do hospedeiro. Os vírions são liberados e fundem-se à membrana plasmática das células epiteliais, atingindo posteriormente a região intracelular. Os vírus replicam-se exclusivamente no citoplasma de células infectadas,

principalmente naquelas do tecido adiposo (Souza & Lecuona, 1996).

Dentre os entomopoxvírus, três gêneros são reconhecidos em função da morfologia do vírion, peso molecular do genoma e espectro de hospedeiros (Exposito, 1991, mencionado por Souza & Lecuona, 1996): A (naturalmente encontrado atacando coleópteros), B (lepidópteros e ortópteros) e C (dípteros). Um provável EPV foi isolado de himenópteros do gênero *Bombus* (Clark, 1982). Através de técnicas moleculares tem-se demonstrado a existência de diferenças entre os entomopoxvírus de gafanhotos, sendo que até o momento já foram registrados 15 EPVs associados a esses insetos (Streett et al., 1997). O EPV obtido de *M. sanguinipes* (Henry et al., 1969; Henry & Jutila, 1966), denominado MsEPV, tem sido o mais estudado. O vírion do MsEPV é ovóide, com os corpos de inclusão medindo de 3 a 15μm de diâmetro (Streett et al., 1997). O seu genoma apresenta entre 126 x 10^6 e 155 x 10^6 Da (Levin et al., 1993; Streett et al., 1990). Apesar da existência de entomopoxvírus infectivos a um único hospedeiro, o MsEPV é capaz de infectar várias espécies (Levin et al., 1993).

Os gafanhotos infectados apresentam uma coloração "desbotada", além de mostrarem-se bastante lentos (Henry et al., 1969). Um dos sintomas característicos da infecção por EPVs é a hipertrofia do tecido gorduroso, resultante do acúmulo de corpos de inclusão em células infectadas, podendo o tecido apresentar uma coloração esbranquiçada a acinzentada (Henry et al., 1969). Corpos de inclusão maduros são detectados na hemolinfa de ninfas de *M. sanguinipes* a partir do 21° dia após a infecção pelo vírus MsEPV (Miranpuri et al., 1992). De acordo com esses autores, corpos de inclusão são também observados no citoplasma de células sangüíneas dos hospedeiros, embora exista controvérsia quanto ao fato desse fenômeno ser o resultado de fagocitose ou da infecção viral. Diferentemente dos demais EPVs de gafanhotos, o entomopoxvírus, isolado de *Cataloipus fuscocoeruleipes*, apresenta alguns corpos de inclusão desprovidos de vírions, da mesma forma que um número elevado de vírions livres pode ser observado no citoplasma das células infectadas (Purrini, 1989).

Quando o MsEPV é inoculado oralmente em doses baixas (10^3 a 10^4 por ninfa de terceiro estádio), provoca a mortalidade dos gafanhotos tratados muitos dias (14 a 42) após a inoculação (Woods et al., 1992). Por outro lado, quando inoculados com doses elevadas, a mortalidade ocorre nos primeiros dias (2 a 10) após a infecção

e, nesse caso, não é observada a produção da forma oclusa do vírus. Os autores argumentam que a utilização de doses elevadas desse patógeno seria indicada para o tratamento de populações que estejam ocorrendo em elevada densidade, embora não se deva esperar por uma taxa de transmissão horizontal considerável em condições de campo. A opção por doses baixas do patógeno levaria a uma maior transmissão do vírus, diminuindo a taxa de crescimento da população, o que, por sua vez, reduziria a freqüência de surtos populacionais. Fenômeno semelhante foi observado na Argentina, em testes de laboratório com um vírus exótico, o EPV de *Phoetaliotes nebrascencis* e o gafanhoto *Dichroplus elongatus* (Lange & Streett, 1993).

Embora menos estudados que os vírus da família Baculoviridae, a elevada especificidade, a virulência moderada e a possibilidade de formulação, fazem dos entomopoxvírus um grupo com potencial para o controle de gafanhotos-praga (Woods et al., 1992). Os danos causados por EPVs sobre o hospdeiro podem ser diretos, causando mortalidade nos insetos tratados, ou indiretos, representados por redução no consumo alimentar, no desenvolvimento e na taxa de reprodução dos indivíduos infectados (Streett et al., 1997).

O consumo alimentar e o desenvolvimento de ninfas de *M. sanguinipes* de primeiro e terceiro estádios, inoculadas via oral, respectivamente, com $5x10^2$ ou $5x10^3$ e $1x10^4$ ou $1x10^5$ corpos de inclusão do MsEPV por indivíduo, foram avaliados em laboratório durante 40 dias (Olfert & Erlandson, 1991). Para todos os tratamentos, menos de 20% das ninfas atingiram a fase adulta, ao passo que esse valor foi de 100% para insetos sadios. O consumo alimentar variou de 36 a 76% daquele observado para as testemunhas, dependendo do estádio do inseto e da dose utilizada.

Assim como ocorre com outros vírus oclusos, os esferóides dos EPVs conferem proteção aos vírions contra fatores climáticos adversos, garantindo maior persistência ambiental (Erlandson & Streett, 1997). Ao contrário do verificado com baculovírus, o tegumento de gafanhotos infectados por EPVs não é danificado e, conseqüentemente, não ocorre a liberação de corpos de inclusão no meio ambiente (Streett et al., 1997). Assim, o hábito necrófago de inúmeras espécies de gafanhotos assume papel relevante na transmissão horizontal da doença em condições de campo. Estudos têm demonstrado que a necrofagia é comum nas subfamílias Melanoplinae e

Oedipodinae, e rara ou ausente nas subfamílias Romaleinae e Gomphocerinae (Lockwood, 1989; Lavigne & Pfadt, 1964). Portanto, o sucesso de controle com EPVs parece maior para melanoplíneos. Para o *R. schistocercoides* (Gomphocerinae), adultos e ninfas ocorrem durante curto período de tempo. Conseqüentemente, a transmissão horizontal do vírus é dificultada, o que de certa forma explica o fato de epizootias ou mesmo simples relatos desses patógenos não terem sido ainda registrados no Brasil. A transmissão vertical, na qual o patógeno passa de uma geração a outra do inseto-hospedeiro, não foi observada para os EPVs.

O pequeno espectro de hospedeiros dos EPVs parece ser um fator limitante ao emprego desse grupo de patógenos na América do Norte, onde os surtos populacionais de gafanhotos envolvem a participação de um complexo de 12 a 15 espécies diferentes (Streett & Henry, 1990). Em regiões onde os surtos estão normalmente associados a uma única espécie acridiana, o emprego de EPVs apresentaria, sob esse aspecto, maior possibilidade de sucesso.

Por serem parasitas intracelulares obrigatórios, a produção massal desses vírus tem sido bastante problemática. Como a produção é feita *in vivo*, o processo é trabalhoso e pouco eficiente. Tentativas de produção do MsEPV em algumas espécies acridianas não foram bem sucedidas e os melhores resultados têm sido obtidos sobre o hospedeiro original (Oma & Streett, 1993). Esses autores observaram que a injeção de vírions em ninfas de quarto estádio levou a uma produção de esferóides significativamente maior que aquela obtida com a administração oral do vírus: $2,0 \times 10^8$ corpos de inclusão/inseto tratado. Considerando-se a aplicação no campo de $1,2 \times 10^{10}$ corpos de inclusão/ha, haveria a necessidade de 60 gafanhotos infectados para a obtenção da dose desejada (Streett et al., 1997). Apesar do custo relativamente pequeno da mão-de-obra e dieta para a produção de insetos infectados suficientes para o tratamento de 1 hectare (U$ 13,00), esses autores estimam que o preço do produto comercial, levando-se em consideração o preço de iscas contendo o microsporídeo *Nosema locustae*, seria da ordem de U$ 247,00/ha.

A possibilidade de emprego de uma formulação granular através da encapsulação de corpos de inclusão purificados em matriz de amido foi avaliada por McGuire et al., (1991) Embora as percentagens de mortalidade e infecção obtidas

não tenham sido significativamente superiores àquelas verificadas no tratamento em que o vírus foi formulado de forma convencional (isca), os resultados foram considerados positivos. A maior densidade do material encapsulado permite melhor calibragem e distribuição homogênea do produto em condições de campo, sobretudo quando se têm ventos fortes. Uma vantagem adicional foi a manutenção da atividade viral, seguida de armazenamento a 4°C, por pelo menos 9 meses, ao passo que produtos comerciais baseados em isca contendo farelo de trigo, devido à fermentação do substrato, perdem a atividade em menos de 30 dias, quando armazenados na mesma temperatura.

Testes de campo com o MsEPV empregando o vírus encapsulado em amido foram realizados no período de 1989-1991. Os melhores resultados foram observados aos 13 dias pós-tratamento, quando as taxas de infecção obtidas variaram de 14 a 23%, dependendo da dose utilizada (Streett et al., 1997). A exemplo do que ocorre com os baculovírus, um conhecimento detalhado do genoma e do processo de infecção dos EPVs é necessário. O emprego da engenharia genética visando ao desenvolvimento de novos isolados poderá conduzir a avanços significativos no controle de gafanhotos com esses patógenos (Erlandson & Streett, 1997).

Protozoários

Os protozoários são organismos eucarióticos unicelulares, podendo ser encontrados em vida livre, parasitando ou em simbiose com plantas e animais. Estima-se em 65.000 o número de espécies, sendo que a metade é constituída de fósseis e 10.000 são parasitas. Dentro do subreino Protozoa são reconhecidos sete filos, com quatro deles incluindo parasitas de insetos: Sarcomatigophora, representados pelos flagelados e amebas; Apicomplexa, onde destacam-se as gregarinas, neogregarinas e coccídeos; Ciliophora, representados pelos ciliados; e Microspora, onde incluem-se os microsporídeos, potencialmente importantes no controle biológico de inúmeros insetos (Undeen & Vávra, 1997; Levine et al., 1980). A maioria é encontrada no trato intestinal do hospedeiro como comensal ou em associação simbiótica com os mesmos, com as espécies patogênicas apresentando a capacidade de invadir e se desenvolver no ambiente intracelular (Tanada & Kaya, 1993).

Os filos Sarcomastigophora, Apicomplexa e Microspora abrigam os protozoários mais virulentos a gafanhotos. Pelo menos 50 espécies de acridídeos têm sido relatadas como suscetíveis à infecção por amebas (Lange & Wittenstein, 1998). A *Malameba locustae* é dentre as amebas entomopatogênicas a representante mais importante, podendo infectar uma variedade de ortópteros das famílias Tettigoniidae, Gryllidae e Acrididae (Streett & Henry, 1990). Após a ingestão de cistos pelo hospedeiro, um trofozoíto uninucleado (forma vegetativa) é liberado em seu intestino médio, depois passa para os tubos de Malpighi, podendo interferir na função excretora do hospedeiro e, conseqüentemente, levá-lo à morte (Castelo Branco Jr., 1998; Braun et al., 1988). Em insetos fortemente infectados, a acumulação de cistos no lúmen dos tubos de Malpighi provoca hipertrofia, alteração de coloração e ruptura dos mesmos, com liberação de trofozoítos na hemocele (Lange, 1996). A transmissão horizontal resulta da liberação de cistos através das fezes, levando à contaminação do ambiente e dos alimentos.

A distribuição geográfica de *M. locustae* é ampla, tendo sido detectada em populações naturais de acrídideos na América do Norte, África e Austrália (Brooks, 1988). O primeiro registro desse protozoário em acridídeos da América do Sul foi feito na Argentina, sobre ninfas de *Staurorhectus longicornis* (Lange, 1996). Segundo Streett & Henry (1990), citados por Lange & Wittenstein (1998), *M. locustae* pode ser útil no controle de acridídeos, mediante a liberação aumentativa de cistos sobre ninfas na fase solitária, evitando ou reduzindo a tendência de gregarização de algumas espécies de gafanhotos. Um vez estabelecida em colônias, a amebíase acridiana é de difícil erradicação, causando também uma redução no potencial reprodutivo do hospedeiro (Lange, 1996; Henry, 1990; Braun et al,. 1988). *M. locustae* foi o primeiro protista a ser utilizado em tentativas de controle biológico de acridídeos quando Taylor & King (1937) misturaram cistos da ameba com farelo de trigo e melado de cana-de-açúcar e os forneceram a populações naturais de acridídeos (Henry & Lange, 1996).

No filo Apicomplexa, a classe Gregarina contém a maioria das espécies entomopatogênicas, mas somente as pertencentes à ordem Neogregarinida apresentam algum potencial no controle biológico de insetos (Lange, 1996). Quanto às gregarinas da ordem Eugregarinida, apesar de inúmeros registros em gafanhotos, seu potencial

como agentes de controle biológico não foi evidenciado. São parasitas responsáveis por infecções e mortalidade em criações de laboratório, principalmente em ambientes de pouca higiene. Há um consenso de que, em condições normais, as eugregarinas se comportam como comensais ou como parasitas relativamente inócuos aos hospedeiros (Brooks, 1988).

Os protozoários do filo Microspora são parasitas esporogênicos intracelulares e, portanto, obrigatórios (Canning, 1977). Mais de 1000 espécies já foram classificadas dentro de aproximadamente 100 gêneros (Sprague et al., 1992). Filogeneticamente, os microsporídeos são eucariontes primitivos, pois têm um núcleo verdadeiro. Entretanto, possuem ribossomas semelhantes aos procariontes e não têm mitocôndrias (Vossbrink et al., 1987). Apresentam grande capacidade reprodutiva e caracterizam-se pela produção de esporos que contêm um filamento polar e um agente infectivo ou esporoplasma (Canning, 1977). O esporo dos microsporídeos é um dos menores eucariontes conhecidos, medindo entre 3x6 e 1x3mm, apresentando formato ovóide ou elipsóide e estrutura altamente especializada (Lange, 1996).

Os microsporídeos têm demonstrado ser o mais importante grupo de protozoários entomopatogênicos e possuem grande potencial como agentes de controle de insetos (Streett & McGuire, 1990). Esses protozoários podem matar o hospedeiro em um prazo de poucos dias a alguns meses após a infecção, e todos os estágios do hospedeiro podem ser infectados (McLaughlin, 1971). São encontrados parasitando insetos em diversas ordens, sendo o gênero *Nosema* o mais comum entre eles, contando com aproximadamente 200 espécies (Sprague, 1982).

Diversas espécies de microsporídeos têm sido isoladas de ortópteros, dentre elas *Nosema locustae* (Canning, 1953), *Nosema acridophagus* (Henry, 1967), *Nosema cuneatum* (Henry, 1971), *Nosema maroccanus* (Issi & Krylova, 1987), *Nosema montanae* (Wang et al., 1991), *Nosema asiaticus* (Wen, 1996), *Nosema pyrgomorphae* (Lange et al., 1992, Toguebaye et al., 1988), *Heterovesicula cowani* (Lange et al., 1995), *Johenrea locustae* (Lange et al., 1996) e *Perezia dichroplusae* (Lange, 1987). *N. locustae* é o microsporídeo mais estudado e testado, tendo sido isolado de gafanhotos na Inglaterra, Canadá, Estados Unidos e África (Henry & Oma, 1981). Desde que foi isolado, mais de 100 espécies de acridídeos foram relacionadas como suscetíveis

(Bomar et al., 1993; Henry, 1990; Streett & Henry, 1990), incluindo *R. schistocercoides* (Silva et al., 1996). Além disso, *N. locustae* infecta o proscopídeo *Stiphra robusta* (conhecido como mané-magro; Silva et al., 1996), importante praga de diversas culturas no Nordeste brasileiro. Todos os acridídeos parecem ser suscetíveis a esse patógeno (Streett & Henry, 1990).

A infecção horizontal é iniciada pela ingestão de esporos de *N. locustae* pelo gafanhoto, através de alimento contaminado ou pela prática da necrofagia (Bidochka & Khachatourians, 1991). No trato intestinal, o filamento polar é liberado do esporo e coloca o esporoplasma em contato com a superfície das células epiteliais do intestino médio, ou o injeta diretamente dentro dessas células (Raina et al., 1987). O esporoplasma penetra principalmente nas células do tecido adiposo, no qual passa por duas fases: merogônica (forma vegetativa) e esporogônica (formação de esporos), com invasão de outras células adiposas (Canning, 1962). As mesmas fases podem ocorrer nos oócitos de fêmeas infectadas, resultando na transmissão transovariana. A infecção pode também ocorrer através das glândulas anexas, contaminando o córion do ovo, resultando na transmissão transovigênica (Castelo Branco Jr., 1998). As infecções são mais proeminentes no tecido adiposo, mas também são observadas no pericárdio, tecido nervoso, intestino e nas gônadas (Henry & Oma, 1981). A acumulação de parasitas no tecido adiposo causa hipertrofia e alteração de coloração do corpo graxo, diminuindo as reservas energéticas do hospedeiro, acarretando também perda do vigor, interferência na maturação, redução do poder de alimentação, diminuição da fecundidade e alteração em seu comportamento (Johnson, 1997; Canning, 1962). Em certos casos, alguns microsporídeos podem ser mais virulentos para acridídeos que *N. locustae*, como *N. acridophagus* (Henry et al., 1979). Na realidade, *N. locustae* é considerado um microsporídeo de virulência moderada, devendo ser aplicado contra gafanhotos durante a fase solitária e em áreas restritas (Streett & Henry, 1990).

Para propagação do esporo, *N. locustae* deve ser cultivado no próprio hospedeiro ou em cultura de células. A recuperação de seus esporos é feita macerando-se os indivíduos infectados e suspendendo-se os fragmentos em igual volume de água (Henry, 1985). Para purificação dos esporos, os resíduos celulares são filtrados em

gaze de algodão e precipitados por centrifugação. *N. locustae* pode sobreviver em cadáveres de insetos por mais de um ano a -10°C (Bidochka & Khachatourians, 1991).

Em ensaios de campo, Ewen & Mukerji (1980) demonstraram uma redução de 50 a 60% na densidade populacional de *M. sanguinipes*, *Melanoplus packardii* e *C. pellucida* e prevalência de 30 a 40% entre os sobreviventes. Esporos de *N. locustae* formulados como isca à base de farelo de trigo e aplicados no campo causaram mortalidade significativa após quatro semanas, além de infecção nos insetos sobreviventes (Streett & Henry, 1990). Em populações de acridídeos na Argentina, há relatos da persistência de *N. locustae* sete anos após sua introdução (Lange, 1992), mostrando que o patógeno, mesmo exótico, pode se estabelecer em populações autóctones (Henry & Lange, 1996). Esporos frescos de *N. locustae* provocaram maior controle do que esporos previamente armazenados em água ou em cadáveres de gafanhotos a -10°C (Henry & Oma, 1974). Esses esporos têm mostrado-se mais eficazes quando formulados como isca, que em suspensões veiculadas a UBV (Henry et al., 1978). Esse patógeno, formulado como isca à base de farelo de trigo, foi utililizado em mais de 100.000ha/ano na China ($7,4X10^6$ esporos/1,5kg de farelo/ha), com um total de 350.000ha já tratados (Johnson, 1997). Como resultado, reduções populacionais de 40 a 60% e prevalência de 20 a 60% nos gafanhotos sobreviventes têm sido observadas (Long et al., 1996; Yan et al., 1996, citados por Johnson, 1997). As infecções de gafanhotos provocadas por aplicações de *N. locustae* no campo têm mostrado redução nas atividades de competição pelo alimento, bem como na diminuição na taxa de dispersão ou migração.

Formulações contendo esporos de *N. locustae* e produtos químicos compatíveis têm sido também avaliadas. Morris (1985) alimentou ninfas de *M. sanguinipes* com folhas de alface que haviam sido imersas numa mistura contendo esporos de *N. locustae* e os inseticidas químicos dimetoato ou carbaril. A taxa de infecção foi elevada e o ganho de peso da ninfa foi menor quando esta foi alimentada com esporos de *N. locustae* consorciados com químicos. Nenhum efeito foi observado em populações com baixa densidade ($<9,6$ gafanhotos/m^2) quando *N. locustae* foi aplicado no campo, mas populações com alta densidade foram reduzidas em 40-45%, com altas taxas de necrofagia e baixa fecundidade em relação ao grupo controle

(Lockwood & Debrey, 1990). Ao contrário do verificado com outras espécies de protozoários, a transmissão, produção e formulação utilizando *N. locustae* é relativamente fácil (Johnson, 1997). No entanto, a produção em larga escala de inóculo, para aplicações inudantivas ou aumentativas, é considerada por alguns como um fator limitante à utilização de microsporídeos (Henry, 1990). Geralmente, obtêm-se em torno de $6,4 \times 10^9$ esporos por adulto de *Melanoplus differentialis* aos 32 dias, após a inoculação (Henry, 1990). Por outro lado, Jonhson (1997) menciona que a manutenção de uma taxa de produção por indivíduo de $9,1 \times 10^9$ gera aproximadamente 10^{12} esporos por gaiola, contendo 250 adultos de *M. differentialis*, suficiente para pulverizar 400ha. O custo de produtos à base de *N. locustae* vem caindo ao longo dos últimos anos, passando de U$ 18,00/ha (Henry, 1985, citado por Jenkins & Goettel, 1997) para U$ 2,47/ha (Streett et al., 1997).

Os protozoários entomopatogênicos têm poucas características compatíveis com aquelas exigidas para os inseticidas microbianos. A baixa patogenicidade, causando infecções crônicas e subletais em seus hospedeiros, e a dificuldade de produção em larga escala, têm dificultado o seu uso. Entretanto, estratégias de controle de longo prazo, baseadas na introdução desse agente em áreas atacadas por gafanhotos-praga, devem ser consideradas.

Fungos

Os fungos entomopatogênicos são responsáveis por cerca de 80% das doenças capazes de provocar epizootias em populações de insetos (Robbs & Bittencourt, 1998). Além de agirem principalmente por contato ao invés de ingestão, eles são de fácil disseminação e sua produção em larga escala em meios artificiais é relativamente simples. Os fungos se destacam como os candidatos mais promissores para o controle biológico de gafanhotos. Os principais registros de fungos infectando gafanhotos foram catalogados por Prior & Greathead (1989).

A doença fúngica mais comum entre os gafanhotos é causada por *Entomophaga* (=*Entomophtora*) *grylli*. Acredita-se que essa espécie englobe um complexo de espécies ou patótipos em diferentes regiões, incluindo África, Ásia, Austrália, Europa, América do Norte e América do Sul (Carruthers et al., 1997;

Streett & McGuire, 1990). Essa doença é popularmente conhecida como "summit disease" (= "doença do topo"), já que os insetos moribundos sobem para o ápice das plantas, onde se prendem antes de morrer. É possível que este comportamento seja o responsável pelo maior número de registros dessa doença em comparação a outras doenças que não estão associadas ao deslocamento do hospedeiro para o topo das plantas (Greathead, 1992). Os patógenos desse complexo podem causar epizootias espetaculares de modo a reduzir drasticamente a densidade populacional de seus hospedeiros. Embora as tentativas de seu uso como agentes de controle biológico tenham produzido resultados inconsistentes, esses patógenos têm demonstrado seu potencial em diversas partes do mundo. Entretanto, ainda são necessários estudos para avaliar os fatores limitantes de sua aplicação prática, como a indisponibilidade de uma técnica de produção massal, a falta de um método de aplicação dos esporos infectivos ou hifas e sua dependência de condições ambientais específicas para sobrevivência e infectividade.

No entanto, exemplos como o aumento inoculativo do patótipo 1 de *E. grylli*, nos Estados Unidos, e a introdução inoculativa do patótipo 3 da Austrália para os Estados Unidos, em associação com um subseqüente declínio na população das espécies chaves, indicam que esses patógenos oferecem alternativas concretas para o controle biológico de gafanhotos (Carruthers et al., 1997). No Brasil, não existe registro desse complexo de espécies, apesar de inúmeros levantamentos de doenças de gafanhotos (B. Magalhães, M.R. Faria & J.B.T. Silva, não publicado). Fungos menos comuns, como é o caso do hifomiceto *Sorosporella* sp., também causam infecções naturais em gafanhotos (Welling et al., 1995). Epizootias causadas por outros hifomicetos, principalmente *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, têm sido observadas (Greathead, 1992). *B. bassiana* tem sido isolado de adultos e ninfas de *R. schistocercoides* coletados na Chapada dos Parecis, em Mato Grosso e *Metarhizium flavoviride* (= *M. anisopliae* var. *acridum*; Driver et al., 1999), de adultos de *S. pallens* coletados no Rio Grande do Norte (Moreira et al., 1996). A avaliação da patogenicidade e virulência de *B. bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *M. anisopliae*, *M. flavoviride*, *Paecilomyces farinosus* e *Verticillium lecanii* em condições de laboratório, sobre diferentes acridídeos, revelou índices de infecção bastante variáves, de 0 a 100%

(Tabela 1). Os resultados oscilam em função de inúmeros fatores, como espécie e isolado do patógeno, espécie e estágio do hospedeiro, dose e formulação empregada, método de inoculação e condições de incubação. Quando avaliados em casa-de-vegetação ou em experimentos de campo, *B. bassiana* e *M. flavoviride* causaram índices de mortalidade elevados, mas *V. lecanii* mostrou-se pouco eficiente (Tabela 2), mesmo sendo capaz de infectar gafanhotos em laboratório (Harper & Huang, 1986). Johnson et al. (1988) demonstraram a possibilidade de infectar três espécies com esse patógeno, utilizando diversas técnicas de inoculação, mas não foi possível observar transmissão horizontal e a eficácia em experimentos de campo foi baixa. Os testes vêm sendo realizados principalmente no Canadá, na Austrália, em países da África e do Brasil. Em alguns casos, a aplicação de *B. bassiana* em formulação oleosa (2 a $5x10^{13}$ conídios/ha) tem levado a reduções substanciais nas populações de gafanhotos (Jaronski & Goettel, 1997, Inglis et al., 1997). Na avaliação dessas aplicações, os insetos são coletados no campo, após a aplicação de *B. bassiana*, e mantidos em gaiolas em laboratório. Entretanto, nem todos as aplicações de campo têm sido tão bem sucedidas. Por exemplo, na aplicação de *B. bassiana* ($2x10^{13}$ conídios/ha), na ilha de Cabo Verde, apenas 30% dos insetos coletados e mantidos em gaiolas em laboratório desenvolveram infecção e, além disso, não houve redução significativa na população de campo (Lobo-Lima et al., 1992). As avaliações da eficiência de *M. flavoviride* na África (IMI 330189), Austrália (F 1985 = ARSEF 324) e no Brasil (CG 423) indicaram reduções populacionais entre 60 e 80%, embora em alguns casos esse valor tenha se aproximado de 100%. Informações complementares referentes a outros ensaios realizados com *M. flavoviride*, dentro do programa LUBILOSA (Lutte Biologique contre les Locustes et les Sauteriaux), podem ser obtidas em tabela compilada por Lomer et al. (1997). *M. flavoviride* vem sendo desenvolvido como bioinseticida para o controle de ortópteros-praga na África, com recursos de agências do Canadá, Holanda, Reino Unido, EUA e Suíça, e resultou no lançamento do produto comercial GreenMuscle® em 1998, após 9 anos de intensas pesquisas. A empresa denominada BCP será responsável pela produção do bioinseticida para o tratamento inicial de 50.000 hectares, nas regiões Central e Sul da África, sobretudo em áreas onde o uso de químicos não é bem aceita, como nos parques nacionais (Bateman, 1997).

TABELA 1. Avaliação de fungos entomopatogênicos sobre acridídeos em condições de laboratório.

B. bassiana	ARSEF 2880	Adultos de *Melanoplus sanguinipes*	Diversas (isca)	Mortalidade de 8 a 100%; DL_{50} de $3,4 \times 10^{7}$ conídios/inseto aos 14 dias	Jeffs et al., 1997
	GHA	Ninfas de *M. sanguinipes*	Diversas (isca)	Infecção confirmada de 0 a 100% aos 14 dias, dependendo do substrato e do ingrediente inerte	Inglis et al., 1996b
		Ninfas de *M. sanguinipes*	$1,0 \times 10^{11}$ conídios/acre (pulverização)	Mortalidade de 72,5% aos 10 dias	Brinkman et al., 1997
	Diversos	Ninfas de *M. sanguinipes*	Diversas (isca)	DL_{50} para o isolado GHA foi de 5.800 conídios aos 14 dias; mortalidade provocada pelo isolado LRC-82 foi <50%	Inglis et al., 1996c
Beauveria spp.	Diversos	Adultos de *M. sanguinipes*	$5,5 \times 10^{6}$ a $5,5 \times 10^{7}$ conídios/ml (imersão)	TL_{50} de 4,13 (*B. bassiana* – ATCC 44860) a 20,08 dias (*B. brongniartii*)	Khachatourians, 1992
M. flavoride	CG 423	Adultos de *Schistocerca pallens*	9.000 a 21.000 conídios/inseto (tópico)	Mortalidade superior a 90% aos 10 dias	Xavier-Santos et al., 1997
	IMI 330189	Ninfas de *Rhammatocerus schistocercoides*	5.000 conídios/inseto (tópico)	Mortalidade superior a 90% aos 10 dias	Faria & Magalhães, 1993
		Ninfas e adultos de *Schistocerca americana*	$1,2 \times 10^{7}$ e $1,2 \times 10^{8}$ conídios/insetos (tópico)	Mortalidade de 86,1 a 99,4% (ninfas) e 80,8% (adultos) aos 14 dias	Sieglaff et al., 1998
		Adultos de *Schistocerca gregaria*	Diversas (tópico)	DL_{50} foi de 8.900 para formulação oleosa a $> 10^{6}$ conídios para a formulação aquosa, aos 5 dias	Bateman et al., 1993
		Adultos de *S. gregaria*	8.000 conídios por inseto (tópico)	Mortalidade de 100% aos 14 dias	Griffiths & Bateman, 1997
		Ninfas de *S. gregaria*	Diversas (isca)	Mortalidade de 20 a 100% aos 14 dias	Caudwell & Gatehouse, 1996
Metarhizium spp.	Diversos	Ninfas de *Phaulacridium vitatum* (Pv) e *Chortoicetes terminifera* (Ct)	Diversas (tópico)	DL_{50} para isolado FI 985 (*M. flavoviride*) foi de 1,212 (Pv) e 417 conídios (Ct)	Milner & Prior, 1994
		Adultos de *Locusta migratoria* (Lm), *Austracris guttulosa* (Ag) e *Valanga irregularis* (Vi)	Diversas (tópico)	DL_{50} para isolado FI 985 (*M. flavoviride*) foi de 387 (Lm) e 92 conídios (Ag) aos 12 dias; a mortalidade de Vi foi de 100% aos 13 dias (5.000 conídios/inseto)	Milner et al., 1996
P. farinosus	DAOM 64370a	Adultos de *M. sanguinipes*	$5,5 \times 10^{6}$ a $5,5 \times 10^{7}$ conídios/ml (imersão)	TL_{50} de 6,36 dias	Khachatourians, 1992
V. lecanii	ATCC 46578	Adultos de *M. sanguinipes*	$5,5 \times 10^{6}$ a $5,5 \times 10^{7}$ conídios/ml (imersão)	TL_{50} de 7,22 dias	Khachatourians, 1992
	DAOM 17104	Ninfas e adultos de Melanoplus spp.	Diversas	Mortalidade de 51 a 99% aos 12 dias	Johnson et al., 1988

TABELA 2. Avaliação de fungos entomopatogênicos sobre acridídeos em condições de casa-de-vegetação e em condições de campo, com e sem gaiolas.

FUNGO	ISOLADO	ESPÉCIE	DOSE	RESULTADO	REFERÊNCIA
M. flavoride	CG 423	Ninfas de *Rhammatocerus schistocercoides*	2,4 x 10^{10} conídios/ha (UBV, sobre vegetação)	Infecção confirmada de 54% após 3 semanas. Ensaio de campo realizado em Mato Grosso, Brasil	Magalhães, 1997
	F1985	Principalmente adultos de *Phaulacridium vitatum*	2 x 10^{9} x 2 x 10^{10} conídios/gaiola (UBV, sobre	Mortalidade de 100% aos 9 dias (gafanhotos mantidos em laboratório a partir do 4º dia após a aplicação do fungo no campo)	Milner et al., 1994
		Ninfas de *C. terminifera*	3,0 x 10^{10} conídios/ha (UBV)	Densidade populacional reduzida em 2/3 aos 22 dias. Ensaio de campo realizado na Austrália	Hoopes et al., 1995
		Principalmente adultos de *Chortoicetes terminifera*	3,1 x 10^{10} conídios/ha (UBV)	Densidade populacional passou de aproximadamente 5 para 1 gafanhoto/m^2 aos 21 dias. Ensaios de campo realizados na Austrália	Milner et al., 1997
	I91-609	Ninfas e adultos de *Zonocerus variegatus*	5,0 x 10^{11} conídios/ha (UBV)	Mortalidade superior a 90% aos 15 dias (insetos coletados imediatamente após a aplicação e mantidos em laboratório)	Langewald et al., 1997
		Ninfas e adultos de *Z. variegatus*	5,0 x 10^{11} conídios/ha (UBV)	Mortalidade de 93% aos 21 dias (insetos coletados imediatamente após a aplicação e mantidos em laboratório). Densidade populacional passou de aproximadamente de 5 para menos de 1 gafanhoto/m^2 aos 15 dias. Ensaio de campo realizado em Benin	Thomas et al., 1996
	IMI 330189	Adultos de *Schistocerca americana*	1,45 x 10^{9} conídios/ha (UBV)	Mortalidade superior a 95% aos 21 dias	Siegball et al., 1998
		Adultos de *Schistocerca gregaria* e ninfas de *Z. variegatus*	3,5 x 10^{11} conídios/ha (UBV)	Mortalidade de 100% para *S. gregaria* aos 22 dias; de 45 a 65% para *Z. variegatus* aos 33 dias (insetos mantidos em laboratório)	Jenkins & Thomas, 1996
		Ninfas de *Hieroglyphus daganensis*	5,0 x 10^{11} conídios/ha (UBV, sobre insetos e/ou vegetação)	Mortalidade superior a 95% aos 22 dias	Thomas et al., 1998
		Ninfas de *Locustana pardalina*	Aplicação aérea de 2,0 x 10^{10} conídios/ha (UBV)	Mortalidade de 67 a 100% aos 21 dias (gafanhotos mantidos em laboratório); controle de 38 a 98% aos 21 dias. Ensaio de campo realizado na África do Sul	Price et al., 1997
		Ninfas e adultos de *H. daganensis*	7,5 x 10^{9} com/0,5g de amido de milho (isca)	Mortalidade de 88,3% aos 15 dias	Caudwel & Gatehouse, 1996
B. bassiana	GHA	Diversas	1,2 x 10^{11} conídios/ha (UBV, sobre inseto e/ou vegetação)	Mortalidade de 72% para gafanhotos mantidos em gaiolas por 2 semanas; não ocorreu redução populacional no campo. Ensaio de campo realizado em Mali	Johnson et al., 1994
		Principalmente ninfas de *Melanoplus sanguinipes*	2 x 10^{11} conídios/ha (isca)	Mortalidade chegou a 69,8% para gafanhotos coletados 2 dias após a aplicação e mantidos no laboratório; ligeira redução na densidade populacional. Ensaio de campo realizado no Canadá	Johnson & Goettel, 1993
Metarhizium spp.	Diversos	Ninfas da *S. gregaria*	4,0 x 10^{10} ou 10^{11} blastosporos/ha (UBV)	Mortalidade de 35 a 100% aos 18 dias	Stephan et al., 1996
V. lecanii	DAOM 179104	Ninfas de *Melanoplus* spp.	1,0 x 10^{7} e 1,0 x 10^{8} conídios/gaiola (pulverização) ou 0,25 e 2,5g farelo + micélio/gaiola (isca)	Mortalidade de 10 a 48% aos 15 dias	Johnson et al., 1988

M. anisopliae está sendo testado na Colômbia para controle de *R. schistocercoides*. A maioria das formulações testadas apresentou deficiências em relação à aderência e cobertura da folhagem e da cutícula dos insetos, reduzida dispersão e manutenção dos conídios em suspensão nos tanques de aplicação, além de baixa tolerância às condições adversas do meio ambiente, tais como radiação ultravioleta (A. M. Cotes, comunicação pessoal).

Os propágulos infectivos ou conídios de fungos entomopatogênicos, pertencentes ao grupo dos hifomicetos e utilizados em experimentos e programas de controle de gafanhotos, podem ser produzidos na superfície de meios líquidos, em substratos sólidos ou sistemas bifásicos. O sistema bifásico de fermentação líquida e sólida combina as vantagens dos dois sistemas e é bastante usado para produção de *B. bassiana* e *M. flavoviride*. Esse sistema é apropriado para laboratórios modestos, localizados em áreas afetadas por gafanhotos, como é feito na África para produção de *M. flavoviride*. O inóculo é produzido em meio líquido a base de subprodutos de extrato de levedura e sacarose, em frascos mantidos em agitador. Dois a três dias são suficientes para formação de uma biomassa que é transferida para o arroz parboilizado, previamente esterilizado por autoclavagem. Em seguida, adiciona-se água ao arroz, de modo a proporcionar um teor de umidade de 35-40% após a inoculação com o fungo. Esse sistema utiliza um quilo de arroz acondicionado em sacolas plásticas autoclaváveis que é transferido para bacias plásticas empilhadas. Dez dias depois, as bacias são abertas e empilhadas novamente, para secagem do material, durante 48h, em sala equipada com desumidificador. Os conídios são extraídos do arroz usando um extrator em ciclone e secos até atingir 5% de teor de umidade num dessecador. Os conídios podem então ser armazenados por períodos de 1 a 2 anos em forma de pó. Essa técnica permitiu a produção de quantidade suficiente de conídios para realização de experimentos em uma área de 1000ha na África (Jenkins & Goettel, 1997).

Recentemente, a empresa Mycotech Corporation desenvolveu um sistema de produção de *B. bassiana* em larga escala e tem buscado a comercialização de várias formulações. Seu primeiro bioinseticida, Mycocide GH®, foi registrado para comercialização nos Estados Unidos contra várias espécies de gafanhotos e grilos. Nesse sistema de produção, conídios de *B. bassiana* são produzidos em fermentadores

em meio sólido. O inóculo produzido em meio líquido é absorvido num substrato à base de amido, com injeção de oxigênio entre as partículas. Temperatura, umidade e aeração são controladas e podem ser otimizadas para cada isolado fúngico. Utilizando esse sistema, é possível produzir até $2,6x10^{13}$ conídios/kg de substrato, embora a produtividade varie de um lote para outro. O produto final é um pó seco que pode ser armazenado à temperatura ambiente por até 6 meses e pode ser facilmente formulado para aplicações a UBV. A Mycotech produz quantidade de fungos entomopatogênicos suficiente para o tratamento anual de 200.000 hectares, à taxa de $2,5x10^{13}$ conídios/ha (Bradley, 1996; Bradley et al., 1992). Esse sistema pode ser adaptado para outros patógenos com facilidade e é economicamente viável para produção em larga escala. Essa empresa utiliza fermentadores de 1500 litros para produção de inóculo líquido e bioreatores de 6 ou $19m^3$ contendo o meio de cultura sólido à base de amido e já conseguiu registro de *B. bassiana* para controle de gafanhotos nos Estados Unidos.

Termorregulação

Termorregulação refere-se à capacidade de controlar a temperatura corporal, independentemente da temperatura ambiental, através de mecanismos ativos de natureza fisiológica ou comportamental (Chappell & Whitman, 1990). Em função desse fenômeno, a temperatura corporal difere do que seria esperado se o inseto respondesse passivamente às alterações da temperatura externa. Acredita-se que a termorregulação fisiológica (= metabólica) observada em *S. gregaria*, por exemplo, esteja relacionada ao ajuste da temperatura toráxica, de forma a garantir um desempenho satisfatório durante os vôos de longa distância característicos dessa espécie (Heinrich, 1981, mencionado por Whitman, 1988). Através de comportamentos relacionados à postura e orientação corporal em relação à radiação solar e à seleção de microhabitats favoráveis, os gafanhotos são capazes de aumentar ou diminuir a taxa de absorção de energia radiante. De fato, para a maioria das espécies, os mecanismos comportamentais são os únicos disponíveis para o controle da temperatura corporal (Carruthers et al., 1992). Dados compilados por Chappell & Whitman (1990) mostram que temperaturas corporais observadas em condições naturais para 11 espécies de gafanhotos podem superar a temperatura ambiente em 7 a 18°C.

Os benefícios advindos da termorregulação estão relacionados principalmente à manutenção de limites favoráveis ao desenvolvimento da espécie, permitindo maior exploração do habitat, e outras vantagens, como a maior capacidade de fuga de predadores e parasitóides e uma redução do impacto de infecções causadas por patógenos. Entretanto, o papel da termorregulação como meio de defesa é controverso. Por exemplo, Carruthers et al. (1992) argumentam que a maior exposição durante os "banhos de sol" aumentaria as chances de predação por pássaros e outros inimigos naturais.

A influência da termorregulação na taxa de desenvolvimento é bem exemplificada pelo gafanhoto univoltino *Taeniopoda eques*. O ambiente desértico onde esse inseto ocorre oferece em média 692 graus-dia (GD) ao longo do período compreendido entre a eclosão (julho) e as geadas (outubro/novembro) que provocam a morte dos adultos. Para o desenvolvimento do gafanhoto são necessários 850GD e graças à termorregulação comportamental o déficit de 158GDs é compensado, garantindo, em última análise, a sobrevivência da espécie (Whitman, 1988).

O primeiro experimento a demonstrar a elevação da temperatura corporal de um gafanhoto em resposta à uma infecção microbiana foi conduzido por Boorstein & Ewald (1987). Após a administração oral do microsporídeo *N. acridophagus,* ninfas de *M. sanguinipes* selecionaram temperaturas por volta de 40°C, enquanto a temperatura preferencial dos insetos antes da inoculação e dos insetos do controle ao longo do experimento foi de 34°C. Após 28 dias, a taxa de sobrevivência de gafanhotos inoculados não diferiu daquela observada para o controle, embora o ganho de peso corporal tenha sido afetado. Em experimento com ninfas de *C. pellucida* tratadas com *E. grylli* (patótipo 1), a taxa de mortalidade para os insetos submetidos a 8h/dia de radiação solar artificial foi $< 1\%$ e para aqueles mantidos sob luz difusa, e portanto incapazes de termorregular, a mortalidade foi de aproximadamente 60%. Além disso, o período para a morte dos insetos infectados foi de 11 dias, no primeiro grupo e de 7 dias, para o último tratamento (Carruthers et al., 1992).

Ninfas de *M. sanguinipes*, infectadas por *B. bassiana* e submetidas a um gradiente calor, selecionaram temperaturas mais elevadas que aquelas do controle. A temperatura toráxica variou de 38 a 42°C para os indivíduos infectados e sendo a

temperatura máxima para a germinação e crescimento vegetativo de *B. bassiana* na faixa de 35 a 38°C, o desenvolvimento do fungo foi adversamente afetado. Em experimentos com exposição contínua a diversas temperaturas, observou-se que o desenvolvimento da doença não foi afetado para gafanhotos infectados e mantidos a 30°C, ao passo que em temperaturas de 35-40°C a incidência de micose foi <7%. A exposição diária a uma fonte de calor (lâmpada incandescente de 25W), por 6h, reduziu em 98% a incidência da doença (Inglis et al., 1996a).

A termorregulação em acridídeo de clima tropical, em resposta a uma infecção fúngica, foi demonstrada recentemente sob condições naturais (Blanford et al., 1998). A temperatura preferencial de *Oedaleus senegalensis* foi de 39°C, variando de 24°C, no período da manhã a 46°C, em períodos de elevadas insolação e temperatura ambiental; e para aqueles infectados por *M. flavoviride*, essa temperatura foi de aproximadamente 42°C. Trabalhos anteriores demonstraram que a temperatura ótima para germinação, crescimento hifal e esporulação do isolado IMI 330189 de *M. flavoviride* foi de 30, 27 e 25°C, respectivamente, embora em torno de 40°C ainda tenha sido observado um pequeno desenvolvimento do fungo (Thomas & Jenkins, 1997). Entretanto, a febre comportamental não afetou adversamente esse patógeno, pois a taxa de mortalidade de insetos infectados foi de 86%, após 21 dias. Esses resultados podem estar relacionados a diferentes fatores, como impossibilidade dos insetos manterem a temperatura corporal elevada por mais de 8h diárias, aparecimento de dias nublados que dificultam a elevação da temperatura corporal para limites desfavoráveis ao patógeno e impossibilidade do sistema imunológico superar a invasão de um número expressivo de estruturas fúngicas. Nesse caso, a febre comportamental poderia estar agindo no sentido de retardar o desenvolvimento da doença por tornar as condições desfavoráveis ao patógeno durante certo tempo. Segundo os autores, isso explicaria o maior tempo para a morte dos insetos observado em condições de campo e a sobrevivência de alguns insetos tratados (provavelmente aqueles que receberam uma menor carga de conídios sobre a cutícula).

A elevada temperatura corporal pode explicar, pelo menos parcialmente, resultados insatisfatórios obtidos em experimentos de campo com fungos entomopatogênicos, microsporídeos e possivelmente outros microrganismos. Tal

fenômeno pode ser um fator limitante ao emprego de determinados microrganismos em algumas regiões ou épocas do ano. Inglis et al. (1996b), por exemplo, observaram que em ensaios de campo realizados com *B. bassiana*, os melhores níveis de controle de gafanhotos são obtidos em épocas de temperaturas amenas. Estudos criteriosos que demonstrem a extensão da capacidade termorregulatória de acridídeos-praga e as exigências térmicas dos patógenos considerados para aplicação em nível de campo devem ser conduzidos no sentido de propiciar o estabelecimento de épocas do ano em que a aplicação de bioinseticidas tenha maior probabilidade de sucesso.

Segurança no emprego de patógenos de gafanhotos

O amplo espectro de hospedeiros de alguns microrganismos empregados no controle biológico de gafanhotos, associado à estratégia de utilização desses patógenos, normalmente através de liberações inundativas, tem causado certa apreensão quanto ao aparecimento de possíveis efeitos adversos sobre organismos não-alvo. Os riscos potenciais estão relacionados a reações alérgicas e toxicidade a vertebrados, incluindo o homem; patogenicidade a organismos não-alvo, afetando negativamente organismos benéficos e outros; e possibilidade de que a população do inseto-alvo seja totalmente dizimada, o que provocaria desequilíbrios no ecossistema (Goettel et al., 1990; Burges, 1981). Reações alérgicas, embora pouco comuns, estão em geral associadas a métodos inadequados de manuseio e aplicação, o que poderia ser evitado pela adoção de medidas simples de segurança, que, na realidade, são as mesmas recomendadas para produtos químicos. Embora controversa, muitos autores defendem a idéia que efeitos adversos oriundos da liberação de microrganismos agentes de controle biológico são pouco prováveis e, se ocorrerem, seriam de curta duração e pequeno impacto ecológico (Cook et al., 1996).

Dentre os inúmeros patógenos de gafanhotos, os fungos têm sido objeto de profundos debates acerca de riscos associados ao seu emprego. É importante distinguir entre os riscos relativos à liberação de espécies fúngicas em função do critério especificidade. A introdução de fungos altamente específicos, como por exemplo *E. grylli*, é potencialmente mais perigosa que a liberação de fungos com amplo espectro de hospedeiros (Goettel, 1994). De acordo com esse autor, esses

fungos, que normalmente têm uma distribuição geográfica mais restrita e estão associados a epizootias freqüentes, são excepcionalmente virulentos quando comparados àqueles com baixa especificidade (DL_{50} é uma ou duas potências menor), havendo, portanto, a possibilidade de danos severos a populações de insetos filogeneticamente próximos ao inseto-alvo.

Todos os patótipos de *E. grylli* são parasitas obrigatórios de ortópteros, mais especificamente de representantes da família Acrididae e, conseqüentemente, não são patogênicos a outros organismos (Carruthers et al., 1997). Entretanto, a introdução de *E. grylli* pode colocar em risco populações de gafanhotos benéficos, como aqueles que consomem preferencialmente plantas daninhas ou simplesmente acridídeos que não são considerados indesejáveis ao homem, mas que são elos relevantes da cadeia alimentar (Lockwood, 1993).

Quanto às espécies de fungos com maior espectro de hospedeiros e que são empregadas em programas de controle de gafanhotos, testes ecotoxicológicos têm evidenciado os efeitos deletérios sobre diversos artrópodes e mesmo vertebrados. Assim, efeitos adversos dos fungos *B. bassiana* e *Metarhizium* spp. sobre organismos não-alvo como abelhas (Butt et al., 1994; Vandenberg, 1990), coccinelídeos (James & Lighthart, 1994; Magalhães et al., 1988), crustáceos (Genthner et al., 1994), peixes (Genthner & Middaugh, 1995, 1992; Sherwood et al., 1994) e outros já foram relatados, sobretudo em testes realizados em condições de laboratório. Nesses testes, normalmente são empregadas doses excepcionalmente elevadas do patógeno e metodologias de aplicação que garantam uma exposição máxima do organismo-alvo, condições estas raramente satisfeitas em aplicações inundativas do patógeno a campo. Outros fatores, como o emprego de insetos estressados (Donegan & Lighthart, 1988) e a ausência de restrições ambientais ao desenvolvimento do patógeno (Roberts & Campbell, 1977), podem igualmente resultar em infecções que em situações reais não ocorreriam ou que poderiam acontecer em intensidade consideravelmente menor.

Isolados fúngicos em desenvolvimento, como bioinseticidas contra gafanhotos, têm sido avaliados sobre organismos não-alvo. Em experimentos laboratoriais com o isolado GHA de *B. bassiana* sobre a abelha *Megachile rotundata*, nas doses de 10^2, 10^4 e 10^6 conídios/pré-pupa, foram obtidos índices de mortalidade

de 0, 32 e 92%, respectivamente (Goerzen et al., 1990). Entretanto, em experimentos de campo com o emprego de gaiolas, a aplicação sobre as plantas de dose equivalente à recomendada para o controle de gafanhotos, seguida da liberação de *M. rotundata*, resultou em mortalidade inferior a 4% (Goettel & Johnson, 1994). A aplicação em laboratório de dose equivalente a $1,0 \times 10^{13}$ conídios/ha sobre ninfas de *M. sanguinipes* resultou na mortalidade de 72,5% dos indivíduos, ao passo que apenas 20,8% dos adultos do coleóptero *Tenebrio molitor* sucumbiram à infecção (Brinkman et al., 1997). Já em testes com embriões e larvas do peixe *Pimephales promelas*, o isolado GHA não provocou mortes ou evidências de infecção após exposição a $7,5 \times 10^{8}$ conídios/ml de suspensão (Collins et al., 1994). Em experimentos com aves não foram observados efeitos negativos provocados pelo isolado GHA (Althouse et al., 1997).

Os dados dos estudos moleculares já realizados com isolados de *M. flavoviride* sugerem alta homogeinidade e certa especificidade, o que tornaria esses isolados mais seguros para emprego em condições de campo (Driver et al., 1999; Bridge et al., 1997; Magalhães et al., 1997). Em laboratório, a aplicação de formulações oleosas e aquosas do isolado IMI 330189 em dose equivalente a 5×10^{12} conídios/ha resultou na mortalidade de 11% e 8% de adultos da abelha *Apis mellifera*, respectivamente (Ball et al., 1994). Por outro lado, a aplicação de produtos químicos (fenitrotion e os piretróides permetrina e resmetrina) em doses subletais aos gafanhotos resultou na morte de todas as abelhas tratadas. Quando avaliou-se a patogenicidade de outro isolado desse grupo, MfI 5, sobre inúmeros artrópodes não-alvo, não foram observados efeitos adversos (Peveling & Demba, 1997). Nesse mesmo estudo, o isolado fúngico mostrou-se altamente virulento a *S. gregaria*, e todos os inseticidas químicos avaliados foram deletérios aos artrópodes tratados.

Os riscos envolvidos com o emprego de isolados em desenvolvimento para o controle de gafanhotos-praga não devem ser ignorados. O isolado GHA de *B. bassiana*, pulverizado em dose equivalente àquela recomendada para emprego em campo, retardou o desenvolvimento de larvas do coccinelídeo *Serangium parcesetosum*, ao passo que adultos tiveram sua capacidade de predação reduzida em mais de 50% (Poprawski et al., 1998). O mesmo isolado foi avaliado sobre 5 artrópodes não-alvo, em testes conduzidos simultaneamente em Niger e Mauritânea (Peveling et al., 1994).

Nos testes laboratoriais realizados em Niger, praticamente não foram observadas infecções, ao passo que na Mauritânea a mortalidade de tenebrionídeos foi de 20-35% e superior a 90% para reduvídeos e aranhas. Em ambos os testes foi feita a inoculação tópica de doses elevadas do fungo, resultando em doses de, por exemplo, 5.000 conídios sobre o tenebrionídeo *Trachyderma hispida*. Nos testes realizados em condições de campo, com a aplicação de dose equivalente a $1,25 \times 10^{13}$ conídios/ha, não foram observados artrópodes infectados pelo fungo.

Com relação aos vírus entomopatogênicos e em função do modo de ação dos mesmos, que, dentre outros eventos, envolve a ingestão oral, dissolução dos corpos de inclusão em insetos com pH intestinal alcalino ou levemente ácido, como em gafanhotos, e a presença de receptores específicos na membrana plasmática do inseto hospedeiro, esse grupo de patógenos obrigatórios tem demonstrado elevada especificidade aos organismos-alvo. Apesar de apresentarem semelhanças com poxvírus de vertebrados, os EPVs distinguem-se pela presença dos corpos de inclusão de natureza protéica, além de serem capazes de replicação a 28°C (Erlandson & Streett, 1997; Souza & Lecuona, 1996). Foi demonstrado que o perfil das proteínas do entomopoxvírus de *M. sanguinipes* (MsEPV) difere substancialmente daquele de vertebrados (Langridge & Roberts, 1982) e testes com entomopoxvírus sobre vertebrados não têm demonstrado efeitos indesejáveis (Ignoffo, 1973). Apesar do MsEPV ter sido mencionado atacando o cupim *Reticulotermes flavipes* (Levin et al., 1993), as mortes só foram observadas quando os insetos ingeriram o vírus não-ocluso, situação artificial que não ocorreria em condições de campo. Além disso, o vírus não foi capaz de replicar no interior das células infectadas. Em experimentos com a abelha *M. rotundata*, a adição à dieta de 10^3 e 10^5 corpos de inclusão do MsEPV não resultou em efeito adverso (Goerzen et al., 1990). A inclusão de 4×10^8 corpos de inclusão/ml e 4×10^8 vírions/ml do mesmo vírus não diminuiu a longevidade e nem provocou sinais de infecção em *A. mellifera* (Vandenberg et al., 1990).

Quanto ao microsporídeo *N. locustae*, a patogenicidade desse organismo está restrita a membros da família Acrididae (Johnson, 1997). Em experimento com adultos de *A. mellifera*, não observou-se sinais de infecção até 26 dias após a ingestão de diferentes doses (50, 5×10^2, 5×10^3 ou 5×10^4) de esporos do patógeno (Menapace

et al., 1978). Da mesma forma, a injeção intra-hemocélica dos esporos não provocou infecção no camarão *Palaemonetes pugio* (Fournie et al., 1990). Ainda, a formulação tipo isca, empregada nos produtos comerciais à base de esporos de *N. locustae*, reduz consideravelmente a exposição de organismos não-alvo a esse patógeno, além de minimizar possíveis efeitos deletérios.

Efeitos negativos de nematóides entomopatogênicos sobre vertebrados nunca foram relatados em condições naturais (Bathon, 1996). Embora apresentem elevada polifagia em condições de laboratório, o espectro de hospedeiros em condições de campo é limitado por fatores como a distribuição temporal e espacial de organismos suscetíveis no solo onde ocorrem, rápida redução da densidade inicial após aplicação no campo e pequena capacidade de dispersão (Bathon, 1996). De acordo com este autor, até o momento não foram observados efeitos adversos sobre a fauna de artrópodos nos testes conduzidos com nematóides entomopatogênicos em condições de campo. O nematóide *S. scapterisci*, considerado para o controle de paquinhas na Flórida, é altamente específico a ortópteros e não tem causado danos à fauna do solo (Parkman & Smart, 1996; Parkman et al., 1994).

Concluindo, percebe-se uma grande segurança dos microrganismos entomopatogênicos empregados para o controle de gafanhotos-praga. Além disso, riscos potenciais podem ser praticamente eliminados, dependendo da formulação empregada e da estratégia de pulverização. São remotas as possibilidades de que aplicações direcionadas de patógenos sobre bandos de ninfas, por exemplo, acarretem efeitos negativos em populações de organismos não-alvo. Sem dúvida que a realização de testes ecotoxicológicos são relevantes e merecem a devida atenção daqueles envolvidos no desenvolvimento de bioinseticidas. Entretanto, deve-se salientar que os inseticidas químicos atualmente registrados para o combate de gafanhotos-praga são indubitavelmente mais prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana que quaisquer dos patógenos empregados no controle biológico desses insetos.

Controle microbiano de gafanhotos no Brasil

Na última década, várias espécies de gafanhotos têm se constituído em pragas agrícolas, em diferentes regiões brasileiras (Miranda et al., 1996; Cosenza et

al., 1994; Barrientos, 1993). As mais prejudiciais têm sido *S. pallens*, no Nordeste e *R. schistocercoides*, no Centro-Oeste, que atacam, entre outras plantas, gramíneas nativas, cana-de-açúcar, arroz e milho. A recorrência de seus surtos está relacionada com mudanças climáticas, principalmente variações pluviométricas interanuais (Miranda et al., 1996). No Nordeste, além de *S. pallens*, ocorre o *S. robusta*, que causa sérios danos à cultura do caju, entre outras. O impacto econômico do ataque dessas pragas está relacionado aos danos diretos causados nas culturas e ao custo de controle. Os agricultores, com a ajuda do Estado, têm tentado resolver o problema através da utilização de inseticidas químicos tradicionais. Essa prática é justificada pela alta e imediata mortalidade causada por esses produtos à população da praga. No entanto, a longo prazo, o problema tende a se agravar, principalmente pela eliminação de inimigos naturais, como parasitóides e predadores vertebrados e invertebrados.

Conseqüentemente, para um controle racional da praga, a alternativa mais sustentável e de maior viabilidade, do ponto de vista econômico e ambiental, seria o uso de agentes naturais de controle. Os inimigos naturais mais comuns de gafanhotos no Brasil são aves, insetos predadores e patógenos. No entanto, os fungos têm sido alvo de inúmeras pesquisas e desde o isolamento de *M. flavoviride*, CG 423, de *S. pallens* coletado no Rio Grande do Norte (Moreira et al., 1996), os seguintes estudos foram realizados: citologia e desenvolvimento de *M. flavoviride in vitro* (Xavier-Santos, 1995); processo de infecção de *M. flavoviride* sobre *R. schistocercoides* (Vicentini & Magalhães, 1996); infecção múltipla de *M. flavoviride*, *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre *R. schistocercoides* (Magalhães & Gama, 1995); compatibilidade entre bioinseticida e inseticida químico (Xavier-Santos et al., 1997); caracterização bioquímica e molecular de *M. flavoviride* (Valadares et al., 1996; Magalhães et al., 1997); transformação de *M. flavoviride* para resistência a benomil (Valadares-Inglis & Inglis, 1997); variabilidade genética entre populações de gafanhotos (Silveira et al., 1998); efeito da temperatura, teor inicial de água e substrato na produção de conídios de *M. flavoviride* (Magalhães & Frazão, 1996); viabilidade de *M. flavoviride* formulado em óleo vegetal (Magalhães et al., 1997); e consumo alimentar de *R. schistocercoides* infectado por *M. flavoviride* (Faria et al., 1999).

Em experimentos de campo em gaiolas, realizados em Campo Novo dos Parecis (MT), conídios do isolado CG 423 de *M. flavoviride* foram formulados em óleo de soja e querosene (5%) e aplicados a UBV sobre plantas de arroz, utilizando-se o equivalente a $2x10^{13}$ conídios/ha. Em seguida, 50 ninfas de quinto e sexto estádios de *R. schistocercoides* foram adicionadas às gaiolas. O patógeno causou 54% de mortalidade, aos 21 dias após tratamento (Magalhães, 1997). O mesmo formulado foi pulverizado diretamente sobre bandos de ninfas de segundo e terceiro estádios em novembro de 1998. A mortalidade estimada aos 14 dias após tratamento foi de 83% (B. Magalhães, M. Lecoq, M. Faria, F. Schmidt & W. Guerra, não publicado). As condições climáticas da região, caracterizadas por umidade elevada, temperaturas amenas e céu nublado com menor incidência de raios UV, favorecem a atuação do fungo. A implementação do uso de *M. flavoviride* como bioinseticida para o controle de *R. schistocercoides*, no Mato Grosso, deverá ser baseada na estratégia de controle preventivo de bandos de ninfas nas proximidades das lavouras, num raio de até 20km no máximo, como preconizado por Miranda et al. (1996). Essa idéia se baseia no fato de que o problema é local e que não se busca abaixar o nível das populações no conjunto de sua área de distribuição, mas sim estabelecer uma estratégia de controle integrado, permitindo o convívio com a praga.

Considerações finais

Dentre os patógenos de gafanhotos, os fungos certamente ocupam um lugar de destaque e apresentam condições de serem desenvolvidos como bioinseticidas eficientes. Embora os resultados de experimentos de campo em vários países com produtos a base de *M. flavoviride* e *B. bassiana* contra gafanhotos tenham sido satisfatórios, uma das maiores limitações ao uso desses patógenos é o tempo necessário para matar o inseto-alvo. Entretanto, apesar de seu modo de ação lento, os fungos provocam mudanças no comportamento do hospedeiro que podem favorecer as estratégias de controle. Insetos doentes apresentam menos mobilidade e consomem menos alimentos do que insetos sadios (Faria et al., 1999; Sieglaff et al., 1997). Outra vantagem da infecção fúngica é que ao diminuir a mobilidade do hospedeiro, este se torna mais vulnerável à ação de predadores. Ainda, conforme mencionado

anteriormente, o lento modo de ação do fungo não chega a ser um problema na estratégia de controle preventivo de *R. schistocercoides*, que ataca principalmente gramíneas nativa durante a fase ninfal.

Acredita-se que o desenvolvimento da estratégia de controle preventivo de bandos de ninfas nas proximidade das lavouras, como parte de um sistema de manejo integrado, seja viabilizado com o uso de bioinseticidas fúngicos, uma vez que na sua fase inicial de vida, nos três primeiros estádios, os insetos são mais vulneráveis ao patógeno. No entanto, o desenvolvimento comercial desses bioinseticidas no país esbarra em duas questões fundamentais. A primeira é aquela relacionada à produção semi-artesanal de fungos entomopatogênicos, atualmente praticada. Tal sistema de produção não tem condições de, em curto espaço de tempo, responder a uma demanda elevada de bioinseticidas para o controle de gafanhotos. A segunda está relacionada com a possibilidade de se dispor de um produto final estável à temperatura ambiente, durante um ano pelo menos, de modo a evitar que as fábricas de bioinseticidas continuem a produzir quase que exclusivamente sob encomenda, e garantindo ao usuários um produto de boa viabilidade, mesmo após situações de transporte e armazenamento nem sempre apropriadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Dra. Myrian S. Tigano, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela revisão crítica do manuscrito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTHOUSE, C.M.; PETERSEN, B.E.; McEWEN, L.C. Effects of young American kestrels (*Falco sparvericus*) exposed to *Beauveria bassiana* bioinsecticide. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.59, p.507-512, 1997.

BAIRD, R. Field experiments with *Pseudomonas aeruginosa* (Schröeter) Migula to control grasshoppers. **Canadian Entomologist**, v.90, p.89-91, 1958.

BAKER, G.L.; CAPINEIRA, J.L. Nematodes and nematomorphs as control agents of grasshoppers and locusts. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.171, p.157-211, 1997.

BALL, B.V.; PYE, B.J.; CARRECK, N.L.; MOORE, D.; BATEMAN, R.P. Laboratory testing of a mycopesticide on non-target organisms: the effects of an oil formulation of *Metarhizium flavoviride* applied do *Apis mellifera*. **Biocontrol Science and Technology**, v.4, p.289-296, 1994.

BARRIENTOS, L. Orthopteros plaga de Brasil. **Biottam**, v.5, n.1, p.33-42, 1993.

BATEMAN, R. The development of a mycoinsecticide for the control of locusts and grasshoppers. **Outlook on Agriculture**, v.26, n.1, p.13-18, 1997.

BATEMAN, R.P.; CAREY, M.; MOORE, D.; PRIOR, C. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. **Annals of Applied Biology**, v.122, n.7, p.145-152, 1993.

BATHON, H. Impact of entomopathogenic nematodes on non-target hosts. **Biocontrol Science and Technology**, v.6, p.421-434, 1996.

BENINTENDE, G.; MARQUEZ, A. Bactérias entomopatógenas. In: LECUONA, R.E. ed. **Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga**. Buenos Aires: Talleres Gráficos Mariano Mas, 1996. p.61-72.

BIDOCHKA, J.M.; KHACHATOURIANS, G.G. Microbial and protozoan pathogens of grasshoppers and locust as potential biocontrol agents. **Biocontrol Science and Technology**, v.1, p.243-259, 1991.

BIDOCHKA, J.M.; McDONALD, M.A.; ST. LEGER, R.J.; ROBERTS, D.W. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetics**, n. 21, p.107-113, 1994.

BLANFORD, S.; THOMAS, M.B; LANGEWALD, J. Behavioural fever in the Senegalese grasshopper, *Oedaleus senegalensis*, and its implications for biological control using pathogens. **Ecological Entomology**, v.23, p.9-14, 1998.

BOMAR, C.R.; LOCKWOOD, J.A.; POMERINKE, M.A.; FRENCH, J.D. Multiyear evaluation of the effects of *Nosema locustae* (Microsporida: Nosematidae) on rangeland grasshopper (Orthoptera: Acrididae) population density and natural biological controls. Environmental Entomology, **v.22, p.489-497, 1993**.

BOORSTEIN, S.M.; EWALD, P.W. Costs and benefits of behavioral fever in *Melanoplus sanguinipes* infected by *Nosema acridophagus*. **Physiological Zoology**, v.60, n.5, p.586-595, 1987.

BRADLEY, C.A. Mycotech expands production capability. **SIP Newsletter**, v.28, n.1, p.29-30, 1996.

BRADLEY, C.A.; BLACK, W.E.; KEARNS, R.; WOOD, P. Role of production technology in mycoinsecticide development. In: LEATHAM, G.F., ed. **Frontier in industrial mycology**. New York: Chapmann and Hall, 1992. p.160-173.

BRAUN, L.; EWEN, A.B., GILLOTT, C. The life cycle and ultrastructure of *Malameba locustae* (King & Taylor) (Amoebidae) in the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes* (F.) (Acrididae). **Canadian Entomologist**, v.120, p.759-772, 1988.

BRIDGE, P.D.; PRIOR, C.; SOGBOHAN, J.; LOMER, C.M.; CAREY, M.; BUDDIE, A. Molecular characterization of isolates of *Metarhizium* from locusts and grasshoppers. **Biodiversity and Conservation**, v.5, p.177-189, 1997.

BRINKMAN, M.A.; FULLER, B.W.; HILDRETH, B. Effect of *Beauveria bassiana* on migratory grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) and nontarget yellow mealworms (Coleoptera: Tenebrionidae) in spraytower bioassays. **Journal of Agricultural Entomology**, v.14, n.2, p.121-27, 1997.

BROOKS, W.M. Entomogenous protozoa and fungi. In: IGNOFFO, C.M., ed. **CRC handbook of natural pesticides**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.1-149.

BUCHER, G.E. Bacteria of grasshoppers of western Canada: III. Frequency of occurrence, pathogenicity. **Journal of Insect Pathology**, v.1, p.391-405, 1959.

BUCHER, G.E. Nonsporulating bacterial pathogens. In: STEINHAUS, E.A. ed. **Insect pathology**: an advanced treatise. New York: Academic Press, 1963. p.117-147.

BUCHER, G.E.; STEPHENS, J.M. A disease of grasshoppers caused by bacterium *Pseudomonas aeruginosa* (Schröeter) Migula. **Canadian Journal of Microbiology**, v.3, p.611-625, 1957.

BURGERJON, A.; GRISON, P; KACHKOULI, A. Activity of the heat-stable toxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Locusta migratoria* (Linnaeus) (Locustidae, Orthoptera). **Journal of Insect Pathology**, v.1, p.381-383, 1964.

BURGES, H.D. Safety, safety testing and quality control of microbial pesticides. In: BURGES, H.D., ed. **Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980**. London: Academic Press, 1981. p.737-767.

BUTT, T.M.; IBRAHIM, L.; BALL, B.V.; CLARK, S.J. Pathogenicity of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. **Biocontrol Science and Technology**, v.4, p.207-214, 1994.

CANNING, E.U. A new microsporidian, *Nosema locustae* n.sp. from the fat body of the African migratory locust, *Locusta migratoria migratoroides* R. & F. **Parasitology**, v.43, p.287-290, 1953.

CANNING, E.U. The pathogenicity of *Nosema locustae* Canning. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.4, p.248-256, 1962.

CANNING, E.U. Microsporida. In: KREIER, J.P., ed. **Parasitic protozoa**. New York: Academic Press, 1977. p.155-196.

CARRUTHERS, R.I.; LARKIN, T.S.; FIRSTENCEL, H. Influence of thermal ecology on the mycosis of a rangeland grasshopper. **Ecology**, v.73, n.1, p.190-204, 1992.

CARRUTHERS, R.I.; RAMOS, M.E.; LARKIN, T.S.; HOSTETTER, D.L.; SOPPER, R.S. The *Entomophaga grylii* (Fresenius) Batko species complex: its biology, ecology, and use for biological control of pest grasshoppers. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.171, p.329-353, 1997.

CASTELO BRANCO JR., A. Protozoários entomopatogênicos. In: ALVES, S.B., ed. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ / USP, 1998. p.571-603.

CAUDWELL, R.W.; GATEHOUSE, A.G. Laboratory and field trials of bait formulations of the fungal pathogen, *Metarhizium flavoviride*, against a tropical grasshopper and locust. **Biocontrol Science and Technology**, v.6, p.561-567, 1996.

CHAPPELL, M.A.; WHITMAN, D.W. Grasshopper thermoregulation. In: CHAPMAN, R.F.; JOERN, A., ed. **Biology of grasshoppers**. New York: Wiley Interscience, 1990. p.143-157.

CLARK, T.B. Entomopoxvirus-like particles in three species of bumblebees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.39, p.119-122, 1982.

COLGAN, D.J. Studies of the mortality of *Locusta migratoria* (L.) treated with a polyhedrosis virus from the grasshopper *Caledia captiva* (F.) (Orthoptera: Acrididae). **Bulletin of Entomological Research**, v.76, p.539-544, 1986.

COLLINS, M.K.; JARONSKI, S.T.; BRADLEY, C. *Beauveria bassiana* (Bb GHA 1991) - evaluation of potential embryo-larval toxicity and pathogenicity to fathead minnow (*Pimephales promelas*) under static renewal conditions. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 27., 1994, Montpellier, France. **Proceedings**. Montpellier: Society for Invertebrate Pathology, 1994. v.2. p.117-118.

COOK, R.J.; BRUCKHART, W.L.; COULSON, J.R.; GOETTEL, M.S.; HUMBER, R.A.; LUMSDEN, R.D.; MADDOX, J.V.; McMANUS, M.L.; MOORE, L.; MEYER, S.F.; QUIMBY JR., P.C.; STACK, J.P.; VAUGHN, J.L. Safety of microorganisms

intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. **Biological Control**, v.7, p.333-351, 1996.

COSENZA, G.W., RIBEIRO, J.G.B.; CARVALHO, J.S. **Programa nacional de controle ao gafanhoto**: manual técnico. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 34p.

CRAIG, S.M.; WEBSTER, J.M. Inhibition of molting of the desert locust, *Schistocerca gregaria*, by the nematode parasite *Mermis nigrescens*. **Canadian Journal of Zoology**, v.52, p.1535-1539, 1974.

DIAS, J.M.C. de. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, p.59-76, 1992.

DONEGAN, K.; LIGHTHART, B. Effects of several stress factors on the susceptibility of the predatory insect, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae), to the fungal pathogen *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.54, p.79-84, 1988.

DRIVER, F.; MILNER, R.; TRUEMAN, J. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on sequence analysis of ribosomal DNA. **Mycological Research**, 1999. (No prelo).

ERLANDSON, M.A.; STREETT, D.A. Entomopoxviruses associated with grasshoppers and locusts: biochemical characterization. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.171, p.131-146, 1997.

EWEN, A.B., MUKERJI, M.K. Evaluation of *Nosema locustae* (Microsporida) as a control agent of grasshopper populations in Saskatchewan. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.35, p.295-303, 1980.

FARIA, M.R. de; MAGALHÃES, B.P. Bioassay of *Metarhizium flavovoride* against the grasshopper Rhammatocerus schistocercoides. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 26., 1993, Asheville, NC, USA. **Abstracts**. Asheville: Society for Invertebrate Pathology, 1993. p.37.

FARIA, M.R.; ALMEIDA, D.O.; MAGALHÃES, B.P. Food consumption of *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn (Orthoptera: Acrididae) infected by the fungus *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, n.1, p.65-73, 1999.

FOURNIE, J.W.; FOSS, S.S.; COURTNEY, L.A.; UNDEEN, A.H. Testing of insect microsporidians (Microspora: Nosematidae) in nontarget aquatic species. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.8, p.137-144, 1990.

GENTHNER, F.J.; CRIPE, G.M.; CROSBY, D.J. Effect of *Beauveria bassiana* and its toxins on *Mysidopsis bahia* (Mysidacea). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.26, p.90-94, 1994.

GENTHNER, F.J.; MIDDAUGH, D.P. Effects of *Beauveria bassiana* on embryos of the inland silverside fish (*Menidia beryllina*). **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.9, p.2840-2845, 1992.

GENTHNER, F.J.; MIDDAUGH, D.P. Nontarget testing of an insect control fungus: effects of *Metarhizium anisopliae* on developing embryos of the inland silverside fish *Menidia beryllina*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.22, p.163-171, 1995.

GLASER, R.W. A systematic study of the organisms distributed under the name *Cocobacillus acridiorum* d'Herelle. **Annals of the Entomological Society of America**, v.11, p.19-42, 1918.

GOERZEN, D.W.; ERLANDSON, M.A.; MOORE, K.C. Effects of two insect viruses and two entomopathogenic fungi on larval and pupal development in the alfalfa leafcutting bee, *Megachile rotundata* (FAB.) (Hymenoptera: Megachilidae). **Canadian Entomologist**, v.122, p.1039-1040, 1990.

GOETTEL, M.S. Host range and specificity in relation to safety of exotic fungi. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 27., Montpellier, France. **Proceedings**. Montpellier: Society for Invertebrate Pathology, 1994. v.1. p.325-329.

GOETTEL, M.S.; JOHNSON, D.L. Environmental impact and safety of fungal biocontrol agents. In: LOMER, C.J.; PRIOR, C., ed. **Biological control of locusts and grasshoppers**. Wallingford: CAB International / IITA, 1994. p.356-361.

GOETTEL, M.S.; POPRAWSKI, T.J.; VANDENBERG, J.D.; LI, Z.; ROBERTS, D.W. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: LAIRD, M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W., ed. **Safety of microbial insecticides**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.209-231.

GORDON, R.; WEBSTER, J.M.; HISLOP, T.G. Mermithid parasitism, protein turnover and vitellogenesis in the desert locust, *Schistocerca gregaria* Forkäl. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.46B, p.575-593, 1973.

GREATHEAD, D.J. Biological control as a potential tool for locust and grasshopper control. In: LOMER, C.J.; PRIOR, C., ed. **Biological control of locusts and grasshoppers**. Wallingford: CAB International / IITA, 1992. p.4-7.

GRIFFITHS, J.; BATEMAN, R. Evaluation of the Francome MkII exhaust nozzle sprayer to apply oil-based formulations of *Metarhizium flavoviride* for locust control. **Pesticide Science**, v.51, p.176-184, 1997.

HARPER, A.M.; HUANG, H.C. Evaluation of the entomophagous fungus *Verticillium lecanii* (Moniliales: Moniliacea) as a control agent for insects. **Environmental Entomology**, v.15, p.281-284, 1986.

HENRY, J.E. Control of insects by protozoa. In: BAKER, R.R.; DUN, P.E., ed. **New directions in biological control**: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. New York: Alan R. Liss, 1990. p.161-76.

HENRY, J.E. Effect of grasshopper species, cage density, light intensity, and method of inoculation on mass production of *Nosema locustae* (Microspora: Nosematidae). **Journal of Economic Entomology**, v.78, p.1245-50, 1985.

HENRY, J.E. *Nosema acridophagus* sp.n, a microsporidian isolated from grasshoppers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.9, p.331-341, 1967.

HENRY, J.E. *Nosema cuneatum* sp.n., in grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.17, p.164-71, 1971.

HENRY, J.E.; JUTILA, J.W. The isolation of a polyhedrosis virus from a grasshopper. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.8, p.417-418, 1966.

HENRY, J.E.; LANGE, C.E. Utilización de protistas entomopatógenos. In: LECUONA, R.E., ed. **Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga**. Buenos Aires: Talleres Gráficos Mariano Mas, 1996. p.277-278.

HENRY, J.E.; OMA, E.A. Effect of prolonged storage of spores on field applications of *Nosema locustae* (Microsporida: Nosematidae) against grasshoppers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.23, p.371-377, 1974.

HENRY, J.E.; OMA, E.A. Pest control by *Nosema locustae*, a pathogen of grasshoppers and crickets. In: BURGES, H.D., ed. **Microbial control of pests and plants diseases**. New York: Academic Press, 1981. p.573-586.

HENRY, J.E.; NELSON, B.P.; JUTILA, J.W. Pathology and development of the grasshopper inclusion body virus in *Melanoplus sanguinipes*. **Journal of Virology**, v.3, p.605-610, 1969.

HENRY, J.E.; OMA, E.A.; ONSAGER, J.A. Relative effectiveness of ULV spray applications of spores of *Nosema locustae* against grasshopper. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.34, p.125-132, 1978.

HENRY, J.E.; OMA, E.A.; ONSAGER, J.A.; OLDACRE, S.W.O. Infection of corn earworm, *Heliothis zea*, with *Nosema acridophagus* and *Nosema cuneatum* from grasshoppers: relative virulence and production of spores. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.34, p.125-132, 1979.

HERELLE, F. Le cocobacille des sauterelles. **Annales Institut Pasteur**, v.28, p.280-328, 1914.

HOOPER, G.H.S.; MILNER, R.J.; SPURGIN, P.A.; PRIOR, C. Initial field assessment of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for control of *Chortoicetes terminifera* (Walker) (Orthoptera: Acrididae). **Journal of the Australian Entomological Society**, v.34, p.83-84, 1995.

IGNOFFO, C.M. Effects of entomopathogens on vertebrates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.214, p.141-164, 1973.

INGLIS, G.D.; JOHNSON, D.L.; GOETTEL, M.S. Effects of temperature and thermoregulation on mycosis by *Beauveria bassiana* in grasshoppers. **Biological Control**, v.7, p.131-139, 1996a.

INGLIS, G.D.; JOHNSON, D.L.; GOETTEL, M.S. Effect of bait substrate and formulation on infection of grasshopper nymphs by *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, p.35-50, 1996b.

INGLIS, G.D.; JOHNSON, D.L.; GOETTEL, M.S. An oil-bait bioassay method used to test the efficacy of *Beauveria bassiana* against grasshoppers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.67, p.312-315, 1996c.

INGLIS, G.D.; JOHNSON, D.L.; GOETTEL, M.S. Field and laboratory evaluation of two conidial batches of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin against grasshoppers. **Canadian Entomologist**, v.129, p.171-186, 1997.

ISSI, I.V.; KRYLOVA, S.V. Locust microsporidia. In: NIKITINA, M.S., ed. **Saranchovye – ekologiya i mery bor'by**. Leningrado: VNIIZR, 1987. p.58-62.

JARONSKI, S.T.; GOETTEL, M.S. Development of *Beauveria bassiana* for control of grasshoppers and locusts. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.171, p.225-237, 1997.

JAMES, R.R.; LIGHTHART, B. Susceptibility of the convergent lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) to four entomogenous fungi. **Environmental Entomology**, v.23, n.1, p.190-192, 1994.

JEFFS, L.B.; FENG, M-G.; FALKOWSKY, J.E.; KHACHATOURIANS, G.G. Infection of the migratory grasshopper (Orthoptera: Acrididae) by ingestion of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Economic Entomology**, v.90, n.2, p.383-390, 1997.

JENKINS, N.E.; GOETTEL, M.S. Methods for mass production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.171, p.37-48, 1997.

JENKINS, N.E.; THOMAS, M.B. Effect of formulation and application method on the efficacy of aerial and submerged conidia of *Metarhizium flavoviride* for locust and grasshopper control. **Pesticide Science**, v.46, p.299-306, 1996.

JOHNSON, D.L. Nosematidae and other Protozoa as agents for control of grasshoppers and locusts: current status and prospects. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.171, p.375-389, 1997.

JOHNSON, D.L.; DOLINSKI, M.G. Attempts to increase the prevalence and severity of infection of grasshoppers with the entomopathogen *Nosema locustae* Canning (Microsporida: Nosematidae) by repeated field application. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.171, p.391-400, 1997.

JOHNSON, D.L.; GOETTEL, M.S. Reduction of grasshopper populations following field application of the fungus *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, v.3, p.165-175, 1993.

JOHNSON D.L.; GOETTEL, M.S.; BRADLEY, C. Field trials with *Beauveria bassiana* against grasshoppers in Mali, West Africa. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 24., 1991, Flagstaff, Arizona, EUA. **Abstracts**. Flagstaff: Society for Invertebrate Pathology, 1991. p.109.

JOHNSON, D.L.; GOETTEL, M.S.; BRADLEY, C.; PAAUW, H. VAN DER; MAIGA, B. Field trials with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against grasshoppers in Mali, West Africa, July, 1990. In: LOMER, C.J.; PRIOR, C., ed. **Biological control of locusts and grasshoppers**. Wallingford: CAB International / IITA, 1994. p.296-310.

JOHNSON, D.L.; HUANG, H.C.; HARPER, A.M. Mortality of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) inoculated with a Canadian isolate of the fungus *Verticillium lecanii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.52, p.335-342, 1988.

KHACHATOURIANS, G.G. Virulence of five *Beauveria* strains, *Paecilomyces farinosus*, and *Verticillium lecanii* against the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.59, p.212-214, 1992.

KRIEG, A. Diseases caused by bacteria and other prokaryotes. In: FUXA, J.R.; TANADA, Y. ed. **Epizootiology of insects diseases**. New York: John Wiley & Sons, 1987. p.323-355.

KRIEG, A.; LANGENBRUCH, G.A. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In: BURGES, H.D. ed. **Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980**. London: Academic Press, 1981. p.837-896.

KRIEG, A.; HUGER, A.; LANGENBRUCH, G.A.; SCHNETTER, W. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: a new pathotype effective against larvae of Coleoptera. **Journal of Applied Entomology**, v.96, p.500-508, 1983.

LANGE, C.E. A new species of *Perezia* (Microspora) from de Argentine grasshopper *Dichroplus elongatus*. **Journal of Protozoology**, v.34, p.34-39, 1987.

LANGE, C.E. Espectro hospedador natural y persistencia de *Perezia dichroplusae* Lange y *Nosema locustae* Canning (Protozoa: Microspora) en acridios argentinos (Orthoptera: Acrididae). **Neotropica**, v.38, n.99, p.65-74, 1992.

LANGE, C.E. Histopathology in the malpighian tubules of *Dichroplus elongatus* (Orthoptera: Acrididae) infected with *Perezia dichroplusae* (Microspora: Pereziidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.50, p.43-46, 1987.

LANGE, C.E. Protistas patógenos de insectos terrestres. In: LECUONA, R.E., ed. **Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga**. Buenos Aires: Talleres Gráficos Mariano Mas, 1996. p.87-104.

LANGE, C.E; STREETT, D.A. Susceptibility of Argentine melanoplines (Orthoptera: Acrididae) to entomopoxviruses (Entomopoxvirinae) from North American and African Grasshoppers. **Canadian Entomologist**, v.125, p.1127-1129, 1993.

LANGE, C.E.; WITTENSTEIN, E. Susceptibilidad de la langosta *Schistocerca cancelata* (Orthoptera: Acrididae) a diferentes entomopatógenos. **Revista da Sociedade Entomológica Argentina**, v.57, p.19-22, 1998.

LANGE, C.E.; BRITO, J.M.; HENRY, J.E. Characteristics of a microsporidium (Protozoa: Microspora) infecting grasshoppers (Orthoptera: Pyrgomorphidae) en Cape Verde, Africa. **Journal of Protozoology**, v.39, p.494-98, 1992.

LANGE, C.E.; MACVEAN, C.M.; HENRY, J.E.; STREETT, D.A. *Heterovesicula cowani* n.g.n.sp. (Heterovesiculidae n.fam.), a microsporidian parasite of Mormon crickets, *Anabrus simples* Haldeman, 1852 (Orthoptera: Tettigoniidae). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.42, p.552-558, 1995.

LANGE, C.E.; BECNEL, J.J.; RAZAFINDRATIANA, E.; PRZYBYSZEWSKI, J.; RAZAFINDRAFARA, H. *Johenrea locustae* n.g., n.sp. (Microspora: Glugeidae): a pathogen of migratory locusts (Orthoptera: Acrididae: Oedipodinae) from Madagascar. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.68, p.28-40, 1996.

LANGEWALD, J.; THOMAS, M.B.; DOURO-KPINDOU, O-K.; LOMER, C.J. Use of *Metarhizium flavoviride* for control of *Zonocerus variegatus*: a model, linling dispersal and secondary infection from the spray residue with mortality in caged field samples. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.82, p.1-8, 1997.

LANGRIDGE, W.H.R.; ROBERTS, D.W. Structural proteins of *Amsacta moorei*, *Euxoa auxiliaris*, and *Melanoplus sanguinipes* entomopoxviruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.39, p.346-353, 1982.

LAVIGNE, R.J.; PFADT, R.E. The role of rangeland grasshoppers as scavengers. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.61, p.379-387, 1964.

LEVIN, D.B.; ADACHI, D.; WILLIAMS, L.L.; MYLES, T.G. Host specificity and molecular characterization of the entomopoxvirus of the lesser migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.62, p.241-247, 1993.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH III, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKY,G.; SPRAGUE, V.; VÁVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the protozoa. **Journal of Protozoology**, v.27, p.37-58, 1980.

LOBO-LIMA, M.L.; BRITO, J.M.; HENRY, J.E. Biological control of grasshoppers in the Cape Verde islands. In: LOMER, C.J.; PRIOR, C., ed. **Biological control of grasshoppers and locusts**. London: CAB International, 1992. p.287-295.

LOCKWOOD, J.A. Environmental issues involved in biological control of rangeland grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) with exotic agents. **Environmental Entomology**, v.22, n.3, p.503-518, 1993.

LOCKWOOD, J.A. Ontogeny of cannibalism in rangeland grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.62, n.4, p.534-541, 1989.

LOCKWOOD, J.A.; DEBREY, L.D. Direct and indirect effects of a large scale application of *Nosema locustae* (Microsporida: Nosematidae) on rangeland grasshoppers (Orthoptera: Acrididade). **Journal of Economic Entomology**, v.83, p.377-383, 1990.

LOMER, C.J.; PRIOR, C.; KOOYMAN, C. Development of *Metarhizium* spp. for the control of grasshopers and locusts. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.171, p.265-286, 1997.

MAGALHÃES, B.P. Microbial control of grasshoppers in Brazil with the use of entomopathogenic fungi. In: MARTINS, M.T.; SATO, M.I.Z.; TIEDJE, J.M.; HAGLER, L.C.N.; DOBEREINER, J.; SANCHEZ, P.S., ed. **Progress in microbial ecology**. Santos: SBM / ICOME, 1997. p.429-433.

MAGALHÃES, B.P.; FRAZÃO, H.S. Effects of temperature, water content and substrate on conidial production of *Metarhizium flavoviride*. **Revista de Microbiologia**, v.27, p.242-246, 1996.

MAGALHÃES, B.P.; GAMA, G.B.M.N. Interação entre fungos entomopatogênicos e o gafanhoto *Rhammatocerus schistocercoides*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 15., 1995, Caxambu, MG. **Resumos**. Lavras: ESAL / Sociedade Entomológica do Brasil, 1995. p.389.

MAGALHÃES, B.P.; FARIA, M.R.; FRAZÃO, H.S. A technique to estimate the conidial viability of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (Hyphomycetes) formulated in vegetable oil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, p.569-572, 1997.

MAGALHÃES, B.P.; FARIA, M.R.; TIGANO, M.S.; SOBRAL, B.W.S. Characterization and virulence of a Brazilian isolate of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (Hyphomycetes). **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.171, p.313-321, 1997.

MAGALHÃES, B.P.; LORD, J.C.; WRAIGHT, S.P.; DAOUST, S.P.; ROBERTS, D.W. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Zoophthora radicans* to the coccinellid predators *Coleomegilla maculata* and *Eriopis connexa*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.52, p.471-473, 1988.

McGUIRE, M.R.; STREETT, D.A.; SHASHA, B.S. Evaluation of starch encapsulation for formulation of grasshopper (Orthoptera: Acrididae) entomopoxviruses. **Journal of Economic Entomology**, v.84, n.6, p.1652-1656, 1991.

McLAUGHLIN, R.E. Use of protozoans for microbial control of insects. In: BURGES, H.D.; HUSSEY, N.W. ed. **Microbial control of insects and mites**. New York: Academic Press, 1971. p.151-172.

MENAPACE, D.M.; SACKETT, R.R.; WILSON, W.T. Adult honey bees are not susceptible to infection by *Nosema locustae*. **Journal of Economic Entomology**, v.71, n.2, p.304-306, 1978.

MILNER, R.J. *Metarhizium flavoviride* (F1985) as a promising mycoinsecticide for Australian acridids. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.171, p.287-300, 1997.

MILNER, R.J.; PRIOR, C. Susceptibility of the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera*, and the wingless grasshopper, *Phaulacridium vittatum*, to the fungi *Metarhizium* spp. **Biological Control**, v.4, p.132-137, 1994.

MILNER, R.J.; STAPLES, J.A.; PRIOR, C. Laboratory susceptibility of *Locusta migratoria* (L.), *Austracris guttulosa* (Walker) and *Valanga irregularis* (Walker) (Orthoptera: Acrididae) to an oil formulation of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Australian Journal of Entomology**, v.35, p.355-360, 1996.

MILNER, R.J.; BAKER, G.L.; HOOPER, G.H.S.; PRIOR, C. Development of a mycoinsecticide for the Australian plague locust. In: KRALL, S.; PEVELING, R.; DIALLO, D.B., ed. **New strategies in locust control**. Boston: Birkhäuser Verlag, 1997. p.177-183.

MILNER, R.J.; HARTLEY, T.R.; LUTTON, G.G.; PRIOR, C. Control of *Phaulacridnium vittatum* (Sjöstedt) (Orthoptera: Acrididae) in field cages using an oil-based spray of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of the Australian Entomological Society**, v.33, p.165-167, 1994.

MIRANDA, E.E.; LECOQ, M.; PIEROZZI JR., I.; DURANTON, F. F.; BATISTELLA, M. **O gafanhoto do Mato Grosso:** balanço e perspectivas de 4 anos de pesquisas. 1992-1996. Campinas / Montpellier: EMBRAPA-NMA / CIRAD-GERDAT-PRIFAS, 1996. 146p.

MIRANPURI, G.S.; ERLANDSON, M.A.; GILLESPIE, J.P.; KHACHATOURIANS, G.G. Changes in hemolymph of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*, infected with an entomopoxvirus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.60, p.274-282, 1992.

MOREIRA, M.A.; MAGALHÃES, B.P.; VALADARES M.C.C.; CHAGAS, M.C.M. Occurrence of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (Hyphomycetes) on *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) in Rio Grande do Norte, Brazil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.25, p.359-361, 1996.

MORRIS, O.N. Susceptibility of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* (Orthoptera: Acrididae), to a mixture of *Nosema locustae* (Microspora: Nosematidae) and chemical insecticides. **Canadian Entomologist**, v.117, p.131-6, 1985.

OLFERT, O.; ERLANDSON, M.A. Wheat foliage consumption by grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) infected with *Melanoplus sanguinipes* entomopoxvirus. **Environmental Entomology**, v.20, n.6, p.1720-1724, 1991.

OMA, E.A.; STREETT, D.A. Production of a grasshopper entomopoxvirus (Entomopoxvirinae) in *Melanoplus sanguinipes* (F.) (Orthoptera: Acrididae). **Canadian Entomologist**, v.125, p.1131-1133, 1993.

PARKMAN, J.P.; SMART Jr., G.C. Entomopathogenic nematodes, a case study: introduction of *Steinernema scapterisci* in Florida. **Biocontrol Science and Technology**, v.6, p.313-419. 1996.

PARKMAN, J.P.; FRANK, J.H.; NGUYEN, K.B.; SMART Jr., G.C., Inoculative release of *Steinernema scapterisci* (Rhabditida: Steinernematidae) to suppress pest mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae) on golf courses. **Environmental Entomology**, v.23, p.1331-1337, 1994.

PEVELING, R.; DEMBA, A. Virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal and toxicity of diflubenzuron, fenitrothion-esfenvalerate and profenofos-cypermethrin to nontarget arthropods in Mauritania. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.32, p.69-79, 1997.

PEVELING, R.; WEYRICH, J.; MÜLLER, P. Side-effects of botanicals, insect growth regulators and entomopathogenic fungi on epigeal non-target arthropods in locust control. In: KRALL, S.; WILPS, H., ed. **New trends in locust control:** ecotoxicology, botanicals, pathogens, attractants, hormones, pheromones, remote sensing. Eschborn: GTZ, 1994. p.147-176.

POPRAWSKI, T.J.; LEGASPI, J.C.; PARKER, P.E. Influence of entomopathogenic fungi on *Serangium parcesetosum* (Coleoptera: Coccinellidae), an important predator of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). **Biological Control**, v.27, n.3, p.785-795, 1998.

PRICE, R.E.; BATEMAN, R.P.; BROWN, H.D.; BUTLER, E.T.; MÜLLER, E.J. Aerial spray trials against brown locust (*Locustana pardalina*, Walker) nymphs in South Africa using oil-based formulations of *Metarhizium flavoviride*. **Crop Protection**, v.16, n.4, p.345-351, 1997.

PRIOR, C.; GREATHEAD, D.J. Biological control of locusts: the potential for the exploitation of pathogens. **FAO Plant Protection Bulletin**, v.37 p.37-48, 1989.

PRIOR, C.; STREETT, D.A. Strategies for the use of entomopathogens in the control of the desert locust and other acridoid pests. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.171, p.5-25, 1997.

PURRINI, K. Studies on a new isolate of an entomopoxvirus possessing two types of occlusion bodies found in locust *Cataloipus fuscocoeruleipes*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.54, p.242-247, 1989.

RAINA, S.K., RAI, M.M.; KHURAD, A.M. Grasshopper and locust control using microsporidian insecticides. In: MARAMOROSCH, K., ed. **Biotechnology in invertebrate pathology and cell culture**. San Diego: Academic Press, 1987. p.345-365.

ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A.M. O controle biológico de insetos nocivos à agricultura com o emprego de fungos imperfeitos ou hifomicetos. **Biotecnologia**, v.6, p.10-12, 1998.

ROBERTS, D.W.; CAMPBELL, A.S. Stability of entomopathogenic fungi. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, v.10, n.3, p.19-76, 1977.

ROMBACH, M.C.; HUMBER, R.A.; ROBERTS, D.W. *Metarhizium flavoviride* var. *minus* var. nov., a pathogen of plant and leafhoppers on rice in Philippines and Solomon Islands. **Mycotaxon**, v.27, p.87-92, 1986.

SEBESTA, K.; FASKAS, J.; HORSKÁ, K.; VANKOVÁ, J. Thuringiensin, the beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. In: BURGES, H.D., ed. **Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980**. London: Academic Press, 1981. p.249-281.

SHERWOOD, R.L.; JOHNSON, W.D.; JARONSKI, S.T. Acute pulmonary and intraperitoneal toxicity/infectivity, and ocular irritation assessment of *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Metarhizium anisopliae* and *M.*

flavoviride isolates. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 27., 1994, Montpellier, France. **Proceedings**. Montpellier: Society for Invertebrate Pathology, 1994. v.2.. p.116.

SHOWLER, A.T. Locust (Orthoptera: Acrididae) outbreak in Africa and Asia, 1992-1994: an overview. **American Entomologist**, p.179-185. Fall 1995.

SIEGLAFF, K.; PEREIRA, R.M.; CAPINEIRA, J.L. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride* (Deuteromycotina) to *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae). **Journal of Economic Entomology**, v.90, p.1539-1545. 1997.

SIEGLAFF, D.H; PEREIRA, R.M.; CAPINERA, J.L. Microbial control of *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae) by *Metarhizium flavoviride* (Deuteromycotina): instar dependent mortality and efficacy of ultra low volume application under greenhouse conditions. **Journal of Economic Entomology**, v.91, p.76-85, 1998.

SILVA, J.B.T.; MAGALHÃES, B.P.; TEIXEIRA, A.B. Pathogenicity of *Nosema locustae* Canning (Protozoa: Microspora) against *Rhammatocerus schistocercoides* (Orthoptera: Acrididae) and *Stiphra robusta* (Orthoptera: Proscopiidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.25, n.3, p.545-547, 1996.

SILVEIRA, E.; AL-JANABI, S.; MAGALHÃES, B.P.; CARVALHO, L.J.C.B.; TIGANO, M.S. DNA polimorphism of the grasshopper *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) and its natural pathogen *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (Hyphomycetes). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.27, n.1, p.91-99, 1998.

SOUZA, M.L. de; LECUONA, R.E. Virus entomopatógenos. In: LECUONA, R.E., ed. **Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga**. Buenos Aires: Talleres Gráficos Mariano Mas, 1996. p.73-86.

SPRAGUE, V. Microspora. In: PARKER, S.P., ed. **Synopsis and classification of living organisms**. New York: McGraw-Hill, 1982. v.1. p.589-590.

SPRAGUE, V.; BECNEL, J.J.; HAZARD, E.I. Taxonomy of the phylum Microspora. **Critical Reviews in Microbiology**, v.18, p.285-395, 1992.

STEPHAN, D.; WELLING, M.; ZIMMERMANN, G. Locust control with *Metarhizium flavoviride*: formulation and application of blastospores. **Bulletin OILB / srop**, v.19, n.9, p.232-236, 1996.

STEPHENS, J.M. Note on effects of feeding grasshoppers two pathogenic species of bacteria simultaneously. **Canadian Journal of Microbiology**, v.2, p.313, 1959.

STEVENSON, J.P. Epizootiology of a disease of the desert locust, *Schistocerca gregaria* Forkål, with a nonchromogenic strain of *Serratia marcescens* Bizio. **Journal of Insect Pathology**, v.1, p.129-141, 1959.

STREETT, D.A.; HENRY, J.E. Microbial control of locusts and grasshoppers in the semi-arid tropics. **Boletin Sanidad Vegetal. Plagas** (Fuera de serie), v.20, p.21-27, 1990

STREETT, D.A.; McGUIRE, M.R. Pathogenic diseases of grasshoppers. In: CHAPMAN, R.F.; JOERN, A., ed. **Biology of grasshoppers**. New York: John Wiley & Sons, 1990. p.481-516.

STREETT, D.A.; OMA, E.A.; HENRY, J.E. Cross infection of three grasshopper species with the *Melanoplus sanguinipes* entomopoxvirus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.56, p.419-421, 1990.

STREETT, D.A.; WOODS, S.A.; ERLANDSON, M.A. Entomopoxviruses of grasshoppers and locusts: biology and biological control potential. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.171, p.115-130, 1997.

TANADA, Y.; KAYA, H.K. **Insect pathology**. San Diego: Academic Press, 1993. 666 p.

TAYLOR, A.B.; KING, R.L. Further studies on the parasitic amoeba found in grasshoppers. **Transactions of the American Microscopical Society**, v.56, p.172-8, 1937.

THOMAS, M.B.; JENKINS, N.E. Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*. **Mycological Research**, v.101, n. 12, p.1469-1474, 1997.

THOMAS, M.B.; BLANDFORD, S.; GBONGBOUI, C.; LOMER, C.J. Experimental studies to evaluate spray applications of a mycoinsecticide against the rice grasshopper, *Hieroglyphus daganensis*, in northern Benin. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.87, p.93-102, 1998.

THOMAS, M.B.; LANGEWALD, J.; WOOD, S.N. Evaluating the effects of a biopesticide on populations of the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*. **Journal of Applied Entomology**, v.33, p.1509-1516, 1996.

TOGUEBAYE, B.S.; SEEK, A.; MARCHAND, B. Histopathologie et ultrastructure de *Nosema pyrgomorphae* n.sp. (Microspora: Nosematidae) parasite de *Pygomorpha conica tereticornis* (Orthoptera: Pyrgomorphidae). **Archiv fuer Protistenkunde**, v.136, p.283-292, 1988.

UNDEEN, A. H.; VÁVRA, J. Research methods for entomopathogenic Protozoa. In: LACEY, L., ed. **Manual of techniques in insects pathology**. New York: Academic Press, 1997. p.117-51.

VAGO, C. A new type of insect virus. **Journal of Insect Pathology**, v.5, p.275-276, 1963.

VALADARES, M.C.C.; TIGANO, M.S.; SILVEIRA, E.B.; FERNANDES, R.P.A.; FRAZÃO, H. Caracterização bioquímica e molecular de linhagens de *Metarhizium flavoviride*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu, PR. **Resumos**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1996. p.276.

VALADARES-INGLIS, M.C.; INGLIS, P. Transformation of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviride* strain CG423 to benomyl resistance. **FEMS Microbiology Letters**, n. 155, p.199-202, 1997.

VANDENBERG, J.D. Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, v.83, n.3, p.755-759, 1990.

VANDENBERG, J.D.; STREETT, D.A.; HERBERT Jr., E.W. Safety of grasshopper entomopoxviruses for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, v.83, n.3, p.784-787, 1990.

VICENTINI, S.; MAGALHÃES, B.P. Infection of the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn by the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.25, p.309-314, 1996.

VOSSBRINK, C.R.; MADDOX, J.V.; FRIEDMAN, S.; DEBRUNNER-VOSSBRINK, B.A.; WOESE, C.R. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukariotes. **Nature**, v.326, p.411-414, 1987.

WANG, L.Y.; STREETT, D.A.; HENRY, J.E. *Nosema montanae* n.sp. (Microsporida), a parasite from grasshopper *Melanoplus packardii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.58, p.211-218, 1991.

WELLING. M.; ZELAZNY, B.; SCHERER, R.; ZIMMERMANN, G. First record of the entomopathogenic fungus *Sorosporella* sp. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) from Madagascar: symptoms of infection, morphology and infectivity. **Biocontrol Science and Technology**, v.5, p.465-474, 1995.

WEN, J. Z. Note on *Nosema asiaticus* sp.nov. (Microspora: Nosematidae). **Acta Zootaxonomica Sinica**, v.21, p.385-389, 1996.

WHITMAN, D.W. Function and evolution of thermoregulation in the desert grasshopper *Taeniopoda eques*. **Journal of Animal Ecology**, v.57, p.369-383, 1988.

WOODS, S.A; STREETT, D.A.; HENRY, J.E. Temporal patterns of mortality from an entomopoxvirus and strategies for control of the migratory grasshopper (*Melanoplus sanguinipes* F.). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.60, p.33-39, 1992.

XAVIER-SANTOS, S. Aspectos do comportamento cultural, citológico e entomopatogênico de *Metarhizium flavoviride*. Recife: UFPE, 1995. 108p. Dissertação de Mestrado.

XAVIER-SANTOS, S.; MAGALHÃES, B.P. Infectividade *de Metarhizium flavoviride* sobre o gafanhoto *Schistocerca pallens* em laboratório. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador, BA. **Resumos**. Salvador: EMBRAPA-CNPMF, 1997. p.113.

XAVIER-SANTOS, S., MAGALHÃES, B.P.; FARIA, M.R. Compatibilidade entre *Metarhizium flavoviride* e inseticidas químicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador, BA. **Resumos**. Salvador: EMBRAPA-CNPMF / Sociedade Entomológica do Brasil, 1997. p.113.

ZELAZNY, B.; GOETTEL, M.S.; KELLER, B. The potential of bacteria for the microbial control of grasshoppers and locusts. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.171, p.147-156, 1997.

ZIMMERMANN, G.; ZELAZNY, B.; KLEESPIES, R.; WELLING, M. Biological control of african locusts by entomopathogenic microorganisms. In: KRALL, S.; WILPS, H., ed. **New trends in locust control**: ecotoxicology, botanicals, pathogens, attractants, hormones, pheromones, remote sensing. Eschborn: GTZ, 1994. p.127-138.

6

RESISTÊNCIA DE LEPIDÓPTEROS A NUCLEOPOLIEDROVÍRUS COM ÊNFASE NO SISTEMA LAGARTA-DA-SOJA-VPNAg

Daniel R. Sosa-Gómez
Flávio Moscardi

INTRODUÇÃO

Nesta revisão serão abordados os aspectos da resistência da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, ao seu vírus de poliedrose nuclear (VPNAg), considerando, principalmente, o conceito clássico de resistência definido pelo Comitê de Especialistas sobre Inseticidas da Organização Mundial da Saúde. Em sistemas envolvendo patógenos e insetos o conceito pode ser modificado, definindo resistência a patógenos como "o desenvolvimento da habilidade de tolerar dosagens de inóculo que habitualmente provocariam a doença e/ou morte na maior parte dos indivíduos em uma população normal da mesma espécie" (World Health Organization, 1957; Omoto & Alves, 1998). Assim, aspectos ligados ao desenvolvimento como diferenças de suscetibilidade entre instares, diferenças de suscetibilidade devido a fatores nutricionais ou de ambiente serão considerados em segundo plano.

Considerando-se a extensão de área tratada em nível mundial, atualmente o Brasil possui o maior programa de controle microbiano de insetos, através da utilização de baculovírus (Moscardi, 1989; Moscardi & Sosa-Gómez, 1996; Moscardi, 1999). Desde 1989/90 a aplicação de baculovírus tem oscilado em torno de 1.000.000ha (Moscardi & Sosa-Gómez, 1993), com exceção da safra 1997/98, quando a utilização do VPNAg atingiu cerca de 1.400.000ha (Moscardi, dados não publicados). Após

mais de 15 anos de programa, têm surgido alguns casos de insucesso do uso do vírus, cujas causas foram consideradas por Moscardi (1999). Os estudos sobre a resistência da lagarta da soja ao seu baculovírus foram inicialmente desenvolvidos no laboratório de Patologia de Insetos da Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Embrapa Soja) - para determinar as causas da ineficiência do baculovírus no controle das populações de *Anticarsia gemmatalis*, que ocorreram nas safras 1991/92, nas regiões de Passo Fundo (Jacobsen comunicação pessoal) e 1993/94, em Ibiporã (L. Morales comunicação pessoal) e Bela Vista do Paraíso (D.R. Sosa-Gómez observação pessoal). Os estudos sobre resistência, que são de grande relevância nos programas de controle microbiano, visam ao entendimento dos mecanismos que regulam a manifestação da resistência e o estabelecimento dos padrões do seu desenvolvimento, evitando assim que interfiram no controle eficiente da praga. A partir de 1991, procurou-se obter subsídios para avaliar se esse fenômeno se manifestava em populações da lagarta da soja e, em caso positivo, delinear as estratégias a serem adotadas para possibilitar o manejo adequado dos casos de resistência.

Devido à extensão da área tratada e à maior freqüência do uso do VPNAg nos últimos anos, no Brasil, tornou-se importante seguir as reações das populações naturais, verificando-se os níveis de suscetibilidade, especialmente nos locais que possuem, historicamente, maior freqüência de aplicação desse vírus (Moscardi & Sosa-Gómez, 1992). Nesta revisão, procurou-se abordar aspectos básicos do fenômeno de desenvolvimento de resistência de lepidópteros a baculovírus, colocando-se maior ênfase nas interações de lagarta da soja com o VPNAg.

Fatores relacionados ao desenvolvimento da resistência

Além dos aspectos genéticos, os biológicos e ecológicos possuem elevada influência no desenvolvimento da resistência (Tabela 1). De maneira semelhante ao que ocorre com inseticidas, existem populações que desenvolvem resistência rapidamente, outras que a desenvolvem gradativamente e outras que não a desenvolvem. Diferenças entre populações também ocorrem quanto aos níveis de resistência que podem ser atingidos.

TABELA 1. Fatores que influenciam a seleção de resistência a vírus de insetos em campo.

A. Fatores Genéticos

1. Freqüência de alelos resistentes
2. Número de alelos resistentes
3. Dominância dos alelos resistentes
4. Expressividade e interações dos alelos resistentes
5. Histórico de exposição a outras viroses (epizootias naturais ou induzidas)
6. Integração do genoma resistente com outros fatores de "ajuste" ao meio ambiente

B. Fatores biológicos ou ecológicos

1. Número de gerações por ano
2. Descendência por geração
3. Monogamia, poligamia ou partenogêneses
4. Isolamento, mobilidade e migração
5. Monofagia, polifagia
6. Sobrevivência fortuita, presença de refúgios

C. Fatores Operacionais

1. Afinidade do patógeno utilizado com os que ocorrem naturalmente
2. Persistência do patógeno no ambiente (formulação)
3. Limiar de utilização
4. Nível da pressão seleção
5. Estágio exposto
6. Modo de aplicação
7. Seleção limitada no espaço
8. Ciclos de seleção

Adaptado para patógenos de Georghiou & Taylor (1986)

Nas populações com potencial para desenvolver resistência, a freqüência da ocorrência dos genes que conferem essa característica varia de acordo com a intensidade da pressão de seleção e da taxa de imigração existente. No caso dos baculovírus, a intensidade da pressão de seleção é dada pela freqüência da ocorrência de epizootias, sejam naturais ou induzidas artificialmente (histórico da exposição). Portanto, as aplicações de inseticidas microbianos, comparativamente com as epizootias naturais, exercem melhores condições para desenvolvimento da resistência

(Sosa-Gómez et al,. 1998). As aplicações antecipadas contra a primeira geração de lagartas, geralmente em populações muito baixas, do VPNAg isoladamente ou em combinação com herbicidas pós-emergentes na cultura da soja têm se tornado comum. Essa prática pode ser considerada como fator de seleção da resistência a campo, por prolongar e aumentar a freqüência da exposição ao vírus (histórico de exposição na Tabela 1).

Briese & Podgwaite (1985) relataram que os fatores que determinam a resposta de um inseto em particular podem ser agrupados naqueles relacionados ao desenvolvimento do hospedeiro, ao ambiente e ao seu genótipo. Provavelmente, a esses fatores podem ser acrescentados aqueles relacionados ao comportamento, porém o efeito deles é difícil de ser determinado, sendo relatados casos envolvendo resistência a inseticidas e fungos entomopatogênicos (Boucias et al., 1996; Neves & Alves, 1998), mas não a baculovírus. Ainda em muitos dos casos envolvendo inseticidas, essa forma de resistência não tem sido corroborada (Roush & Daly, 1990).

Assim, a resistência desenvolve-se tão mais rapidamente quanto maiores forem as mortalidades provocadas pelo fator indutor, as condições de isolamento dessa população (taxa de imigração reduzida) e a capacidade de recuperar sua densidade de equilíbrio, após o início dos tratamentos com baculovírus. No entanto, sem a presença do gene (ou dos genes) de resistência, não haverá desenvolvimento da mesma, como tem ocorrido com as espécies *Helicoverpa zea* e *Heliothis virescens*, para as quais não foi possível se obter populações resistentes a baculovírus (Ignoffo & Allen, 1972; Kaomini & Roush, 1988; Fuxa, 1993).

Insetos multivoltinos podem desenvolver resistência mais rapidamente do que os univoltinos, por serem alvos de um maior número de ciclos de pressão de seleção. Acredita-se que insetos com hábitos polífagos tendem a desenvolver resistência mais lentamente do que os monófagos. Os polífagos habitam diversas espécies vegetais não atingidas pelos tratamentos, atuando como refúgio dos indivíduos migrantes suscetíveis. Por outro lado, as espécies que apresentam reprodução sexuada têm vantagens nas respostas às alterações do ambiente, especialmente se essas alterações ocorrem em rápida sucessão. Esse aspecto, no entanto, deve ser melhor estudado (Georghiou & Taylor, 1986). De acordo com esses autores, o aspecto

ecológico mais importante no desenvolvimento de resistência é a imigração de indivíduos suscetíveis. Assim, após o tratamento com elevadas doses de baculovírus, somente sobreviverão poucos homozigotos resistentes (RR). Portanto, se há uma imigração intensa de indivíduos suscetíveis que se acasalam (poligamia, Tabela 1), as progênies resultantes serão homozigotos suscetíveis (SS) e heterozigotos (RS) que podem ser controlados com tratamentos subseqüentes. Se inexistirem ou existem poucos imigrantes, então a reprodução entre indivíduos RR sobreviventes aumentará as probabilidades da população para desenvolver resistência, ocorrendo essa evolução rapidamente se o caráter de resistência for dominante.

Consideram-se fatores operacionais aqueles dependentes do homem, como o momento de aplicação, a dose, a freqüência das aplicações e a formulação do bioinseticida. Via de regra, as populações da lagarta da soja são controladas com uma única aplicação de baculovírus. Portanto, em cada geração a lagarta da soja é exposta de maneira uniforme com pouca freqüência ao vírus. Entretanto, não se deve desconsiderar que, após a aplicação, pode haver efeito de reposição do vírus proveniente das lagartas infectadas em campo, que controla populações subseqüentes. Outros fatores como o refúgio, a dominância efetiva e um certo controle sobre a imigração podem também ser manipulados. A dominância efetiva consiste em aplicar doses elevadas para permitir a sobrevivência de poucos RR, cuja resistência se dilui através do acasalamento com indivíduos suscetíveis imigrantes. No entanto, essa estratégia pode levar a um desenvolvimento mais rápido da resistência, caso o fluxo de indivíduos imigrantes seja baixo ou haja caráter de resistência dominante, conforme discutido anteriormente. Além da dose, também a persistência (formulação ou características inerentes ao próprio vírus) pode ser um fator determinante de resistência, pois a exposição a resíduos com atividade inseticida, por longos períodos, elimina os indivíduos mais suscetíveis.

Mecanismos de resistência

Na literatura têm sido relatados diversos mecanismos de resistência para diferentes vírus entomopatogênicos (Briese, 1986). Embora até o momento não tenham sido determinados os mecanismos envolvidos no sistema *A. gemmatalis* - VPNAg,

existem trabalhos sendo desenvolvidos atualmente nessa área.

Alguns baculovírus são transmitidos verticalmente através dos ovários ou dos ovos (Bird, 1961), porém este parece não ser o caso no sistema *A. gemmatalis* - VPNAg (Fuxa & Richter, 1993). Esse inseto é contaminado pelo VPNAg, principalmente *per os* (via oral). Segundo Granados, citado por Briese (1986), é pouco provável que, durante o processo anterior à infecção das células epiteliais do intestino médio, existam mecanismos importantes de defesa contra o vírus, como alterações na etapa de degradação de poliedros que agem antes da infecção primária. Portanto, é possível que os principais mecanismos de defesa contra a infecção das partículas virais envolva as células epiteliais ou os tecidos do intestino médio. Alguns desses possíveis mecanismos são (modificado de Briese, 1986):

a) Presença de substâncias com ação antiviral no fluído digestivo, a exemplo do bicho-da-seda, *Bombyx mori* L., no qual elas inativam os vírus de poliedrose nuclear (VPNAg);

b) Dificuldade para atravessar a matriz peritrófica (MP): embora não existam estudos sobre a MP de *A. gemmatalis*, é sabido que os poros de algumas espécies de lepidópteros medem de 21 a 29nm de diâmetro e que as partículas infectivas dos baculovírus, de acordo com Matthews (ver Tanada & Kaya, 1993), medem entre 40 a 60nm por 200 a 400nm. Porém, também se sabe que certos baculovírus têm a capacidade de degradar essa matriz (Boucias & Pendland, 1998) e que, embora uma das principais funções da MP seja atuar como barreira contra agentes infecciosos, a matriz peritrófica tipo II, que ocorre nos lepidópteros, não é considerada uma barreira efetiva contra os vírus (Lehane, 1997);

c) Alterações nos receptores das microvilosidades das células epiteliais do intestino que dificultam a fixação das partículas virais, perturbando o processo de infecção primária;

d) Inibição da replicação viral em células epiteliais do intestino médio;

e) Rápida eliminação das células infectadas do intestino médio, através das fezes, levando a uma redução dos níveis de infecção. As células regenerativas originam novas células, reconstituindo o epitélio do intestino. Isto não acontece nas linhagens suscetíveis, nas quais o número de células infectadas aumenta continuamente

(Inoue & Miyagawa, 1978). Resultados preliminares indicam que ocorre uma redução no número de células intestinais infectadas, em estágios iniciais da infecção em populações resistentes ao VPNAg. Isso pode ser devido ao aumento da taxa de renovação celular no intestino ou a uma diminuição da capacidade do vírus em entrar nas células intestinais. Quando o vírus extracelular é administrado direto na hemolinfa de insetos resistentes, a infecção parece ser similar à que ocorre em linhagens suscetíveis, indicando, dessa forma, que o mecanismo de resistência deve ocorrer na entrada do vírus através do intestino (B.M Ribeiro, comunicação pessoal);

f) Destruição ou inativação do vírus na hemolinfa. David (1978) relatou que em populações suscetíveis e resistentes de *Pieris brassicae* (L.), inoculadas com injeções de vírions livres na hemolinfa, as diferenças entre as populações resistentes e suscetíveis persistiam, indicando que existem mecanismos de resistência além daqueles envolvidos em nível de epitélio do intestino médio. É provável que existam outros mecanismos associados à migração das partículas virais, ou barreiras no sistema traqueal, que são utilizados como via de acesso na disseminação da infecção para outros tecidos. Ainda, Reeson et al. (1998) sugerem que a produção da enzima fenoloxidase na lagarta *Spodoptera exempta* (Walker) está relacionada com a resistência ao seu baculovírus.

Diferenças de suscetibilidade entre populações naturais

As interações entre as pressões de seleção do vírus e as taxas de imigração podem resultar em suscetibilidade diferencial entre populações geográficas de uma mesma espécie (Briese, 1986). Assim sendo, a ocorrência de diferenças de suscetibilidade entre populações naturais de diferentes origens permite prever que a manifestação da resistência pode ocorrer nessas populações. As diferenças dos níveis de suscetibilidade a baculovírus, entre populações naturais de insetos, têm sido estudadas por diversos autores (Fuxa, 1993) (Tabela 2). Por exemplo, determinou-se que populações geográficas da traça da batata, *Phthorimaea operculella* (Zeller), na Austrália apresentaram diferenças de suscetibilidade de até 11,6 vezes (Briese & Mende, 1981). Fuxa (1987) observou diferenças de valores de CL_{50} que variaram de 0,9 a 16,1 corpos poliédricos de inclusão (CPI) por lagarta de primeiro estádio, o que

representa diferenças de suscetibilidade de 18 vezes entre populações naturais de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith).

TABELA 2. Diferenças de suscetibilidade ao baculovírus entre populações de insetos coletadas no campo.

Vírus	Hospedeiro	Número de Populacões	Fator de resistência	Referência
GV	*Phthorimaea operculella*	16	11,6	Briese & Podgwaite (1985)
GV	*Pieris rapae*	2	sem diferenças	Martignoni & Smichd (1961)
NPV	*Spodoptera frugiperda*	13	18,8	Fuxa (1987)
NPV	*Anticarsia gemmatalis*	6	sem diferenças	Fuxa et al.(1993); Abot et al. (1995)

Estudos em populações de campo expostas a aplicações de baculovírus não foram realizados, até os trabalhos iniciados em 1991, com a lagarta da soja no Brasil (Sosa-Gómez & Moscardi, 1994; Abot et al., 1995). Através de estudos realizados na Embrapa Soja, comparando a suscetibilidade entre populações de *A. gemmatalis* provenientes da região de Dourados (MS), Passo Fundo e Tapejara (RS) e Rancho Alegre e Londrina (PR), constatou-se que, com base nos intervalos de confiança dos valores de CL_{50}, as populações não diferiam em sua suscetibilidade ao VPNAg. Por outro lado, os estudos de regressão entre as CL_{50} e o número de anos que as áreas foram expostas ao vírus indicaram uma relação positiva. Assim, os autores sugerem que não existem evidências do desenvolvimento de resistência, mas a tendência de aumento da CL_{50} através dos anos evidencia a necessidade de se realizar o monitoramento nas áreas onde for aplicado o VPNAg com freqüência (Abot et al., 1995).

Resistência da lagarta-da-soja ao VPNAg

A resistência é um fenômeno dinâmico, resultante das interações entre as populações do inseto hospedeiro e o vírus, nas quais tanto o hospedeiro como o vírus podem apresentar variabilidade intra-específica. Duas populações de insetos podem apresentar respostas de intensidade diferente a um mesmo vírus e ainda a diferentes raças do mesmo. O fenômeno de suscetibilidade diferencial a vários isolados de vírus já tem sido observado em numerosas espécies de lepidópteros, entre elas *A. gemmatalis* (Berino, 1995). Nos estudos realizados simultaneamente pela Embrapa Soja, no Brasil, e pela Universidade da Louisiana, nos Estados Unidos (EUA), comprovou-

se que, em condições de laboratório com isolamento e pressão de seleção elevada (CL_{80}), é possível obter populações de *A. gemmatalis* resistentes ao VPNAg em três a quatro gerações, segundo Abot et al. (1996). Estes autores relataram que os níveis de resistência obtidos não foram observados em outros sistemas envolvendo insetos e baculovírus (Tabela 3). É interessante salientar que esse elevado nível de resistência ocorreu após seleção por um maior número de gerações e com uma pressão de seleção maior do que aquela aplicada nas outras espécies (Tabela 3). As populações da lagarta da soja no Brasil apresentaram resposta diferente das populações dos EUA. O fator de resistência (FR = CL_{50} da população resistente/CL_{50} da população suscetível) foi de mais de 1.000 vezes na população proveniente de Dourados, MS, enquanto que na população americana foi observado um fator de, aproximadamente, 5 vezes (Figura 1). Fuxa & Richter (1998), em estudos posteriores, continuaram com a pressão de seleção em populações americanas de *A. gemmatalis* e, ainda assim, os níveis de resistência obtidos não foram comparáveis aos obtidos no Brasil. Os elevados níveis de resistência obtidos com *A. gemmatalis* no Brasil, isto é, taxas de resistência de 3.000 vezes ou mais (Moscardi, 1998; 1999), se devem à elevada pressão de seleção aplicada durante 16 gerações e ao fato de no Brasil o inseto já ser exposto naturalmente ao VPNAg, ao contrário dos EUA, onde esse vírus não ocorre naturalmente. Atualmente, as populações mantidas na Embrapa Soja encontram-se na 54ª geração e os níveis de resistência são maiores do que os mencionados.

TABELA 3. Casos de resistência a baculoviroses constatados em populações de insetos pragas após pressão de seleção em laboratório.

Vírus	Hospedeiro	Fator de resistência	Número de gerações	% Mortalidade pressão de seleção	Referência
VPN	*Anticarsia gemmatalis*	> 3000	16	68-90	Moscardi (1999)
GV	*Phthorimaea operculella*	140	6	34-71	Briese & Mende (1983)
GV	*Cydia pomonella*	7 a 8	7	51-90	Briese (1986)
VPN	*Spodoptera frugiperda*	3,2	7	79	Fuxa et al.(1998)

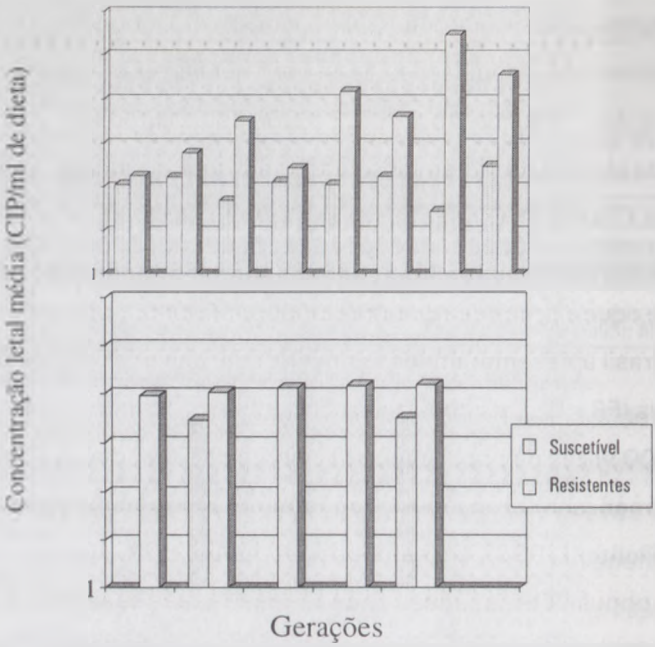


FIGURA 1. Fator de resistência (FR = CL_{50} da população resistente/CL_{50} da população suscetível) de populações da lagarta-da-soja

Estabilidade da resistência

Quando as populações resistentes de uma espécie perdem essa capacidade após a remoção da pressão do agente causal dessa resistência, trata-se de um caso de resistência instável. Em caso contrário, os níveis de resistência podem permanecer inalterados através das gerações, mesmo após a retirada da pressão de seleção.

Uma mesma espécie pode apresentar respostas diferentes, dependendo dos níveis de resistência adquiridos. Fuxa & Richter (1998) constataram que populações de *A. gemmatalis*, com fator de resistência de 5 vezes, quando não são expostas ao vírus, podem recuperar a suscetibilidade em duas ou três gerações. Já populações com os níveis de resistência mais elevados, como as encontradas no Brasil, com fator de resistência de aproximadamente 2500 vezes, recuperaram os níveis próximos da suscetível (FR = 5) somente após 12 gerações (Abot, 1997) (Figura 2). Por outro lado, quando populações de *A. gemmatalis*, oriundas de Dourados (MS) e Sertanópolis, com elevados níveis de resistência foram retrocruzadas com as respectivas colônias

suscetíveis, a resistência foi totalmente quebrada em quatro retrocruzamentos (Abot, 1993; Moscardi, 1999). O conhecimento da instabilidade da resistência pode orientar sobre as estratégias a serem adotadas para o manejo da resistência em campo. Na presença da instabilidade, pode ser mais apropriado adotar medidas dentro do conceito de manejo por moderação ou por ataque múltiplo (Omoto & Alves, 1998). Por outro lado, essa resistência pode ser rapidamente "diluída" quando a população resistente é cruzada e/ou submetida ao retrocruzamento com populações suscetíveis (Fuxa et al., 1993; Abot, 1993).

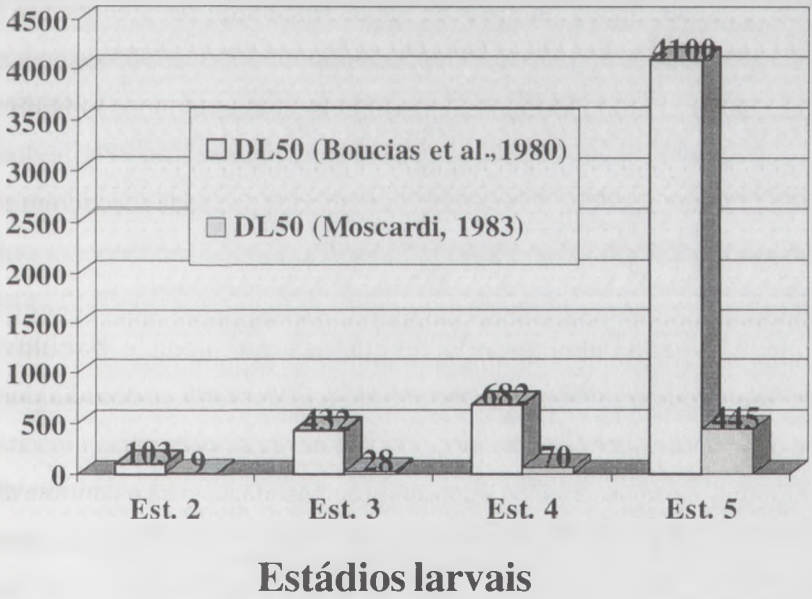


FIGURA 2. Estabilidade da resistência. Populações com altos níveis de resistência podem recuperar os níveis próximos da suscetibilidade (FR = 5)

Resistência cruzada e múltipla

Denomina-se resistência cruzada o fato de um inseto que desenvolve mecanismos de defesa contra um patógeno também adquirir resistência contra outro agente de infecção ou mortalidade. Os estudos de resistência cruzada são úteis, pois orientam na identificação dos mecanismos de resistência e permitem caracterizar a abrangência do espectro (específico ou geral) de resistência cruzada (Scott, 1990). Outros autores também definem resistência múltipla como aquela que ocorre quando existem diferentes mecanismos de resistência em um mesmo indivíduo, manifestando-

se para diferentes agentes de controle (químicos e biológicos).

Resistência cruzada envolvendo baculovírus e outros entomopatógenos

Existem poucos estudos de resistência cruzada envolvendo vírus entomopatogênicos. No caso da lagarta da soja, existe um único exemplo, no qual as populações de *A. gemmatalis* resistentes ao VPNAg mantiveram sua suscetibilidade para *Bacillus thuringiensis* (Sosa-Gómez et al., 1992), indicando que este patógeno pode ser usado como uma alternativa de controle.

A seleção de populações de *S. frugiperda* resistentes ao vírus de poliedrose nuclear de *S. frugiperda* (VPNSf) pode afetar a suscetibilidade dessa espécie a outros agentes de mortalidade. Assim, a população resistente ao VPNSf foi pouco suscetível ao vírus da granulose, originário da mesma espécie, e ao VPN de *Autographa californica* (Speyer), sendo que as taxas de resistência observadas não foram elevadas, variando entre 2,2 a 3,0X (Fuxa & Richter, 1990).

Resistência cruzada envolvendo inseticidas químicos e baculovírus

Estudos recentes (M. Copacheski & F.Moscardi, dados não publicados) indicam que, além de *B. thuringiensis*, populações de *A. gemmatalis* resistentes ao VPNAg foram suscetíveis a vários inseticidas recomendados para o controle do inseto. Atualmente não existem exemplos disponíveis na literatura envolvendo *A. gemmatalis*, mas pode ocorrer resistência em outras espécies da mesma família da lagarta da soja. Raças de *Heliothis virescens* (F.) que eram resistentes a permetrina, outras resistentes a metomil e outras suscetíveis a esses inseticidas, não diferiram em sua suscetibilidade ao *Baculovirus heliothis*, ao *B. thuringiensis* var. *kurstaki,* ao fungo *Nomuraea rileyi* e ao protozoário *Vairimorpha necatrix* (Ignoffo & Roush, 1986).

Um exemplo interessante de correlação negativa é o de uma população de *S. frugiperda*, resistente ao seu VPN, que apresentou maior suscetibilidade ao metil-paration que à população susceptível. Este fato foi evidente quando os insetos foram tratados com o inseticida por via oral, não sendo observado o mesmo quando os insetos foram tratados topicamente (Fuxa & Richter, 1990).

Fatores que alteram a suscetibilidade a baculovírus

Além da resistência verdadeira, outros fatores podem interferir na manifestação da suscetibilidade de insetos a doenças. É conhecido que as populações de insetos-praga, estressadas por frio, falta de alimento, alimento inadequado ou certas substâncias químicas, apresentam maior suscetibilidade a baculovírus ou podem apresentar mortalidade decorrente de infeções virais latentes. Existem diversos fatores que afetam a suscetibilidade a doenças, como:

a) Desenvolvimento ontogênico: o decréscimo temporário de suscetibilidade não é considerado resistência verdadeira, mas será discutido nesta seção pela importância que possui do ponto de vista de controle das populações em campo. A suscetibilidade pode ser maior imediatamente antes e depois de cada ecdise e decrescer, consideravelmente, durante o período intermediário. As mudanças do nível de resistência, dentro do ciclo de cada indivíduo, podem ser controladas pelas variações de hormônios. Assim, indivíduos em diapausa apresentam considerável tolerância quando comparados com indivíduos que não estão em diapausa (Briese & Podgwaite, 1985). Da mesma maneira, a tolerância a doenças é provavelmente maior na fase pupal (Mikhailov et al., 1992). Na lagarta da soja, a redução da suscetibilidade não ocorre em progressão linear (Figura 3) (Boucias et al., 1980; Moscardi, 1983). Portanto, o controle deverá ser realizado quando as lagartas encontrarem-se nos três primeiros estádios larvais, quando a suscetibilidade ao vírus é elevada;

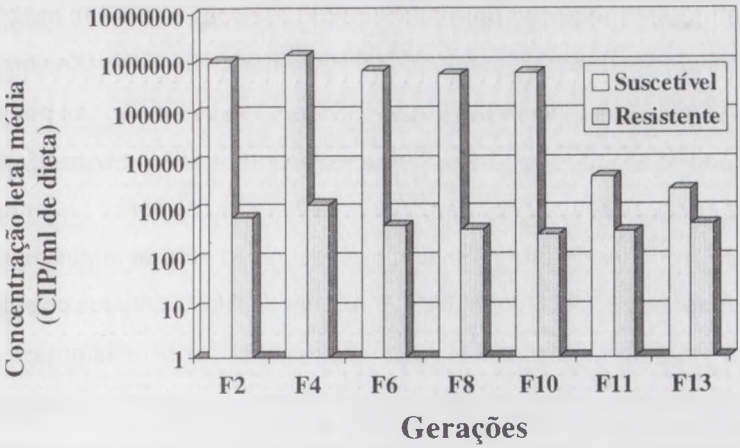


FIGURA 3. Desenvolvimento ontogênico. Redução da suscetibilidade da lagarta-da-soja, nos diferentes estádios larvais, de acordo com as gerações.

b) Densidade populacional: recentemente, Reeson et al. (1998) observaram que populações de *Spodoptera exempta* (Walker), criadas em altas densidades, eram mais tolerantes ao seu VPN que aquelas criadas em condições de isolamento. Paralelamente, as populações criadas em altas densidades apresentaram melanização acentuada da cutícula nos últimos estádios larvais, o que parece estar relacionado com um incremento nos níveis de fenoloxidase, conferindo aos indivíduos um mecanismo de defesa mais efetivo contra infecções. Com a lagarta-da-soja *A. gemmatalis*, populações em campo adquirem coloração escura quando encontram-se em alta densidade. Recentemente, populações que apresentam esse fenômeno foram selecionadas em laboratório e estão sendo comparadas com lagartas que apresentam coloração verde, com a finalidade de averiguar sua suscetibilidade diferencial ao VPNAg, outros patógenos e inseticidas químicos (F. Moscardi, informação pessoal);

c) Dieta: tem sido observado que lagartas da soja, alimentadas com diferentes hospedeiros, variam sua resposta de suscetibilidade ao VPN. Essas diferenças podem ser devidas, em parte, à qualidade das folhas com as quais se alimentaram. Os insetos alimentados com *Vigna luteola* (Jacq.) Benth foram menos suscetíveis ao vírus do que aqueles que se alimentaram da soja *Glycine max* L. ou *Rhynchosia minima* (L.) (Peng et al., 1997). De maneira semelhante, Richter et al. (1987) observaram que a suscetibilidade de *S. frugiperda* ao seu baculovírus diferiu quando os insetos alimentaram-se de hospedeiros diferentes. Assim, a suscetibilidade ao vírus foi maior quando os insetos se alimentaram de soja *Cynodon dactylon* (L.), *Lolium multiflorum* Lam. e *Sorghum bicolor* (L.), do que quando se alimentaram de milho [*Zea mays* L.], *Panicum romasum* L. e *Brachiaria decumbens* Staph. Essas diferenças podem ser devidas a diversas interações durante o processo de infecção, como interferências no pH, na fixação de proteínas, no tempo de passagem do alimento pelo intestino (Peng et al., 1997) ou no aumento da suscetibilidade, por efeitos de antibiose sobre o inseto (Sosa-Gómez et al., 1991). Ainda são pouco conhecidos os efeitos do substrato de alimentação sobre as populações de insetos verdadeiramente resistentes;

d) Fatores abióticos: fatores como a luz podem ter efeitos indiretos sobre a resposta do bicho-da-seda ao baculovírus, pois ela é necessária para a síntese de uma proteína antiviral (Hayashiya et al., 1978);

e) Substâncias químicas: determinadas substâncias sintéticas ou originárias de produtos naturais possuem a capacidade de aumentar a mortalidade do hospedeiro quando inoculadas simultaneamente com vírus entomopatogênicos. Essas substâncias, quando inoculadas isoladamente em concentrações apropriadas, não provocam alterações perceptíveis na mortalidade do hospedeiro. As substâncias sintéticas mais conhecidas com essa atividade pertencem ao grupo dos stilbenes (Tinopal, Blankophor). Atualmente, na Embrapa Soja, estão sendo realizados estudos para utilizar as propriedades desses compostos dentro do programa de controle microbiano da lagarta da soja. Os resultados obtidos com a lagarta da soja indicam que a atividade do vírus pode ser aumentada entre 75 e 800 vezes (Moscardi, 1998). Outro aspecto interessante é que esses compostos têm a capacidade de quebrar a resistência de populações de *A. gemmatalis*, altamente resistentes ao vírus. Morales et al. (1998) observaram 95% de mortalidade em populações de lagarta da soja resistentes ao vírus, tratadas com Tinopal UNPA GX mais VPNAg, enquanto na testemunha resistente tratada com a mesma concentração não houve mortalidade. O ácido bórico tem apresentado propriedades semelhantes, favorecendo a mortalidade de lagartas quando aplicado em conjunto com o vírus, reduzindo a concentração letal média para *A. gemmatalis* em aproximadamente 4 vezes e antecipando o tempo letal (Morales et al., 1997). As dietas deficientes em sacarose também podem provocar um aumento na suscetibilidade ao vírus, como acontece no caso de *P. brassicae* inoculada com GV. Aparentemente, esse fenômeno está associado à maior entrada do vírus pelas células do intestino médio.

As interações que envolvem fatores de sinergismo e populações resistentes não são totalmente conhecidas. Entretanto, entre os casos mais conhecidos de sinergismo envolvendo baculovírus e populações de insetos pragas está a ocorrência de um fator de sinergismo na cápsula do vírus de granulose de *Pseudaletia unipuncta* (Haworth), que realça a infecção *per os* do VPN dessa espécie, quando inoculados simultaneamente. Atualmente, há evidência de que esse fator é uma metaloprotease ("enhancin factor") produzida por alguns vírus de granuloses que possuem a capacidade de aumentar a permeabilidade da matriz peritrófica e, portanto, de facilitar a penetração das partículas virais (Lepore et al., 1996). Hoffmann-Campo & Moscardi (não publicado)

observaram que o flavonóide rutina, presente em alguns genótipos de soja resistentes a lagartas desfolhadoras, quando inoculado simultaneamente com o VPNAg, também proporcionou quebra da resistência em população de *A. gemmatalis* altamente resistente ao vírus;

f) Outros agentes biológicos: a infecção por outros patógenos pode quebrar a resistência ao VPNAg. Assim, em trabalhos desenvolvidos na Embrapa Soja observou-se que populações de *A. gemmatalis*, com elevada resistência ao seu baculovírus, quando infectadas pelo protozoário *Thelohania* sp., tiveram sua suscetibilidade ao vírus aumentada substancialmente (Sosa-Gómez & Moscardi, 1994). Por outro lado, se desconhecem as respostas de populações resistentes afetadas por outros inimigos naturais, embora se saiba que algumas espécies de lagartas parasitadas por himenópteros apresentaram menor suscetibilidade ao seu baculovírus (Beegle & Oatman, 1974; Caballero et al., 1988).

Alterações dos parâmetros biológicos ligados à resistência

Da mesma maneira que ocorre com inseticidas, o desenvolvimento de resistência a baculovírus por uma determinada população pode resultar no custo biológico de reduzir a adaptabilidade do inseto ao ambiente. Entre os insetos que são afetados biologicamente pela resistência a baculovírus, encontram-se a lagarta do cartucho do milho (*S. frugiperda*) e a lagarta da soja (*A. gemmatalis*). Os efeitos mais proeminentes observados em parâmetros biológicos são: menor número de ovos por fêmea; menor porcentagem de eclosão dos ovos; e vida média maior em insetos resistentes, sendo o alongamento do ciclo mais notável durante a fase pupal (Fuxa & Richter, 1998). Segundo esses autores, o comprometimento nos parâmetros biológicos levou à extinção de uma colônia resistente de *A. gemmatalis*, após 16 gerações. Nos trabalhos realizados no laboratório da Embrapa Soja com essa espécie, não se observaram diferenças importantes entre as populações resistentes e suscetíveis, apesar de ter sido observado menor peso de pupas na população resistente. Quanto aos parâmetros período de oviposição e longevidade, a população resistente foi ligeiramente superior à suscetível, sem ocorrer diferenças quanto à fertilidade (Abot, 1997). Até março de 1999, essas diferenças quanto a populações resistentes,

mantidas sob pressão de seleção na Embrapa Soja após 50 gerações, não comprometeram a manutenção da colônia. Essas diferenças de comportamento indicam que as inferências obtidas a partir de uma população podem não se aplicar a outras populações, requerendo um estudo particular para cada população geográfica. Os parâmetros avaliados não indicam uma falta de adaptabilidade das populações do Brasil quando são selecionadas para resistência a baculovírus. Isto é um indício da necessidade de se ter mais cautela com o manejo da resistência no Brasil do que no cenário dos Estados Unidos.

Dificuldades na detecção da resistência a baculovírus em condições de campo

Quando existe potencial para o desenvolvimento de resistência, há necessidade de se avaliar sistematicamente os seus níveis, a fim de assegurar o controle adequado da praga. Entre as principais dificuldades para se determinar a ocorrência de resistência em condições de campo está a variabilidade dos bioensaios. Esta pode mascarar a detecção inicial da resistência, principalmente quando sua freqüência é baixa. Nesse caso, a técnica de bioensaio deve ser cuidadosamente padronizada. O ideal no processo de determinação das curvas de estímulo-resposta é trabalhar com doses (a quantidade exata de corpos poliédricos de oclusão que foram ingeridos pela lagarta) em lugar de concentrações (concentração de vírus no alimento oferecido para a lagarta). As comparações de resultados entre laboratórios podem resultar em grandes diferenças, devido às variações que podem ocorrer quando se trabalha com concentrações e com populações do hospedeiro mantidas em diferentes condições. Essas variações ocorrem em função do método utilizado no processo de inoculação, seja na incorporação do vírus na dieta, na aplicação sobre a superfície da dieta ou sobre folhas. Porém, quando se trabalha com um grande número de lagartas, a rapidez do método do bioensaio pode ser um ponto crítico, sacrificando em parte a precisão, mas processando um volume maior de amostras ao se trabalhar com concentração letal. No início dos trabalhos de resistência realizados na Embrapa Soja, durante os bioensaios, por exemplo, chegou-se a inocular de 8.000 a 10.000 lagartas por dia. A variação de resposta nos bioensaios também pode ser devida à variabilidade

natural das populações de magnitude normalmente desconhecida. Se define variabilidade natural à diferença numérica na resposta que se detecta cada vez que um bioensaio é realizado com uma raça do inseto, tanto em uma como em mais gerações (Robertson et al., 1995). As variações esperadas nos bioensaios, durante os trabalhos de resistência, podem ser minimizadas mediante o uso da taxa de resistência que considera o quociente da concentração letal média (CL_{50}) da população resistente sobre o da população suscetível, proveniente de bioensaios montados no mesmo dia, com as respectivas populações mantidas em condições idênticas. A ocorrência de uma população heterogênea, em sua resposta à infecção por baculovírus, também mascara a presença de indivíduos resistentes. O estresse das populações dos insetos-praga, transferidas do campo para laboratório, provoca uma seleção não intencional, podendo causar distorções nos resultados de laboratório. Freqüentemente, os resultados de bioensaios com insetos coletados em campo são obtidos de populações criadas por 2-3 gerações em laboratório, quando os indivíduos já se adaptaram à dieta artificial e às condições de laboratório.

A etapa inicial de um programa para avaliação do desenvolvimento de resistência de um inseto a um agente de controle consiste no monitoramento das populações. Para isso, tem sido proposta a utilização de uma dose discriminatória (DL_{95} ou DL_{99}) para determinar a ocorrência de indivíduos resistentes com maior precisão e com menor consumo de material. Nas etapas iniciais da manifestação da resistência, a freqüência de indivíduos resistentes é normalmente muito baixa e quanto menor for essa freqüência maior deverá ser o tamanho da amostra (Roush & Miller, 1986).

Manejo da resistência a baculovírus

Até o momento, não foram constatados casos de resistência a baculovírus após utilização destes agentes em campo. Em bioensaios realizados com populações de *A. gemmatalis*, provenientes de áreas logo após o tratamento com baculovírus, não foram observadas diferenças significativas quanto a sua CL_{50}, comparada com a de populações suscetíveis (D.R. Sosa-Gómez & F. Moscardi, não publicados). Estratégias para impedir ou retardar a ocorrência de casos de resistência, adotando

medidas racionais que alterem esses níveis de resistência, possibilitando controlar a praga, podem ser previstas. Todas as medidas passíveis de serem implementadas consistem, basicamente, em reduzir a pressão de seleção para evitar a seleção dos genótipos mais resistentes. Uma vez determinado que existe potencial para o desenvolvimento de resistência, as estratégias a serem adotadas podem ser:

1) utilizar dosagens mínimas efetivas para o controle das populações da praga;

2) alternar baculovírus com outras táticas de controle, como a utilização de *B. thuringiensis*, com o qual não ocorre resistência cruzada (Sosa-Gómez et al., 1992) ou reguladores de crescimento;

3) utilizar o controle com vírus em áreas descontínuas, chamadas aplicações em mosaico, porém a eficácia desta alternativa não tem sido avaliada extensivamente (Tabashnik, 1994);

4) utilização em conjunto com outros agentes de controle com efeito de sinergismo ou aditivo, tais como inseticidas convencionais em dosagens reduzidas (Shapiro & Bell, 1982; Moscardi & Sosa-Gómez, 1992; Silva, 1995);

5) utilização das interações com genótipos de plantas resistentes, cujo componente mais importante é a resistência por antibiose;

6) prover refúgio: a aplicação em mosaico, ou seja, áreas tratadas alternadas com áreas não tratadas, proporciona refúgio espacial. Os refúgios temporais consistem em deixar períodos sem tratar através do tempo, o que normalmente já se faz, devido ao fato das aplicações de baculovírus serem realizadas uma vez por ciclo da soja;

7) utilizar "superdosagens" para eliminar a maior parte dos indivíduos, deixando só alguns resistentes, os quais, por acasalamento com os suscetíveis imigrantes, podem gerar uma F1 de indivíduos suscetíveis. No entanto, para o sucesso desse método, há necessidade de se verificar a imigração de indivíduos suscetíveis para as áreas tratadas.

Considerando as observações realizadas nos bioensaios, é provável que indivíduos resistentes no último estádio larval sobrevivam às aplicações de doses muito elevadas, invalidando esta estratégia, principalmente quando as aplicações são

dirigidas contra populações que já colonizaram o campo há tempos, sendo heterogêneas. Nesse sentido, é importante que a aplicação do vírus seja realizada quando a maioria (> 90%) das lagartas ainda se encontra nos estádios iniciais, ou seja, instares 1 a 3 de desenvolvimento.

Conclusões

Embora em condições de laboratório o fenômeno de resistência tenha sido detectado, mediante pressão de seleção pelo VPNAg em populações de *A. gemmatalis*, não existem indícios de que ocorra resistência em campo. As aplicações preventivas de VPNAg, realizadas com o vírus isoladamente ou em mistura com herbicidas pós-emergentes, deverão ser avaliadas, já que através dessa prática se aumenta a freqüência e o período de exposição das populações da lagarta ao baculovírus, uma vez que essas aplicações dirigidas contra as populações muito baixas do hospedeiro podem estar sendo realizadas desnecessariamente. Essa prática tem se tornado de uso muito comum, por reduzir custos operacionais. A utilização de superdosagens do VPNAg não parece ser uma estratégia viável para o manejo de eventual resistência, pelas razões semelhantes às expostas por Tabashnik (1994) e devido a *A. gemmatalis* desenvolver resistência ao VPNAg em poucas gerações. Os estudos de monitoramento da resistência deverão receber maior ênfase frente ao incremento da área tratada com o vírus, ou naquelas regiões em que o controle tem sido praticado de forma constante. No futuro, serão necessários estudos de resistência sobre os vírus transformados (transgênicos) que expressam genes heterólogos com atividade inseticida.

Agradecimentos

Aos Drs. Celso Omoto e Alexandre J. Cattelan pela revisão do manuscrito e valiosas sugestões para o aprimoramento do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOT, A.R. Avaliação da resistência de *Anticarsia gemmatalis* Hübner 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) ao seu vírus de poliedrose nuclear, *Baculovírus anticarsia*. Curitiba: UFPR, 1993. 74 p. Dissertação de Mestrado.

ABOT, A. R. Parâmetros para a produção massal do vírus de poliedrose nuclear da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Curitiba: UFPR, 1997. 106 p. Tese de Doutorado.

ABOT, A.R.; MOSCARDI, F.; FUXA, J.R.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; RICHTER, A.R. Susceptibility of populations of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) from Brazil and United States to nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Entomological Science**, v.30, n.1, p.62-69, 1995.

ABOT, A.R.; MOSCARDI, F.; FUXA, J.R.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; RICHTER, A.R. Development of resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus under laboratory selection pressure. **Biological Control**, v.7, n.1, p.126-130, 1996.

BEEGLE, C.C.; OATMAN, E.R.. Differential susceptibility of parasitized and nonparasitized larvae of *Trichoplusia ni* to a nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.24, p.188-195, 1974.

BERINO, E. C.S. Determinação da atividade biológica de isolados geográficos e temporais de VPN de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidóptera: Noctuidae). Porto Alegre: UFRGS, 1995. 87 p. Dissertação de Mestrado.

BIRD, F.T. Transmission of some insect viruses with paticular reference to ovarial transmission and its importance in the development of epizootics. **Journal of Insect Pathology**, v.3, p. 352-380, 1961.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C. **Principles of insect pathology**. Norwell: Kluwer, 1998. 537p.

BOUCIAS, D.G.; JOHNSON, D.W.; ALLEN, G.E. Effects of host age, virus dosage, and temperature on the infectivity o nucleopolyhedrosis virus against velvetbean caterpilla, *Anticarsia gemmatalis*, larvae. **Environmental Entomology**, v.9, n.1 p.59-61, 1980.

BOUCIAS, D.G.; STOKES, C.; STOREY, G.; PENDLAND, J.C. The effects of imidacloprid on the termite *Reticulitermes flavipes* and its interaction with the mycopathogen *Beauveria bassiana*. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, Germany, v.49, n.2, p.103-144, 1996.

BRIESE, D.T. Insect resistance to baculoviruses. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A., ed. **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC Press, 1986. v.2, p.237-263

BRIESE, D.T.; MENDE, H.A. Differences in susceptibility to a granulosis virus between populations of the potato moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.71, p.11-18, 1981.

BRIESE, D.T.; MENDE, H.A. Selection for increased resistance to a granulosis virus in the potato moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera. Gelechiidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.73, p.1-9, 1983.

BRIESE D.T.; PODGWAITE, J.D. Development of viral resistance in insect populations. In: MARAMOROSCH K. E.; SHERMAN, K.E., ed. **Viral insecticides for biological control.** Orlando, FL: Academic Press, 1985. p.360-398

CABALLERO, P.; VARGAS OSUNA, E.; ALDEBIS, H.K.; SANTIAGO-ALVAREZ, C. Comparative susceptibility to baculoviruses of parasitized and non-parasitized noctuid larvae. In: ANNUAL MEETING. SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 21., 1988, San Diego and La Jolla, USA. **Abstracts**... San Diego: University of California, 1988. p.95.

DAVID, W.A.L. The granulosis virus of *Pieris brassicae* (L.) and its relationship with its host. **Advances in Virus Research**. New York, v.22, p.112-161. 1978.

FUXA, J.R. *Spodoptera frugiperda* susceptibility to nuclear polyhedrosis virus isolates with reference to insect migration. **Environmental Entomology**, College Park, v.16, p.218-223, 1987.

FUXA, J.R. Insect resistance to viruses. In: THOMPSON, S.N.; FEDERICI, B.A.; BECKAGE, N.E., ed. **Parasites and pathogens of insects.** New York: Academic Press, 1993. v.2, p.197-209.

FUXA, J.R.; ABOT, A.R.; MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; RICHTER, A.R.. Selection for *Anticarsia gemmatalis* resistance to NPV, and susceptibility of field populations to the virus. **Resistant Pest Management**, East Lansing, v.5, n.1, p. 39-41, 1993.

FUXA, J.R.; MITCHELL, F.L.; RICHTER, A.R.. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lep: Noctuidae) to a nuclear polyhedrosis virus in the field and laboratory. **Entomophaga**, Paris, v.33, n.1, p.55-63, 1988.

FUXA, J.R.; RICHTER, A.R. Response of nuclear polyhedrosis virus-resistant *Spodoptera frugiperda* larvae to other pathogens and to chemical insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, Duluth, v.55, p.272-277, 1990.

FUXA, J.R.; RICHTER, A.R. Lack of vertical transmission in *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus, a pathogen not indigenous to Louisiana. **Environmental Entomology**, Lanham, v.22, n.2, p.425-431, 1993.

FUXA, J.R.; RICHTER, A.R. Repeated reversion of resistance to nucleopolyhedrovirus by *Anticarsia gemmatalis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v.71, n.2, p.159-164, 1998.

GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E.. Factors influencing the evolution of resistance. In: NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Pesticide resistance:** strategies and tactics for management. Washington, D.C.: National Academy Press, 1986. p.157-169.

HAYASHIYA, K.; UCHIDA, Y.; HIMENO, M. Mechanism of antiviral action of red fluorescent protein (RFP) on nuclear polyhedrosis virus in silkworm larvae. **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology**, v.22, p.238-242, 1978.

IGNOFFO, C.M.; ALLEN, G.E. Selection for resistance to a nucleopolyhedrosis virus in laboratory populations of the cotton bollworm, *Heliothis zea*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.20, p.187-192, 1972.

IGNOFFO, C.M.; ROUSH, R.T. Susceptibility of permethrin- and methomyl-resistant strains of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to representative species of entomopathogens. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.79, p.334-337, 1986

INOUE, H.; MIYAGAWA, M. Regeneration of midgut epithelial cells the silkworm, *Bombyx mori*, infected with viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.32, n.3, p.373-380, 1978.

KAOMINI, M.; ROUSH, R.T. Absence of response to selection for resistance to nucleopolyhedrosis virus in *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomological Science**, Tifton, v.23, n.4, p.379-382, 1988

LEHANE, M.J. Peritrophic matrix structure and function. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.42, p.525-550, 1997.

LEPORE, L.S.; ROELVINK, P.R; GRANADOS, R.R. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.68, n.2, p.131-140, 1996.

MARTIGNONI, M.E.; SCHMID, P. Studies on the Resistance to Virus Infections in Natural Populations of Lepidoptera. **Journal of Insect Pathology**, New York, v.3, p.62-74, 1961.

MIKHAILOV, V.S.; ZEMSKOV, E.A.; ABRAMOVA, E.B. Protein synthesis in pupae of the silkworm *Bombyx mori* after infection with nuclear polyhedrosis virus: resistance acquired during pupal period. **Journal of General Virology**, Reading, v.73, n.12, p.3195–3202, 1992.

MORALES, L.; MOSCARDI, F.; SOSA-GOMEZ, D.R.; PARO, F.; SOLDORIO, I. Enhanced activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera : Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus by boric acid in the laboratory. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.26, n.1, p.115-120, 1997.

MORALES, L. ; MOSCARDI, F.; SOSA-GOMEZ, D.R.; PARO, F.; SOLDORIO, I. Aumento da atividade do vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* por branqueadores ópticos. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., 1998. Rio de Janeiro, RJ. **Anais:** Sessão de posteres. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz , 1998. p.179.

MOSCARDI, F. **Utilização de Baculovirus anticarsia para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*.** Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1983. 13p. (EMBRAPA-CNPSo. Comunicado Técnico, 23).

MOSCARDI, F. The use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.4, n.3, p.51-56, 1989.

MOSCARDI, F. Resistance of *Anticarsia gemmatalis* to its nucleopolyhedrosisvirus (AgNPV) and evaluation of substances that enhance viral activity. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., 1998. Rio de Janeiro, RJ. **Anais:** Conferências e Mesas Redondas. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz , 1998. p.421-425.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of Baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.44, p. 257-258, 1999.

MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D.R. Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. In: COPPING, L.G.; GREEN, M.B.; REES, R.T., ed. **Pest management in soybean.** Essex: SCI-Elsevier Applied Science, 1992. p.98-109.

MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D.R.. A case study in biological control: soybean defoliating caterpillars in Brazil. Chapter 17. In: BUXTON, D.; SHIBLES, R.; FORSBERG, R.A.; BLAD, B.L.; ASAY, K.H.; PAULSEN, G.M.; WILSON, R.F., ed. **International crop science**. Madison: Crop Science Society of America, 1993. p.115-119.

MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D.R. Progress in implementing soybean IPM in Brazil and biotechnological perspectives to improve de programme. In: PRESLEY, G.J., ed. **Biotechnology and integrated pest management.** Wallingford: CAB International, 1996. p. 98-112. (Biotechnology in Agriculture, 15).

NEVES, P.; ALVES, S.B. Patologia e controle do cupim de montículo *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) com fungos. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., 1998. Rio de Janeiro, RJ. **Anais:** Conferências e Mesas Redondas. Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz , 1998. p. 88-92.

OMOTO, C.; ALVES, S.B. Mecanismos de defesa de insetos contra entomopatógenos. In: ALVES .S.B., ed. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap.3, p..55-73.

PENG, F.; FUXA, J.R.; JOHNSON, S.J.; RICHTER, A.R. Susceptibility of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), reared on four host plants, to a nuclear polyhedrosis virus. **Environmental Entomology**, Lanham, v.26, n.4, p. 973-977, 1997.

REESON, A.F; WILSON, K.; GUNN, A.;hallS, R.S.; GOULSON, D. Baculovirus resistance in the noctuid *Spodoptera exempta* is phenotypically plastic and responds to population density. **Proceedings of the Royal Society of London . B**, v.265, p.1787-1791, 1998.

RICHTER, A.R.; FUXA, J.R.; ABDEL-FATTAH, M. Effect of host plant on the susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to a nuclear polyhedrosis virus. **Environmental Entomology**, Lanham, v.16, p.1004-1006, 1987.

ROBERTSON, JL ; PREISLER, H.K.; NG S.S. ; HICKLE, L.A.; GELERTNER, W.D. Natural variation: a complicating factor in Bioassays with chemical and microbial pesticides. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.88, n.1, p.1-10, 1995.

ROUSH, R.T.; DALY, J.C. The role of population genetics in resistance research and management. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E., ed. **Pestice resistance in arthropods**. New York : Chapman andhall, 1990. p. 97-152.

SCOTT, J.G. Investigating mechanisms of insecticide resistance: methods, strategies, and pitfalls. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK., B.E., ed. **Pestice resistance in arthropods**. New York: Chapman andhall, 1990. p.39-57.

SHAPIRO, M.; BELL, R.A. Enhanced effectiveness of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantridae) nucleopolyhedrosis virus formulated with boric acid. **Annals of the Entomological Society of America**, College, Park, v.75, p.346-349, 1982.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; ABOT, A.R.; MOSCARDI, F.; PARO, F.E. ; SOLDORIO, I. Susceptibilidade de diferentes instares de *Anticarsia gemmatalis* ao *Bacillus thuringiensis* e avaliação da resistência cruzada em populações resistentes ao *Baculovirus anticarsia*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3., 1992, Águas de Lindoia, SP. **Resumos**... Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1992. p.193.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; ALVES, S.B.; MARCHINI, L.C. Variation in the susceptibility of *Bombyx mori* to nuclear polyhedrosis virus when reared on diferent mulberry genotypes. **Journal of Applied Entomology**,hamburg, v.111, n.3, p.318-320, 1991.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; PEREIRA, R.M.; ALVES, S.B. Impacto ambiental de entomopatógenos. In: ALVES. S.B., ed. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.1075-1095.

SOSA-GOMEZ, D.R.; MOSCARDI, F. Desenvolvimento de resistência de insetos a Baculoviroses. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4., 1994, Gramado, RS. **Anais**: Conferências e Mesas Redondas. Pelotas: EMBRAPA CPACT, 1994. p.85-90.

TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.39, p.47-79, 1994.

TANADA, Y.; KAYA, H.K. **Insect pathology**. New York: Academic Press, 1993. 666 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Insecticides. W.H.O. Technical Report Series, 125. Geneve, 1957.

7

TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS E CONTROLE BIOLÓGICO DE *RHIZOCTONIA SOLANI* E *PYTHIUM* SPP.

Itamar Soares de Melo

Jane L. Faull

INTRODUÇÃO

Os patógenos habitantes do solo são parasitas não-especializados que utilizam matéria orgânica como substrato e apresentam uma alta capacidade saprofítica, uma característica fisiológica herdável, que pode vencer a competição e colonizar resíduos vegetais no solo.

"Tombamento" ou a denominação mais conhecida "*damping-off*" é uma doença de plântulas causada por qualquer agente, fazendo com que as plântulas murchem e morram. Pode ocorrer em pré ou pós-emergência.

Espécies de *Pythium* e *Rhizoctonia* são os mais importantes agentes causais, embora espécies de *Fusarium, Phytophthora, Rhizopus, Alternaria, Botrytis, Sclerotinia, Mycosphaerella* e muitas outras possam também causar tombamento. A maioria desses agentes é também responsável por podridões radiculares, doenças estas que ocorrem mais comumente em solos pesados e em solos orgânicos e são favorecidas por alta umidade. *Pythium* é o mais importante agente causal de tombamento de pré e pós-emergência, estando várias espécies envolvidas, como: *P. ultimum, P. debaryanum, P. irregulare* e *P. aphanidermatum*. O fungo também causa podridão de sementes, podridões radiculares e podridão mole em frutos maduros em contato com o solo.

P. ultimum germina e cresce rapidamente em solos úmidos na presença de exsudados da planta hospedeira. O fungo penetra rapidamente nos tecidos das plantas e, portanto, escapa do efeito antagônico de bactérias do solo.

A quantidade de exsudados liberados por plantas de feijoeiro, por exemplo, está relacionada com a suscetibilidade ao tombamento de pré-emergência causado por *R. solani* e *P. ultimum* (Schroth & Cook, 1964). Alta umidade do solo suporta rápida liberação de exsudados e rápido crescimento de hifas de *P. ultimum*. Segundo Stanghellini & Hancock (1971) este crescimento chega a 300mm por hora e, dentro de 6 horas, o crescimento miceliano é abundante ao redor da semente, lesionando os cotilédones num período de 24 horas.

Variedades geneticamente resistentes a *Phytium* não têm sido obtidas para muitas culturas importantes e o controle do patógeno tem ocorrido através de diversas práticas de manejo. Como a severidade da doença é maior em solos extremamente úmidos, é prática aconselhável proceder-se a uma boa drenagem do solo. Lumsden & Ayers (1975) verificaram que uma secagem rápida é suficiente para matar esporângios e oosporos de parede celulares finas sem, contudo, afetar oosporos de paredes mais espessas. Os autores argumentam ser difícil haver uma secagem rápida na natureza.

A rotação de culturas é outra prática importante, que evita um aumento na população do patógeno. Em condições de campo, especialmente quando o solo é infestado, métodos preventivos, como o tratamento de sementes com o fungicida sistêmico metalaxil, têm dado resultados satisfatórios, muito embora este produto tenha sido investigado como contaminante de solo e águas. Ademais, tem-se descoberto resistência de espécies de *Pythium* a metalaxil (Sanders, 1984).

Patógenos que causam tombamento de plântulas atacam seus hospedeiros por um período de tempo muito curto, durante a fase juvenil da planta. Além disso, agentes de biocontrole podem ser introduzidos no solo mantendo uma alta densidade populacional por alguns dias ou até mesmo poucas semanas, não necessitando, portanto, de sucessivas aplicações do antagonista. *Pythium ultimum* invade sementes utilizando-se de açúcares liberados durante a germinação. Um antagonista que apresenta um crescimento extremamente rápido, quando aplicado às sementes, pode

usar estes exsudados, dominar a espermosfera e aumentar a densidade populacional. Antes de introduzir o leitor aos métodos de biocontrole de *R. solani* e *Pythium*, será brevemente apresentado como se proceder a um diagnóstico de doenças incitadas por esses patógenos.

DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS DE SOLO: declínio e tombamento

Como patógenos de solo são geralmente polífagos, o mesmo tipo de patógeno infecta diferentes tipos de culturas e causa sintomas similares. Por outro lado, patógenos de solo atacam o sistema radicular próximo à superfície do solo e inibem o crescimento da planta.

1) Ocorrência no estádio inicial de crescimento

a) Germinação é impedida (tombamento de pré-emergência causado por *Rhizoctonia solani*)

b) Após a germinação, o hipocótilo acima do solo apresenta condição de encharcamento, desidrata rapidamente, torna-se fino e tomba. Este é o caso comum de tombamento em pepino, por *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp.

c) Após a germinação, o hipocótilo acima do solo torna-se de cor marrom, há o colapso e morte da planta. É o caso típico causado por *R. solani*.

d) O hipocótilo e o sistema radicular próximo à superfície do solo ficam de cor escura, em geral marrom e preto, e as plântulas ficam constritas à linha do solo e murcham. São exemplos desse grupo *Phoma*, em repolho e *Aphanomyces raphani*, em rabanete e repolho.

2) Ocorrência a partir da metade ao final do estádio de crescimento

a) A raiz torna-se marrom a preta. Às vezes a planta morre. Exemplos: *Phytophthora fragariae* em morango; podridão radicular de fejoeiro por *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*; podridão da haste do feijoeiro por *Rhizoctonia solani*; podridão radicular de ervilha por *Aphanomyces euteiches*.

b) Manchas de cor marrom/preta aparecem em uma parte do tubérculo ou raiz tuberosa. Exemplos: *black surf* da batata e cenoura causada por *R. solani*; podridão preta da batata-doce por *Ceratocystis fimbriata*.

A natureza do patógeno é provavelmente o principal fator quanto às

estratégias de controle.

Um agente de biocontrole pode facilmente ser favorecido para reduzir a incidência de uma doença por um curto período, porém, sem fornecer uma supressão duradoura. Interessante seria a combinação de antagonistas, cada um deles inibindo o patógeno durante diferentes fases do seu ciclo de vida. Por exemplo, um agente de biocontrole pode não parasitar diferentes estruturas morfológicas de um patógeno, como *Pythium, Sclerotinia, Fusarium*, etc.

ESTRATÉGIAS DE MANEJO E FATORES QUE CONTRIBUEM PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE *PYTHIUM* SPP. E *RHIZOCTONIA SOLANI*

Adição de matéria orgânica - A incorporação de matéria orgânica ao solo tem contribuído como uma forma de controle biológico, uma vez que estes materiais estimulam a atividade microbiana competitiva. Garret (1970) listou alguns atributos que contribuem para o sucesso de fungos como saprófitas competitivos: a) germinação rápida de propágulos e rápido crescimento miceliano; b) produção de enzimas apropriadas para utilização de substratos; c) liberação de substâncias fungistáticas ou bacteriostáticas, a fim de reduzir o crescimento de competidores e d) tolerância a substâncias deletérias produzidas por outros organismos dentro do substrato. Além disso, o processo de fungistase no solo é estimulado pela suplementação de matéria orgânica. As formas de matéria orgânica mais usadas na agricultura são o esterco de gado ou de galinha. A incorporação de matéria orgânica verde, celulose e quitina também tem sido objeto de estudo e usada no controle de fitopatógenos (Hornby, 1978). Papavizas & Davey (1960) demonstraram que populações de microrganismos do solo, particularmente actinomicetos, antagonistas a *R. solani*, aumentam em resposta à incorporação de matéria orgânica. Controle efetivo de *Pythium* por adição de casca de árvores foi atribuído ao aumento na atividade da população de microrganismos mesofílicos e concentrações reduzidas de nutrientes disponíveis (Chen et al., 1988).

O tombamento de plântulas de pinus causado por *P. aphanidermatum* e *R. solani* foi controlado em viveiros através da incorporação de serragem, casca de

árvore de pinus, esterco de curral e turfa (Huang & Kuhlman, 1991). Cook & Baker (1983) comentam que, por centenas de anos, os agricultores chineses rotineiramente têm incorporado matéria orgânica ao solo como fertilizante. Esta matéria orgânica deve ser responsável pela ausência de importantes doenças radiculares.

Efeito do pH - Em geral, o pH da maioria dos solos brasileiros favorece a atividade de alguns agentes de controle biológico. *Trichoderma* e *Gliocladium*, por exemplo, são geralmente favorecidos em solos ácidos (Liu & Baker, 1980; Martins-Corder & Melo, 1998). No entanto, o micoparasita *Pythium nunn* tem sua atividade antogônica mais favorecida em pH 7.3 do que em pH 5.0 (Lifshitz et al., 1984).

A prática agrícola da calagem tem aumentado a incidência e severidade do *mal-do-pé* de trigo em solos ácidos da Austrália (Garrett, 1970). No Brasil, mais precisamente no Sudeste, a correção da acidez do solo de 4.7 para 6.7 favoreceu a fixação biológica de N_2 em soja por *Rhizobium* (Reis et al., 1982). Tem-se verificado que a calagem reduz a capacidade de solos tratados com sulfato de amônia de suprimir o crescimento saprofítico de *Gaeumannomyces graminis* (Simon et al., 1988). Nesses tipos de solos corrigidos, a atividade de *Trichoderma* spp. é reduzida.

O pH do solo também influencia o processo de infecção em plantas de trigo causado por *Pythium*. Fukui (1988), citado por Rovira et al. (1990), demonstrou que, quando solos levemente alcalinos foram acidificados, a colonização do embrião de sementes de trigo por *Pythium* foi superior e quando o pH de um solo ácido foi aumentado a colonização diminuiu.

As associações micoparasíticas são afetadas, portanto, por fatores ambientais, como temperatura, pH, umidade, tipo de solo, radiação solar, nutrição etc. Microrganismos isolados e selecionados para controlar um determinado patógeno em um determinado ecossistema, possivelmente não expressariam seus potenciais atributos em outro habitat, com fatores ecológicos diversos. Daí porque muitos programas de controle biológico não mostraram o sucesso esperado.

Solos supressivos

Solos supressivos são definidos como aqueles solos em que o desenvolvimento de uma dada doença é suprimido quando o patógeno responsável

está presente ou é introduzido na presença de um hospedeiro suscetível (Schneider, 1982). Nos solos supressivos, o controle biológico ocorre naturalmente. *Phymatotrichum omnivorus* não sobrevive em condições de clima frio. Bruehl (1987) comenta que se este fungo fosse introduzido em todos os solos de Wisconsin ele não se estabeleceria. *Typhula idahoensis*, cuja população aumenta em condições extremamente frias, poderia ser disseminado em todos os solos da Luisiana e não se estabeleceria.

Em seu livro "Soilborne Plant Pathogens", Bruehl (1987) discute que os efeitos dos fatores físicos e químicos, como temperatura, pH, textura do solo, umidade e salinidade, não deveriam ser incluídos nos exemplos de solos supressivos.

Nessa mesma linha de idéias, Baker & Chet (1982) afirmam que os fatores físicos não se reproduzem e, portanto, seria frutífero estudar a supressão de doenças relacionadas a entidades biológicas.

Supressão de determinadas doenças pode ocorrer em sistemas de monocultivos. Em monocultura, evidencia-se um aumento inicial na incidência da doença, seguido por um declínio expontâneo à medida que se sucedem os anos de monocultura. Este é um fenômeno chamado de supressão específica, que é efetiva contra somente um patógeno, não afetando a severidade de outras doenças do mesmo hospedeiro. Há casos bem documentados para a cultura de trigo, envolvendo *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici*.

Do ponto de vista do agronegócio, seria impraticável encorajar este tipo de manejo agrícola, suportando altos níveis de incidência da doença nos primeiros anos, na esperança de assegurar um nível de controle da doença em anos subseqüentes.

Muitos outros exemplos de solos supressivos são discutidos por diversos autores (Baker & Cook, 1974; Schneider, 1982; Bruehl, 1987; Reis, 1991).

Em solos agrícolas onde *Pythium* e *Rhizoctonia* têm suas populações aumentadas devido à incorporação de restos de culturas ao solo, outros microrganismos saprofíticos não-patogênicos também são favorecidos, podendo atuar parasitando propágulos desses patógenos ricos em celulose, quitina, glucanas etc. Com o tempo, a população de microrganismos antagonistas já adaptados pode evitar que os danos às culturas sejam minimizados. São, pois, a esses locais específicos que

a busca de agentes potenciais de biocontrole pode ser dirigida.

P. graminicola está associado com a chamada "sindrome de raízes pobres" de cana-de-açúcar. *In vitro*, muitas bactérias inibem esse fungo, mas individualmente elas não são efetivas em condições de campo (Birch, 1986). O uso da supressividade para controle econômico neste caso seria muito difícil. Esses tipos de solos são, todavia, difíceis de serem identificados. Raízes de plantas sadias crescendo em solos infestados podem ser examinadas para isolamento de microrganismos. Recomenda-se isolar microrganismos da rizosfera e do rizoplano (superfície das raízes) em meios de cultura seletivos para bactérias, actinomicetos e fungos. Microrganismos endofíticos podem estar envolvidos na supressão de doenças de plantas e, portanto, não devem ser esquecidos por ocasião do isolamento. Uma vez que várias linhagens tenham sido isoladas, estas devem ser testadas quanto à sua eficiência em ecossistemas naturais.

A requeima de rabanete causada por *Rhizoctonia* em solos argilosos aumentou por três plantios sucessivos e, depois, houve um declínio. Henis et al. (1978) observaram que o declínio da doença ocorre somente quando o patógeno está presente e ativo. Diminuição da população de *R. solani* ocorre se o solo contém o patógeno e não a planta hospedeira, ou o hospedeiro sem o patógeno. Explorando as mudanças na microflora associada, os autores observaram um aumento na população de *Trichoderma* spp. À medida que o declínio de *Rhizoctonia* se intensifica, o número de *Trichoderma* spp. aumenta. Uma outra espécie de *Trichoderma*, *T. hamatum*, foi encontrada em altas densidades em um solo orgânico da Colômbia, que foi supressivo a *R. solani* (Chet & Baker, 1980). Este fungo conferiu supressividade quando incorporado a um solo condutivo ao patógeno.

Micoparasitismo

O micoparasitismo envolve a interação direta de um fungo (o micoparasita) com outro (o hospedeiro). A relação hospedeiro-parasita é caracterizada por um período relativamente longo de contato que pode ser físico ou metabólico. Normalmente, a relação é específica. Os habitats disponíveis para parasitas obrigatórios são limitados aos hospedeiros disponíveis. Em alguns casos, a especificidade do

hospedeiro depende das propriedades da superfície dos organismos que permitem o ataque físico do parasita à células hospedeiras. Exemplos de combinações micoparasíticas envolvendo fungos que causam tombamento de plantas são ilustrados na Tabela 2. Muitos destes parasitam uma gama de hospedeiros, como é o caso dos antagonistas *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* spp. Outros parasitam um número limitado de hospedeiros, como *Sporidesmium sclerotivorum, Coniothyrium minitans* e *Pythium oligandrum*. Segundo observaram Barnett & Binder (1973), os micoparasitas variam significativamente no seu modo de obter nutrientes e outros atributos biológicos, tendo de um lado os chamados biotróficos, altamente especializados, freqüentemente obrigatórios que não causam dano aparente aos seus hospedeiros e, no outro extremo, os netrotróficos, que matam seus hospedeiros imediatamente antes ou após a invasão e utilizam nutrientes das células mortas.

A maior parte do parasitismo de patógenos que causam tombamento de plântulas, como *Pythium* spp., *R. solani, F. solani* etc., pertence à última classe, ou seja, micoparasitismo necrotrófico. Nesse tipo de micoparasitismo, a invasão do parasita é iniciada por enrolamento de hifas em volta das células hospedeiras (Figura 1) ou através da penetração direta da hifa ou ainda através de estruturas de sobrevivência (Figura 2), resultando em rápida destruição. O contato também pode se dar por apressório ou ramificações semelhantes a ganchos (Figura 3). A morte do hospedeiro pode ser induzida por toxinas produzidas pelo micoparasita que pode também produzir enzimas hidrolíticas (quitinases, β-1,3-glucanase, celulase e hemicelulase) responsáveis pela quebra da parede celular.

O enrolamento ou crescimento de um fungo sobre outro pode não estar correlacionado com a capacidade micoparasítica (Lifshitz et al., 1984), como no caso do parasitismo mútuo de *Trichoderma* spp. *in vitro* (Vajna, 1985) e auto-invasão de oosporos por *Pythium myriotylum* (Drechsler, 1943).

A natureza da interação pode variar mesmo numa simples combinação parasita-hospedeiro e é afetada por diversos fatores, como isolados dos fungos envolvidos, condições ambientais e idade do micélio (Jeffries & Young, 1994). Observações sobre interações entre o micoparasita e seu potencial hospedeiro podem ser visualizadas em culturas pareadas, em meio de cultura ou em solos esterilizados.

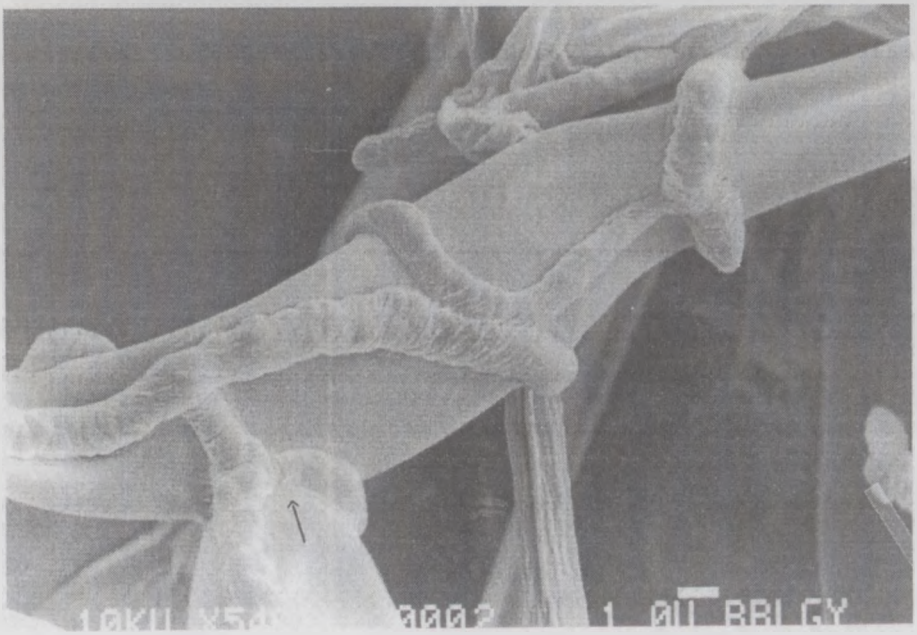


FIGURA 1. Parasitismo de *Rhizoctonia solani* por *Trichoderma harzianum*, observado em microscopia eletrônica de varredura (Melo & Faull, 2000).

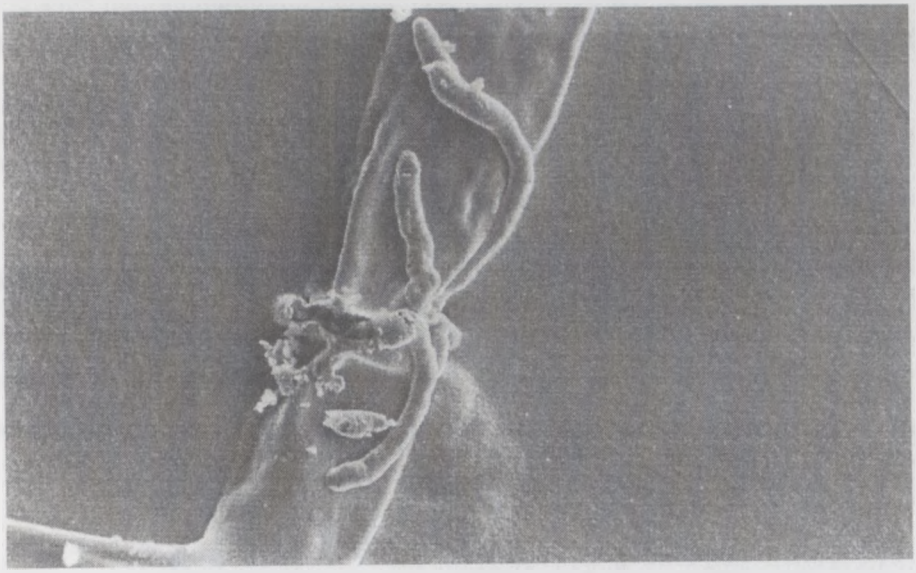


FIGURA 2. Microfotografia de parisitismo de *Rhizoctonia solani* por *Trichoderma harzianum*, observada em microscopia eletrônica de varredura. A fotografia mostra a penetração direta do micoparasita na infa hospedeira (Melo & Faull, 2000).

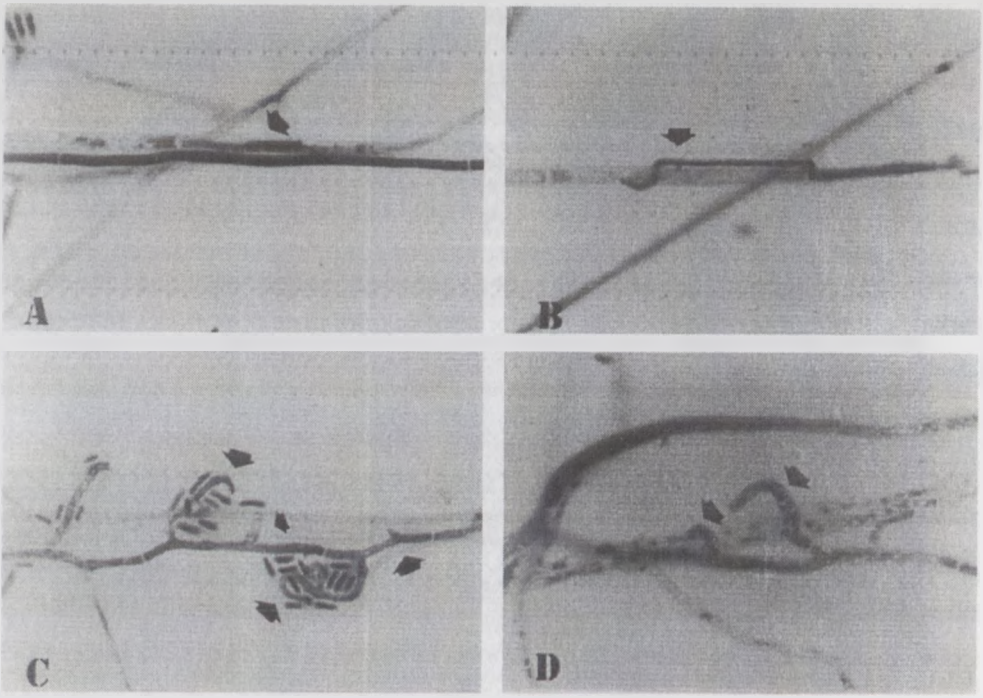


FIGURA 3. Interação de hifas de *Trichoderma* spp. (coradas mais intensamente) e *Verticillium dahliae* (hifas claras).
A) crescimento em contanto íntimo *do Trichoderma e Verticillium;*
B) crescimento do antagonista ao longo da hifas hospedeiras, porém a ponto da hifa *Trichoderma* enrolar-se em *Verticillium*;
C) Formação de ganchos e rede de hifas sobre conídios de *Verticillium*;
D) Ganchos de *Trichoderma* (Martins-Corder & Melo, 1998).

Os estudos sobre micoparasitismo *in vitro* ou em solo esterilizado, realizados, em geral, como meio para seleção de potenciais antagonistas devem ser conduzidos com posterior repetição dos ensaios experimentais *in vivo*, já que os estudos *in vitro* recaem em associações artificiais com completa ausência da complexa interação biológica e das condições fisico-químicas do solo.

Adição de antagonistas

Como ilustrado na Tabela 1, fungos e bactérias têm sido documentados como antagonistas a espécies de *Pythium* e *Rhizoctonia*. No entanto, poucos deles têm se mostrado eficientes como agentes de biocontrole. Exemplos destes, incluem: *Pythium oligandrum, P. nunn, Trichoderma* spp., *Gliocladium virens, Pseudomonas* do grupo *putida – fluorescens* e *Bacillus*. Da lista de produtos liberados para uso nos Estados Unidos, merecem destaque os agentes de controle de doenças que causam tombamento de plântulas (Tabela 1).

TABELA 1. Agentes microbianos de controle de "tombamento de plântulas" registrados nos Estados Unidos pela Agência de Proteção Ambiental (EPA)[a].

Pesticida microbiano (ingrediente ativo)	Número de registro na EPA	Produtos registrados		Doença controlada
		Ano	N°	
Bacillus subtilis				
GB03	129068	1992	3	Tombamento
MB1600	129082	1994	1	Tombamento
Pseudomonas cepacia	***006419***	***1992***	***2***	***Tombamento e nematóides***
Pseudomonas fluorescens				
EG1053	006440	1988	2	Tombamento
Streptomyces griseovirides				
K61	**129069**	**1993**	**5**	**Tombamento *Pythium***
Gliocladium virens				
GL-21	129000	1990	2	***Rhizoctonia***
Trichoderma harzianum				
RL-AG2	119202	1990	4	Tombamento

[a] Produtos registrados até 1995, segundo Cook et al. (1996).

Como já foi discutido, as culturas suscetíveis, como as olerícolas, podem ser manejadas em condições controladas de casa-de-vegetação, nas quais recebem os cuidados necessários para favorecer a atividade dos agentes de biocontrole. Outros pesticidas são disponíveis comercialmente para controle de patógenos que causam tombamento de plântulas, como, por exemplo, os produtos denominados "*Trichodex*" (a base de *Trichoderma*) e "*Polygandron*" (a base de *Pythium oligandrum*).

P. olingandrum tem sido documentado como um agente de biocontrole de vários patógenos de solo. Dreschler (1946) observou que *P. oligandrum* raramente ocorre isoladamente, mas sempre associado com fitopatógenos virulentos. *P. oligandrum, P. acanthicum* e *P. periplocum* invadem e destroem hifas de *P. ultimum*. Segundo Deacon & Henry (1980), *P. oligandrum* é um antagonista relativamente não-especializado, especialmente porque hifas jovens de muitos fungos são suscetíveis. Uma discussão mais exaustiva sobre *P. oligandrum* pode ser encontrada em Melo (1998).

A redução significativa na incidência do tombamento de plântulas de cana-de-açúcar causado por *Pythium ultimum* foi alcançada através de uma preparação de oosporos de *P. oligandrum* aplicados às sementes (Veseley, 1977; Al-hamdani et al., 1983). Também, *P. ultimum* foi controlado em solos naturalmente infestados através da incorporação de *P. oligandrum* às sementes de agrião impregnadas com carboximetilcelulose (Al-Hamdani et al., 1983). O crescimento do micoparasita na superfície das sementes cria uma camada protetora na espermosfera. Os modos específicos de ação de *P. oligandrum* envolvem tanto o micoparasitismo como a competição por nutrientes (Martin & Hancock, 1986; 1987).

P. ultimum também tem sido controlado com uma outra espécie de *Pythium, P. nunn*, que foi primeiramente isolado de um solo supressivo àquele patógeno (Lifshitz et al., 1984) e que também parasita muitos outros patógenos, particularmente *Phytophthora* e *R. solani*. O mecanismo envolvido no antagonismo de *P. nunn* está relacionado à ação enzimática, com produção de β-1,3-glucanase e celulase (Elad et al., 1985).

TABELA 2. Exemplos de combinações parasitas-hospedeiros para patógenos que causam tombamento de plântulas.

HOSPEDEIRO	MICOPARASITA	REFERÊNCIA
Rhizoctonia solani	*Verticillium biguttatum*	Van den Boogert et al. (1989)
	Bacillus subtilis	Kloepper (1991)
	Trichoderma koningii	Melo & Faull (2000)
	Trichoderma harzianum	Melo & Faull (2000)
	Penicillium vermiculatum	Boosalis (1956)
	Populaspora stoveri	Warren (1948)
	Gliocladium virens	Howell (1982)
	Penicillium oxalicum	Huang & Kuhlman (1991)
	Acrophia lophora	Turhan & Turhan (1989)
	Neocosmopora	Turhan & Turhan (1989
	Myrothium spp.	Turhan & Grossmann (1994)
	Pseudomonas putida	Harris et al. (1997)
	Rhizoctonia binucleada	Harris et al. (1997)
	Stachybotrys elegans	Benyagoub et al. (1994)
	Pythium nunn	Elad et al. (1985)
Pythium spp.	*Pythium oligandrum*	Al-Hamdani et al. (1983)
P. ultimum		
	P. acanthicum	Drechsler (1943)
	P. periplocum	
	P. nunn	
	Penicillium claviforme	Thompson & Burns (1989)
	Enterobacter clocae	Nelson et al. (1986)
	Dactylella spermatophaga	Drechsler (1946)
	Laetisaria arvalis	Burdsall et al. (1980)
P. aphanidermatum	*Penicillium oxalicum*	Huang & Kuhlamn (1991)
Pythium graminicolum	*Trichothecium arrhenopus*	Drechsler (1943)
P. ultimum	*Gliocladium virens*	Howell & Stipanovic (1983)
P. ultimum var. sporangiiferum	*Rhizoctonia binucleada*	Harris et al. (1997)
P. aphanidermatum	*Pseudomonas cornegata*	Rankin & Paulitz (1994)
	Pseudomonas fluorescens	Rankin & Paulitz (1994)
P. debaryanum	*Pythium oligandrum*	Drechsler (1946)
Pythium spp.	*Trichoderma hamatum*	Chet et al. (1981)
Pyhium spp.	*Pythium nunn*	Elad et al. (1985)
	Pythium acanthicum	Deacon & Henry (1978)
	Penicillium oxalicum	Windels (1981)

O controle efetivo de *P. ultimum* e de outras espécies de *Pythium* e de *R. solani*, tanto em condições de casa-de-vegetação como em laboratório, tem sido bem documentado por vários investigadores usando os fungos *Trichoderma* spp. e *Gliocladium virens* (Chet, 1987; Melo, 1996; Elad et al., 1982; Papavizas, 1985).

Trichoderma e *Gliocladium* são micoparasitas necrotróficos atuando no controle biológico de *Pythium* e de *R. solani* através da antibiose, ação enzimática e competição. As paredes celulares de *Pythium* são compostas principalmente por celulose, enquanto as de *R. solani* por β-1,3-glucana e quitina. *Trichoderma harzianum* se desenvolve nas paredes das células de *R. solani* como única fonte de carbono (Hadar et al., 1979). A incorporação de quitina ao solo pode aumentar a eficácia de *T. hamatum*, com correspondente redução de *Pythium* spp. e de *R. solani* (Harman et al., 1981). A simples introdução de *G. virens* a uma mistura livre de solo, em condições de casa-de-vegetação, foi suficiente para controlar totalmente o tombamento de zínia causado por *P. ultimum* e por *R. solani* (Lumsden & Locke, 1989).

Tanto *P. ultimum* como *R. solani* causam severos danos às sementes de algodão durante a germinação e emergência em baixa temperatura. *Gliocladium virens*, quando introduzido em um solo infestado com *R. solani* e *P. ultimum,* tem reduzido a germinação de escleródios de *R. solani* (Howell, 1982) e parasitado escleródios e hifas de *R. solani*. Em contraste, o micoparasita não parasitou *P. ultimum*, mas o protoplasma deste se desintegrou na presença de antibióticos produzidos por *G. virens*.

No caso particular de tombamento de plântulas por *Pythium* spp., tem-se verificado que seus esporângios germinam rapidamente e infectam sementes dentro de 4-6 horas após o plantio (Stasz et al., 1980). Por outro lado, esporos de *Trichoderma* só germinam 14 horas após o plantio. No entanto, quando sementes tratadas com esse antagonista são pré-germinadas 12-24 horas antes do plantio, o controle do patógeno é estabelecido com sucesso (Lifshitz et al., 1986; Chet, 1987).

O leitor pode encontrar mais casos de controle biológico de *R. solani* por *Trichoderma* e *Gliocladium* em Papavizas (1985), Chet (1987) e Melo (1996). Atualmente, atenção especial tem sido dada a bactérias do gênero *Pseudomonas*, mais especificamente as do grupo *P. fluorescens – P. putida*. Este grupo de bactérias apresenta atributos que as colocam como agentes potenciais para serem utilizadas

na agricultura. Esses atributos incluem controle de doenças de plantas, às vezes associadas com solos supressivos, promoção do crescimento de plantas, aumento da germinação de sementes, absorção de nutrientes, mineralização de pesticidas etc. Produção de antibióticos e de sideróforos no rizoplano e/ou rizosfera são considerados fatores importantes que determinam o sucesso como bioprotetores (Kloepper et al., 1980; Schippers et al., 1987; Suslow, 1982; Weller, 1988; Melo, 1998). Sideróforos são compostos extracelulares de baixo peso molecular com uma alta afinidade por ferro férrico. A capacidade dessas bactérias de seqüestrar ferro fornece uma vantagem competitiva aos microrganismos, evidenciando, em muitos casos, que sideróforos podem ser o fator responsável pelo controle biológico (Schippers et al., 1987; Kloepper et al., 1980).

O tombamento de pré-emergência de ervilha pode ser controlado efetivamente através da microbiolização de sementes com esporos de *Penicillium oxalicum*. Observações microscópicas revelaram que dentro de dois dias há formação de um manto de hifas sobre as sementes e, dentro de 3 dias, tem início a esporulação (Windels, 1981). Em condições naturais de campo, conídios de *P. oxalicum* sobre raízes não germinaram num período de 1,5 a 2 semanas após o plantio. Do mesmo modo, sementes de grão-de-bico impregnadas com esporos desse antagonista foram protegidas do ataque de *P. ultimum* (Kaiser & Hannan, 1984). O controle foi tão efetivo quanto o tratamento de sementes com captan. Windels (1981) comenta que os exsudados das sementes existem em quantidades suficientes para estimular e suportar o crescimento de *P. oxalicum*, porém esporos localizados longe das sementes não germinam.

O biocontrole de doenças causadas por *Pythium* spp. e *R. solani* tem sido alcançado com *Pseudomonas* e *Bacillus* em diversas culturas importantes, como algodão, beterraba, pepino, trigo, tulipa etc. Também aqui os mecanismos de controle por rizobactérias incluem antibiose, competição e parasitismo. *Bacillus subtilis* tem sido utilizada com bastante sucesso no controle de *Pythium* e *Rhizoctonia*, existindo à disposição no mercado o produto comercial "kodiak". A bactéria apresenta a vantagem de possuir endosporos, estruturas de sobrevivência que são termotolerantes e resistentes à dessecação, além de produzir uma gama de antibióticos com atividade

contra uma série de fitopatógenos. *B. subtilis*, além de atuar por antibiose (Figura 4) e parasitismo, onde células da bactéria se aderem à parede da hifa hospedeira (Figura 5).

Para que agentes de biocontrole sejam efetivos, é essencial que cresçam, proliferem e, desse modo, sejam competitivos com a microbiota do solo. Linhagens de *Pseudomonas* podem colonizar rapidamente sítios específicos do sistema radicular e da rizosfera, como também a espermosfera, atuando como barreira à infecção por fitopatógenos. Além da antibiose, certas espécies de *Pseudomonas*, particularmente as do grupo fluorescente (*P. fluorescens – putida*) produzem sideróforos na rizosfera, privando e inibindo o crescimento de outros microrganismos, inclusive fungos usados no biocontrole, como *Trichoderma* spp. Como visto, o tratamento de sementes com um agente dessa natureza pode fornecer uma proteção razoável à semente em germinação.

Com relação à antibiose, James & Gutterson (1986) demonstraram que o antibiótico oomicina A, produzido por *P. fluorescens* Hv37a, efetivo contra *P. Ultimum*, é regulado por glucose. Um mutante (Hv 37a R2) obtido a partir da linhagem Hv37a e mutantes deficientes na produção de antibióticos (Afu⁻) foram testados para comprovar o envolvimento direto desse antibiótico na supressão de doenças, em condições naturais (Howie & Suslow, 1991). Aproximadamente 70% da redução da infecção em algodão, causada por *Pythium*, pode ser atribuída ao antibiótico da linhagem Hv37aR2. A competição como mecanismo de controle biológico por rizobactérias envolve competição por sítios de infecção e nutrientes. É sabido que *Pseudomonas* catabolizam diversos nutrientes e moléculas xenobióticas e têm crescimento rápido. Osburn et al. (1989) demonstraram que competição por sítios de infecção estava envolvida no controle de *P. ultimum* em beterraba açucareira, por *P. putida*. O controle resultou da proteção do pericarpo dada pela bactéria através da ocupação dos sítios de infecção do patógeno.

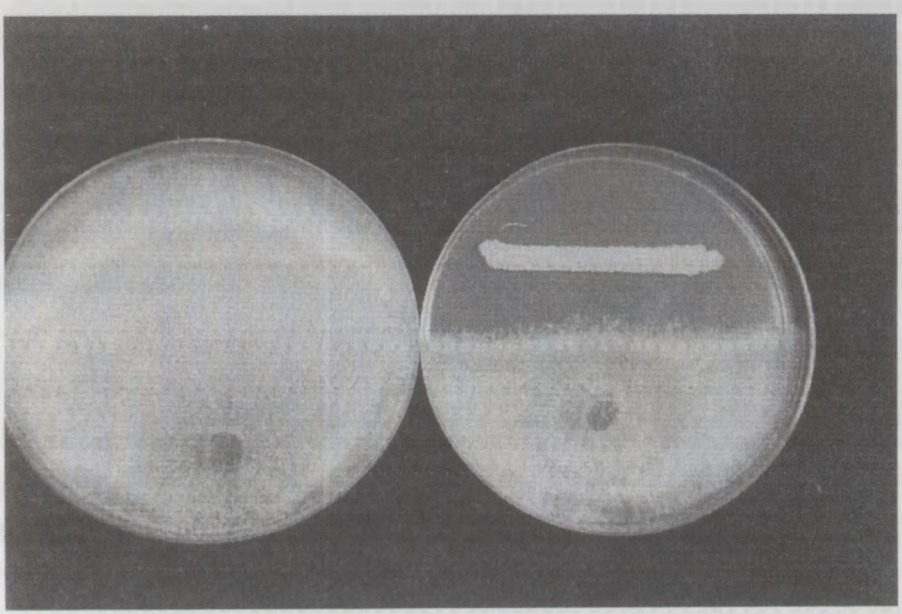


FIGURA 4. Inibição do crescimento miceliano de *Rhizoctonia solani* por *Bacillus subtilis in vitro*.

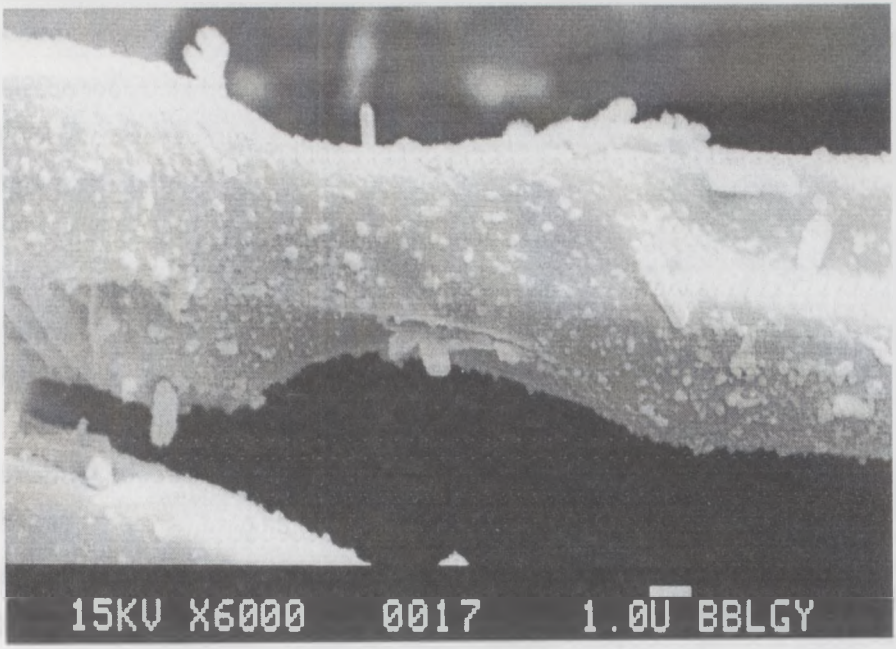


FIGURA 5. Penetração de células de *B. subtilis* em hifas de *R. solani*

Rizobactérias produzem também enzimas líticas envolvidas na digestão da parede celular de *Pythium* (Mitchell & Hurwitz, 1965). Este mecanismo de controle biológico é bem estabelecido em fungos antagônicos que produzem quantidades elevadas de enzimas líticas incluindo as quitinases, celulases, proteases etc., que estão diretamente envolvidas no parasitismo de uma gama de fungos fitopatogênicos. Exemplos ilustrados desse tipo de estudo podem ser encontrados no capítulo "Enzimas hidrolíticas envolvidas no micoparasitismo" desse volume.

Proteção de plantas com fungos micorrízicos

Fungos micorrízicos formam uma associação simbiótica benéfica com as raízes, podendo aumentar a resistência de plantas indiretamente através do uso de nutrientes disponíveis na superfície das raízes (Marx, 1972).

Fisiologicamente, plantas no estádio juvenil são mais suscetíveis ao ataque de patógenos de solo. Fungos micorrízicos podem aumentar o crescimento de plantas por aumentar a absorção de fósforo e, talvez, de outros minerais, como potássio, ferro, cobre, cálcio e zinco. Esta capacidade para aumentar a absorção de nutrientes favorece o crescimento da planta em solos pobres.

É de se esperar que a inoculação de fungos micorrízicos por ocasião da semeadura possa melhorar o estádio nutricional, o vigor e promover um crescimento acelerado de plântulas e, com isso, estreitar a fase de suscetibilidade àqueles patógenos.

Os fungos ectomicorrízicos formam uma barreira mecânica em torno das raízes que evitam a penetração e infecção por fitopatógenos. Ecto se refere ao manto externo do fungo ao redor das raízes. Ecotomicorriza ocorre nas famílias Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae e Mirtacea e os fungos pertencem, geralmente, aos Basidiomicetos ou Ascomicetos (Schenk, 1981). Zak (1964) descreveu formas pelas quais os fungos micorrízicos protegem raízes do ataque de patógenos: (1) através da utilização de exsudados, reduzindo, desse modo, a atração ou suporte de patógenos na rizosfera; (2) com micorriza ectotrófica, excluindo-os por meio do manto fúngico; (3) por produção de antibióticos e (4) por ser conducente aos organismos benéficos

na rizosfera. Fitoalexinas são induzidas em plantas em resposta à colonização de fungos micorrízicos.

Há vários relatos de patógenos de solos, entre eles *R. solani* e *Pythium*, que são controlados, de alguma forma, através do uso de fungos ectomicorrízicos. Sobre o potencial de fungos ectomicorrízicos no biocontrole de doenças de plantas sugere-se os trabalhos de Auer & Krügner (1991) e Marx (1972).

Os fungos micorrízicos arbusculares (MA) formam arbúsculos (haustórios ramificados) intracelularmente e estão conectados a hifas externas ao hospedeiro. As hifas destes fungos ramificam-se nos tecidos corticais, penetram nas células e alteram a fisiologia do hospedeiro. As interações de fungos MA com fitopatógenos são complexas, variam com combinações específicas e têm sido discutidas por Zambolim (1991), Schenck (1981), Ross (1972) e Zak (1964).

Fungos MAs podem proteger raízes contra patógenos que causam tombamento (*R. solani*) de plântulas de tomateiro (Cassiolato & Melo, 1991), *Pythium* em poinsettia (Cook & Baker, 1983), podridões radiculares de citros por *Phytophthora parasítica* (Davis & Menge, 1980) e murchas vasculares causadas por *Verticilium dahliae* (Davis et al., 1979; Melo et al.,1985); por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tomate (Caron et al., 1986) e murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) do tomateiro (Rego & Melo, 1990).

Embora os efeitos de fungos MA sobre o crescimento de plantas, nutrição e controle de certos fungos e nematóides sejam espetaculares, sua utilização prática apresenta uma grande desvantagem que recai na não produção de inóculo *in vitro*.

Controle integrado

O manejo integrado de doenças de plantas tem sido inadequadamente estudado. Por outro lado, evidências têm mostrado que muitos casos de controle biológico com culturas puras de microrganismos têm sido inconsistentes em condições práticas de campo. Uma boa prática seria a utilização de agentes de biocontrole associados com fungicidas. Neste caso, o agente de biocontrole deve ser tolerante ao fungicida e colonizar o solo mais rapidamente que os patógenos, após o tratamento químico (Bollen, 1982). *Trichoderma*, por exemplo, não é inibido por alguns fungicidas

comumente usados na agricultura, permitindo, todavia, a combinação desses fungicidas com o fungo.

Tombamento de plântulas causado por *R. solani* e *Pythium* spp. tem sido controlado através da integração de agentes microbianos e fungicidas. Uma solução mais efetiva para o controle do tombamento de plântulas de rabanete foi alcançada através da integração de *T. harzianum* e PCNB (Henis et al., 1978; Harman et al., 1981). PCNB (Pentacloronitrobenzeno) na concentração de 4mg/g de solo, adicionado ao solo com *T. harzianum* apresentou um efeito aditivo no controle da doença e um efeito sinergístico na diminuição de propágulos de *R. solani*. Do mesmo modo, a utilização conjunta de *T. harzianum* com o fungicida clorotalonil reduziu a incidência da doença em pepino (Lewis & Papavizas, 1980). O emprego de benadonil e *T. harzianum* também mostrou-se efetivo em controlar o tombamento (*R. solani*) de pré-emergência de rabanete (Lifshitz et al., 1985).

Com relação ao tombamento de plântulas de ervilha incitada por *P. ultimum* tem-se verificado um controle mais satisfatório do patógeno e um aumento da produtividade de grãos através da utilização de *T. harzianum* e do fungicida metalaxil (Kraft & Papavizas, 1983).

No caso de antagonistas sensíveis a pesticidas, é possível modificar geneticamente linhagens desses antagonistas no sentido de obter mutantes resistentes e com potencial de biocontrole (Papavizas, 1987; Melo & Silva, 1991). Papavizas (1987) obteve, por meio de irradiação de conídios com luz ultravioleta, novos biótipos de *Trichoderma* resistentes a benomil e com atividades melhoradas de biocontrole e maior sobrevivência no solo do que as linhagens parentais. A densidade populacional de linhagens de *T. harzianum* resistentes a benomil foi significativamente aumentada quando o solo foi suplementado com o fungicida, em comparação com o solo não suplementado (Ahmad & Baker, 1987). O fungicida adicionado ao solo, após cumprir seu papel, é biodegradado pelo fungo, que o utiliza como fonte de carbono (Melo et al., 1996), não permitindo que o produto permaneça por longo tempo no ambiente.

Verifica-se, com esses resultados, que a combinação de agentes de biocontrole com outros métodos conduz a um controle melhorado, comparada ao uso de uma única modalidade de controle.

Solarização do solo

Solarização do solo é uma técnica que se baseia no aquecimento do solo por um filme de polietileno ou polivinil transparente para o controle de fungos, nematóides e plantas daninhas. É mais efetiva se o solo estiver úmido ou se usada em combinação com matéria orgânica, visando a acelerar o consumo de oxigênio. Segundo Katan (1981), um dos pioneiros na utilização dessa técnica, a temperatura do solo coberto chega a alcançar 40-44°C a 20cm de profundidade. A efetividade da desinfestação do solo dependerá do comprimento do dia e intensidade solar, além do tipo de solo (Mahrer & Katan, 1981). Em solos solarizados observa-se redução na densidade de inóculo e na capacidade saprofítica competitiva dos patógenos (Katan, 1981). A literatura sobre o assunto é vasta, com revisões bem elaboradas (Katan, 1981; Souza, 1994; Yaron et al., 1991; Pullman et al., 1981; Kassaby, 1985; Ghini, 1997).

A solarização do solo tem sido usada com razoável sucesso em condições de casa-de-vegetação, especialmente para culturas de alto valor econômico e em condições de campo. Apresenta um grande potencial para controle de patógenos que causam tombamento de plântulas (Kassaby, 1985) e patógenos vasculares como *Verticillium dahliae* (Tjamos et al., 1991; Pullman et al., 1981; Katan et al., 1981) e *Fusarium oxysporum* (Katan et al., 1981; Bem-Yephet et al., 1987; Freeman & Katan, 1988).

R. solani e *Pythium* spp. têm sido controlados através dessa técnica em diversas culturas agrícolas. Efeitos de temperaturas subletais ocasionam alterações fisiológicas, retardando a germinação e reduzindo a incidência da doença por estes patógenos (Pullman et al., 1981).

Em Israel, a solarização com plásticos transparentes se mostrou tão eficiente quanto o tratamento com brometo de metila para controlar *R. solani, V. dahliae* e *Sclerotium rolfsii* (Elad et al., 1980).

O emprego combinado da solarização do solo, mesmo a temperaturas subletais, com o fungo *T. harzianum* tem evitado o aumento do potencial de inóculo de *R. solani* e, principalmente, reduzido a incidência da doença em algumas culturas (Chet et al., 1982).

Propágulos do fungo termotolerante *Talaromyces flavus* são estimulados em solos solarizados (Tjamos & Paplomatas, 1988), nos quais o antagonismo é favorecido, essencialmente, se propágulos dos patógenos são enfraquecidos por temperaturas subletais, tornando-os mais vulneráveis à atividade microbiana. O efeito do biocontrole pode operar durante ou depois da solarização.

Controle de *Pythium* spp. em cultivos hidropônicos

Em cultivos hidropônicos, nos quais existe uma baixa população de microrganismos competidores, a disseminação de zoosporos na solução nutritiva aumenta o potencial de incidência de doenças causadas por *Pythium* spp. O controle químico do patógeno nesses sistemas pode causar problemas de fitotoxicidade e deixar resíduos nos frutos e folhas. Espécies de *Pythium* são as que maiores danos causam, por exemplo, às culturas de pepino (Jenkins & Averre, 1983) e alface (Stanghellini & Kronland, 1986). O fungo é introduzido nestes sistemas através de água infestada, solo infestado ou substrato a base de turfa infestada.

Larvas de *Bradysia impatiens* e moscas *"shore"* (*Scatella stagnalis*) podem estar envolvidas na introdução e disseminação de *Pythium* em cultivos comerciais (Gardiner et al., 1990; Goldberg & Stanghellini, 1990). Buscando alternativas ao controle químico é que algumas medidas de manejo são empregadas, incluindo entre elas, as seguintes: a) adição de surfactantes à solução nutritiva. Estes causam lise de zoosporos e inibem a formação de *Pythium* spp. (Stanghellini & Tomlinson, 1987); b) filtração da solução nutritiva (Goldberg & Stanghellini, 1991); c) irradiação com luz ultravioleta (Stanghellini et al., 1984); d) manejo da luz, temperatura ou composição da solução nutritiva (Funck-Jensen & Hackenhull, 1983) e e) controle biológico com rizobactérias. *Pseudomonas fluorescens* Pf 15 introduzida na solução nutritiva, em condições controladas, aumentou significativamente a produção de frutos de pepino em, aproximadamente, 600% e reduziu o desenvolvimento de *Pythium aphanidermatum* (Rankin & Paulitz, 1994). A utilização de agentes de biocontrole, como tratamento profilático, oferece uma vantagem competitiva já que nos sistemas hidropônicos há uma baixa população microbiana, favorecendo, assim, o estabelecimento de agentes de biocontrole. Também, nesses sistemas, os cultivos

são feitos em ambientes controlados, eliminando a variabilidade que ocorre em condições de campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HAMDANI, A.M.; LUTCHMEAH, R.S.; COOKE, R.C. Biological control of *Pythium ultimum* – induced damping-off by treating cress seed with the mycoparasite *Pythium oligandrum*. **Plant Pathology**, v. 32, p. 449-454, 1983.

AHMAD, J.S.; BAKER, R. Competitive saprophytic activity of rhizosphere competent mutants of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 77, p. 358-362, 1987.

AUER, C.G.; KRÜGNER, T.L. Potencial de controle de doenças de plantas com fungos ectomicorrízicos. In: Controle Biológico de Doenças de Plantas. W. . Bettiol (org.). Jaguariúna: Embrapa-CNPDA. Documentos, 15, p. 71-85, 1991.

BAKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W.H. Freeman, 433p. 1974

BAKER, R.; CHET, I. Induction od suppressiveness. In: Suppressive soils and plant disease. SCHNEIDER, R.W. (ed.). **American Phytopathological** Society, p. 35-50, 1982.

BARNETT, H.L.; BINDER, F.L. The fungal-host parasite relationship. **Annual Review of Phytopathology**, v. 11, p. 273-292, 1973.

BEN YEPHET, Y.; STAPLETON, J.J.; WAKEMAN, R.J. ; DeVAY, J.E. Comparative effect of soil solarization with single and double layers of polyethylene film on survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Phytoparasítica**, Rehovot, v.15, n.3, p.181-185, 1987.

BENYAGOUB, M.; JABAJI-HARE, H.; BANVILLE, G.J.; CHAREST, P.M. *Stachybotrys elegans*. a destructive mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. **Mycological Research**, v. 98, p. 493-505, 1994.

BOLLEN, G.J. Fungicide resistance and microbial balance. In: Dekker, j.; Georgopoulos, S.G. (eds.). **Fungicide resistance in crop protection**. Wageningen, p. 161-176, 1982.

BOOSALIS, M.G. Effect of soil temperature and green manure amendment of unsterilized soil on parasitism of *Rhizoctonia solani* by *Penicillium vermeculatum* and *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 46, p. 473-478, 1956.

BRICH, R.G. Biological suppressiveness against sugarcane poor root synchome in Quensland soils. **Australasian Plant Pathology**, v. 15, p. 51-56, 1986.

BRUEHL, G.W. Soilborne plant pathogens. **Macmillan Publishing Company**, New York, 368p., 1987.

CARON, M.; FORTIN, A.; RICHARD, C. Effect of phosphorus concentration and *Glomus intraradices* on *Fusarium* crown and root rot of tomatoes. **Phytopathology**, v. 76, p. 942-946, 1986.

CASSIOLATO, A.M.R.; MELO, I.S. Interaction between *Rhizoctonia solani* and vesicular arbuscular micorrhizal Fungi in tomato. Summa **Phytopathology**, v. 17, p. 195-200, 1991.

CHEN, W.; HOITINK,M H.A.J.; SCHMITTHENNER, A.F.; TUOVINEN, O. A. The role of microbial activity in suppression of damping-off caused by *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, v. 78, p. 314-322, 1988.

CHET, I. *Trichoderma* – application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: Chet, I., ed. **Innovative approaches to plant disease control**. New York: Wiley, 1987, p. 137-160.

CHET, I.; ELAD, Y.; KALFON, A.; HADAR, Y.; KATAN, J. Integrated control of soilborne and bulbborne pathogens in iris. **Phytoparasitica**. Rehovot, v. 10, p.229-236, 1982.

CHET, I.; HARMAN, G.E.; BAKER, R. *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctoni solani* and *Pythium* spp. **Microbiol. Ecol.**, v. 7, p. 29-38, 1981.

CHET, I.; BAKER, R. Induction of suppressiveness to Rhizoctonia solani in soil. **Phytopathology**, v. 70, p. 994-998, 1980.

COOK, R.J.; BRUCKART, W.L.; COULSON, J.R.; GOETTEL, M.S.; HUMBER, R.A.; LUMSDEN, R.D.; MADDEX, J.V.; MCMANUS, M.L.; MOORE, L.; MEYER, S.F.; QUIMBY JR., P.C.; STACK, J.P.; VAUGHN, J.L. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. **Biological Control**, v. 7, p. 333-351, 1996.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. **American Phytopathology Society**, 539p., 1983.

DAVIS, R.M.; MENGE, J.A. Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on *Phytophthora* root rot of citrus. **Phytopathology**, v. 70, p. 447-452, 1980.

DAVIS, R.M.; MENGE, J.M.; ERWIN, D. Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on *Verticillium wilt* of cotton. **Phytopathology**, v. 69, p. 453-456, 1979.

DEACON, J.W.; HENRY, C.M. Mycoparasitism by *Pythium oligandrum* and *P. acanthicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 10, p. 409-415, 1978.

DRECHSLER, C. Two species of *Pythium* occurring in southern staes. **Phytopathology**, v. 33, p. 216-299, 1946.

ELAD, Y, KATAN, J. & CHET, I. Physical, biological and chemical control integrated for soilborne diseases of potatoes. **Phytopathology** v. 70, p. 418-422, 1980.

ELAD, Y.; CHET, I.; HEMIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 28, p. 719-725, 1982.

ELAD, Y.; LIFSHITZ, R.; BAKER, R. Enzymatic activity of the mycoparasite *Pythium nunn* during interaction with host and non-host fungi. **Physiological Plant Pathology**, v. 27, p. 131-148, 1985.

ELAD, Y.; LIFSHITZ, R.; BAKER, R. Enzymatic activity of the mycoparasite *Pythium nunnn* during interaction with host and non-host fungi. **Physiological Plant Pathology**, v. 27, p. 131-148, 1985.

FREEMAN, S.; KATAN, J. Weakening effect on propagules of *Fusarium* by sublethal heating. **Phytopathology**, St. Paulo, v. 78, p. 1656-1661, 1988.

FUNCK-JANSEN, D.; HACKENHULL, J. The influence of some factors on the severity of *Pythium* root rot of lettuce in soilless (hydroponic) growing systems. **Acta Hortic**. V. 133, p. 129-136, 1983.

GARDINER, R.B.; JARVIS, W.R.; SHIPP, L. Ingestion of *Pythium* spp. by larvae of the fungus gnat *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). **Annual Appl. Biol.**, v. 116, p. 1-8, 1990.

GARRET, S.D. **Pathogenic-root infesting fungi**. Cambridge University Press, Cambridge, 1970.

GHINI, R. Desinfestação do solo com o uso de energia solar: solarização e coletor solar. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1997. 29p.

GOLDBERG, N.P., STANGHELLINI, M.E. Ingestion-egestion and aerial transmisson of *Pythium aphanidermatum* by shore flies (Ephydrinae: Scatella stagnalis). **Phytopathology**, v. 80, p. 1244-1246, 1990.

GOLDBERG, N.P.; STANGHELLINI, M.E. The potential use of a bacteria as biological control agent for *Pythium* in hydroponics. (Abstract). **Phytopathology**, v. 81, p. 1345, 1991.

HADAR, Y.; CHET, I.; HANIS, I. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 69, p. 64-68, 1979.

HARMAN, G.E.; CHET, I.; BAKER, R. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seed as a biocontrol agent. **Phytopathology**, v. 71, p. 569-572, 1981.

HARMAN, G.E.; CHET, I.; BAKER, R. *Trichoderma harmatum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Pythium* spp. or *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v. 70, p. 1167, 1980.

HARRIS, A.R.; SIWEK, K.; WISEMAN, B.M. Interactions between damping-off fungi, antagonists and *Capsicum* seedlings **Applied Soil Ecology**, v. 6, p. 251-263, 1997.

HENIS, Y,; GHAFFAR, A.; BAKER, R. Integrated control of *Rhizoctonia solani* damping-off of radish: effect of successive plantings, PCNB and **Trichoderma harzianum** on pathogens and disease. **Phytopathology**, v. 68, p. 900, 1978.

HORNBY, D. Microbial antagonisms in the rhizosphere. Annual Applied Biology, **v. 89, p. 97, 1978.**

HOWELL, C.R. Effect of *Gliocladium virens* on *Phytium ultimum*, *Rhizoctonia solani* and damping-off of cotton seedlings. **Phytopathology**, v. 72, p. 496-498, 1982.

HOWELL, C.R.; STIPANOVIC, R.D. Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens* and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. **Can. J. Microbiol.**, v. 29, p. 321-324, 1983.

HOWIE, W.J.; SUSLOW, T.V. Role of antibiotic biosynthesis in the inhibition of *Pythium ultimum* in the cotton spermosphere and rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 4, p. 393-399, 1991

HUANG, J.W.L; KUHLMAN, E.G. Mechanisms inhibiting damping-off pathogens of slash pire seedlings with a formulated soil amendment. **Phytopathology**, v. 81, p. 171-177, 1991.

JAMES, D.W. JR.; GUTTERSON, N.I. Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* Hv37a and their differential regulation by glucose. **Applied Environmental Microbiology**, v. 52, p. 1183-1189, 1986.

JEFFRIES, P.; YOUNG, T.W.K. Interfungal parasitic relationship. **CAB International**, Wallingford, UK, 296p., 1994.

JENKINS, S.F. Jr.; AVERRE, C.W. Root diseases of vegetables in hydroponic culture systems in North Carolina greenhouse. **Plant Disease**, v. 67, p. 968-970, 1983.

KAISER, W.J.; HANNAN, R.M. Biological control of seed rot and preemerge damping-off of check pea with *Penicillium oxalicum*. **Plant Disease**, v. 68, p.806-811, 1984.

KASSABY, F. Y. Solar-healing soil for control for damping-off diseases. Soil **Biol. Biochemistry**. v. 17, p. 429-434, 1985.

KATAN, J; GRINSTEIN, A.; FISHLER, G.; FRANK, A.Z.; RABINOWITCH, H.D.; GREENBERGER, A.; ALON, H.; ZIG, U. Long-term effects of solar-heating of the soil. **Phytoparasitica**. Rehovot, v.8, p. 39-50. 1981 (Abstr.).

KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M.N. Pseudomonas siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. **Current Microbiology**, v. 4, p. 317, 1980.

KLOEPPER, J.W. Development of in vivo assays for prescreening antagonists of *Rhizoctonia solani* on cotton. **Phytopathology**, v. 8, p. 1006-1013, 1991.

KRAFT, J.M.; PAPAVIZAS, G.C. Use to host resistance, *Trichoderma* and fungicide to controle soilborne diseases and increase seed yield of peas. **Plant Disease**, v. 67, p. 1234, 1983.

LEE, F.N. Effect of soil solarization with clear plastic and shallow flood on the survival of Rhizoctonia solani sclerotia. **Phytopathology**, v. 75, p. 1291, 1985 (abstract).

LEWIS, J.A.; PAPAVIZAS, G.C. Integrated control of *Rhizoctonia* fruit rot of cucumber. **Phytopathology**, v. 70, p. 85, 1980.

LIFSHITZ, R.; DUPLER, M.; ELAD, Y.; BAKER, R. Hyphal interactions between *Pythium nunn* and several soil fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 30, p. 1482-1487, 1984.

LIFSHITZ, R.; SNEH, B.; BAKER, R. Soil suppressiveness to a plant pathogenic *Pythium* species. **Phytopathology**, v. 74, p. 1054-1061, 1984.

LIFSHTZ, R.; LIFSHTZ, S.; BAKER, R. Decrease in incidence of *Rhizoctonia* preemergence damping-off by use of integrated chemical and biological controls. **Plant Disease**, v. 69, p. 431-434, 1985.

LIFSHITZ, R.; WINDHAM, M.T.; BAKER, R. Mechanism of biological control of preemergence damping-off pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. **Phytopatholgy**, v. 76, p. 720-725, 1986.

LIU, S.; BAKER, R. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v. 70, p. 404-412, 1980.

LUMSDEN, R.D., AYERS, W.A. Influence of soil environment on the germinability of constitutively dormant oospores of *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, v. 65, p. 1101-1107, 1975.

LUMSDEN. R.D.; LOCKE, J.C. Biological control of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* damping-off with *Gliocladium virens* in soilless mix. **Phytopathology**, v. 79, p. 361-366, 1989.

MAHRER, Y.; KATAN, J. Spatial soil temperature regime under transparent polyethylene mulch: numerical and experimental studies. **Soil Sci.**, Baltimore, v. 131, p.82-87, 1981.

MARTIN, F. N.; HANCOCK, J.G. Association of chemical and biological factors in soils suppressive to *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, v. 76, p. 1221-1231, 1986.

MARTIN, F. N.; HANCOCK, J.G. The use of *Pythium oligandrum* for biological control of preemergence damping-off caused by *P. ultimum*. **Phytopathology**, v. 77, p. 1013-1020, 1987.

MARTINS-CORDER, M.P.; MELO, I.S. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* kleb. **Scientia Agricola**, v. 55, p. 1-7, 1998.

MARX, D.H. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. **Annual Review of Phytopathology**, v. 10, p. 429-454, 1972.

MELO, I.S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: I. S. Melo & J. L. Azevedo (eds.). **Controle Biológico**, v. 1, Jaguariúna, SP. Embrapa, 264p., 1998a.

MELO, I.S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: I. S. Melo & J.L. Azevedo (eds.). **Ecologia Microbiana**. Embrapa-CNPMA. Jaguariúna, p. 87-116, 1998b.

MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. In: Luz, W. (ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 415, 1996.

MELO, I.S.; SILVA, A.C.F. Resistance of UV induced mutants of *Trichoderma harziazum* to benzimidazole and dicarboximide fungicides. **IVth International *Trichoderma* and *Gliocladium* Workshop**, Belgirate, Itália, 1991, p. 151-152.

MELO, I.S.; COSTA, C.P.; SILVEIRA, A.P.D. Influência de micorrizas vesículo-arbusculares sobre a murcha da beringela causada por *Verticillium albo-atrum*. **Summa Phytopathologica**, v. 11, p. 173-179, 1985.

MELO, I.S.; FAULL, J.L. Parasistism of *Rhizoctonia solani* by Strains of *Trichoderma* spp. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 55-59, 2000.

MELO, I.S.; SILVA, C.M.M.S.; SILVA, A.C.F.; FAULL, J.L. Degradadação do fugicida carbendazim e caracterização molecular de mutantes e *Trichoderma harzianum*. **Workshop sobre biodegradação**, Campinas, p. 215, 1996.

MITCHELL, R. HURWITZ, E. Suppression of *Pythium debaryanum* by lytic rhizosphere bacteria. **Phytopathology**, v. 55, p. 156-158, 1965.

NELSON, E.B.; CHAO, W.L.; NORTON, J.M.; NASH, G.T.; HARMAN, G.E. Attachment of *Entorobacter cloacae* to hyphae of *Pythium ultimum*: possible role in the biological control of *Pythium preemergence* damping-off. **Phytopathology**, v. 76, p. 327-335, 1986.

OSBURN, R.M., SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G.; HENDSON, M Dynamic of sugar but seed colonization by *Pythium ultimum* and *Pseudomanas* species: effects on seed rot and damping-off. **Phytopathology**, v. 79, p. 709-716, 1989.

OSMAN, A.R.; SAHAB, A.F. Control of *Rhizoctonia solani* by soil solarization. **Acta Hort.**, Wageningen, v.152, p. 245-251, 1984.

PAPAVIZAS, G.C. Genetic manipulation to improve the effectiveness of biocontrol fungi for plant disease control. In: I. Chet (ed.). **Innovative approaches to plant disease control.** Wiley-Interscience, New York, p. 193-212, 1987.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 23, p. 23-54, 1985.

PAPAVIZAS, G.C.; DAVEY, C.B. *Rhizoctonia* disease of bean as affected by decomposing green plant material and associates microflora. **Phytophatology**, v. 50, p. 516-522, 1960.

PERRIN, R.; GARBAYE, J. Influence of ectomycorrhizae on infectivity of *Pythium* infested soils and substracts. **Plant and Soil**, v. 71, p. 345-351, 1983.

PULLMAN, G.S.; DEVAY, J.E.; GARBER, R.H.; WEINHOLD, A. R. soil solarization: Effects on verticillium wilt of cotton and soilborne population of *Verticillium dahliae*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, and *Thielaviopsis basicola*. **Phytopathology**, v. 71, p. 954-959, 1981.

RANKIN, L.; PAULITZ, T.C. Evaluation of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium* root rot of greenhouse cucumber in hydroponic culture. **Plant Disease**, v. 78, p. 447-451, 1994.

REGO, I.C.; MELO, I.S. Efeito de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares na severidade da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) em tomateiro. **II Simpósio de Controle Biológico**, Anais, Brasília, p. 136, 1990.

REIS, E.M.; COOK, R.J.; MCNEAL, B.L. Effect of mineral nutrition on take-all of wheat. **Phytopathology**, v. 72, p. 224-229, 1982.

REIS, E.M. Solos supressivos e seu aproveitamento no controle de doenças de plantas. In: W. Bettiol (org.). Controle Biológico de Doenças de Plantas. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 388p., 1991.

ROSS, J.P. Influence of endogone mycorrhiza on **Phytophthora** root rot soybean. **Phytopathology**, v. 62, p. 896-897, 1972.

ROVIRA, A.D.; ELLIOT, L.F.; COOK, R.J. The impact of cropping systems on rhizosphere organisms affecting plant health. In: LYNCH, J.M. (ed.). **The rhizosphere**, John Wiley & Sons, England, p. 389-436, 1990.

SANDERS, P.L. Failure of metalaxyl to control *Pythium* blight on turfgrass in Pennsylvania. **Plant Disease**, v. 68, p. 776-777, 1984.

SATOUR, M. M. ; EL-SHERIF, E.M.; EL-GHAREEB, L.; EL HADAD, S.A.; EL-WAKIL, H.R. Achievements of soil solarization in Egypt. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON SOIL SOLARIZATION, 1, 1990, Amman. **Proceedings**. Rome: FAO, 1991b, p. 173-181.

SCHENK, N.C. Can mycorrhizae control root disease? **Plant Disease**, v. 54, p. 230-234, 1981.

SCHIPPERS, A.B.; BAKKER, A.W.; BAKKER, P.A. H.M.A. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, p. 339-358, 1987.

SCHNEIDER, R.W. Suppresive soils and plant disease. **American Phytopathology Society**, St. Paul, Minnesota, 96p., 1982.

SCHROTH, M.N.; COOK, R.J. Seed exsudation and its inflence on pre emergence damping-off bean. **Phytopathology**, v. 54, p. 670-673, 1964.

SIMON, A.; SIVASITHAMPARAM, K. The soil environment and the suppression of saprophytic growth of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 865-870, 1998.

STANGHELLINI, M.E.; HANCOCK, J. G. Radial extent of the bean spermosphere and its relation to the behavior of *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, v. 61, p. 165-168, 1971.

STANGHELLINI, M.E.; STOWELL, L.J.; BATES, M.L. Control of root rot of spinach caused by *Pythium aphanidermatum* in a recirculating hydroponic system by utlraviolet irradiation. **Plant Disease**, v. 68, p. 1075-1076, 1984.

STANGHELLINI, M.E.; TOMLINSON, J.A. Inhibition and lytic affects of a nonionic surfactant on various asexual stages in the life cycle of *Pythium* and *Phytophthora* species. **Phytopathology**, v. 77, p. 112-114, 1987.

STANGHELLINI, M.E.; KRONLAND, W.C. Yield loss in hydroponically grown lettuce attributed to subclinical infection of feeder rootlets by *Pythium dissotocum*. **Plant Disease**, v. 70, p. 1053-1056, 1986.

STAPLETON, J.J. Feasility of sprayable polymer mulches for soil solarization and soil sealing applications. **Phytopathology**, St. Paul, v. 80, n. 9, p. 892, 1990. (Abstract).

STASZ, T.E.; HARMAN, G.E.; MARX, G.A. Time and site of infection of resitant and susceptible germinating pea seeds by *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, v. 70, p. 730-733, 1980.

SUSLOW, T.V. Role of root-colonizing bacteria in plant growth. In: MOUNT, M.S.; LACY, G.H. (ed.). **Phytopathogenic prokaryotes**, v. 1, p. 187-223, Academic Press, New York, 1982.

THOMPSON, R.J.; BURNS, R.G. Control of *Pythium ultimum* with antagonistic fungal metabolites incorporated into sugar beet pellets. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 21, p. 745-748, 1989.

TJAMOS, E. C.; BIRIS, D.A., PAPLOMATAS, E. J. Long-term effect of soil solarization in controlling verticillium wilt after individual application of soil solarization in stablished olive orchads. **Plant Disease**, v.75, p.557-562, 1991.

TJAMOS, E. C.; PAPLOMATAS, E.J. Long-term effect of soil solarization in controlling verticillium wilt of globe artichokes in Greece. **Plant Pathology**, v.37. 1988.

TJAMOS, E.C.; BIRIS, D.A.; PAPLOMATAS, E.J. Recovery of olive trees with verticillium wilt after individual application of soil solarization stablished olive orchads. **Plant Disease**, v.75, p. 557-562, 1991.

TURHAN, G.; GROSSMANN, F. Antagonistic activity of five *Myrothecium* species against fungi and bacteria *in vitro*. **Journal Phytopathology**, v. 140, p. 97-113, 1994.

TURHAN, G.; TURHAN, K. Suppression of damping-off pepper caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* by some new antagonists in comparison with *Trichoderma harzianum*. **Journal of Phytopathology**, v. 126, p. 175-182, 1989.

VAJNA, L. Mutual parasitism between *Trichoderma hamatum* and *Trichoderma pseudokoningii*. **Phytopathology Z.**, v. 113, p. 300-303, 1985.

VAN DEN BOOGERT, P.H.J.F.; REINARTZ, H.; SJOLLENA. K.A.; VEENHIUS, M. Microscopic observations on the interactions of the mycoparasite *Verticillium biguttatum* with *Rhizoctonia solani* and other soil-borne fungi. **Antonic Van Leeuwershoek Journal of Microbiology**, v. 56, p. 161-174, 1989.

VESELEY, D. Potential biological control of damping-off pathogens in emerging sugar beet by *Pythium oligandrum*. **Phythopathologische Zeitschrift**, v. 90, p. 113-115, 1977.

WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 379-407, 1988.

WINDELS, C.E. Growth of *Penicillium oxalicum* as a biological seed treatment on pea seed in soil. **Phytopathology**, v. 71, p. 929-933, 1981.

YARON, D.; REGEV, A.; SPECTOR, R. Economic evaluation of soil solarization and desinfestation. In: KATAN, J.; DeVAY, J.E. (eds). Soil solarization. Boca Raton: CRC, 1991, p. 171-190.

ZAK, B. Role of mycorrhizae in root disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 2, p. 377-399, 1964.

ZAMBOLIM, L. Potencial dos fungos micorrizicos vesiculo-arbusculares no controle de fitopatógenos e implicações com a nutrição fosfatada. In: W. Bettiol (org.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA. Documentos, 15, p. 87-120, 1991.

8

ENZIMAS HIDROLÍTICAS ENVOLVIDAS NO CONTROLE BIOLÓGICO POR MICOPARASITISMO

Luzia Helena Corrêa Lima
Janice Lisboa De Marco
Carlos Roberto Felix

"Os microrganismos evoluíram para adaptação ecológica, e não para eficácia biotecnológica." (Kenneth N. Timmis)

INTRODUÇÃO

Práticas culturais, tais como o uso de plantas geneticamente uniformes em monoculturas, o plantio de cultivares homogêneos susceptíveis a doenças e a aplicação de fertilizantes em concentrações que aumentam a densidade de patógenos, fortaleceram o potencial destrutivo das doenças de plantas. O combate destas doenças tornou-se, portanto, altamente dependente de pesticidas químicos - os agrotóxicos - que são geralmente eficazes para o controle de pragas, mas apresentam, por vezes, conseqüências indesejáveis. Os agrotóxicos são apontados como substâncias altamente venenosas, que se acumulam no organismo e são capazes de causar câncer e mutações genéticas em descendentes. Por isso mesmo, vários agrotóxicos, como aqueles que contêm mercúrio, foram retirados do mercado, limitando, assim, as opções para o controle de fitopatógenos. Para este fim, esforços científicos foram, então, direcionados para o desenvolvimento de processos alternativos, propiciando o conceito de **controle biológico**, cuja premissa básica é manter a densidade populacional das espécies de pragas associadas à agricultura, em níveis econômica e ecologicamente aceitáveis.

Em conceito mais amplo, o controle biológico fundamenta-se no fenômeno natural da associação entre as espécies e pode ser definido como sendo "a ação de parasitas, predadores e patógenos que mantêm relativamente baixa a densidade populacional de pragas, ao contrário do que ocorreria em sua ausência" (DeBach, 1964). Costuma-se classificar o controle biológico sob dois aspectos: o **natural,** que mantém sem qualquer influência humana as criaturas em perfeito equilíbrio dentro de seus habitats; e o **aplicado,** que consiste na introdução e manipulação de inimigos naturais pelo homem (Ridgway, 1981; Melo, 1991a).

O uso de inimigos naturais no controle de pragas da agricultura não é uma atividade nova: os chineses já usavam formigas - um predador - para combater lagartas e brocas de citros. Outro marco do controle biológico ocorreu no mundo ocidental, em 1762, com a importação de um pássaro da Índia para combater gafanhotos vermelhos em Mauritius (Bosch & Messenger, 1974). Atualmente, uma vasta gama de organismos constituem pragas: mais de 10.000 espécies de insetos e ácaros, 2.000 de ervas daninhas, 2.000 de nematóides e 8.000 de fungos são pragas em potencial para a agricultura, florestas, seres humanos e animais domésticos (Ridgway, 1981; Melo & Azevedo, 1998). Os inimigos naturais destas pragas ocorrem, por vezes, sob formas variadas, podendo ser agrupados em vírus, bactérias, fungos, protozoários, nematóides, artrópodes, vertebrados e plantas superiores (Melo & Azevedo, 1998). Muitos deles apresentam potencial para uso em controle biológico e, desde o trabalho pioneiro de Weindling & Fawcett (1936) sobre o uso de cepas de *Trichoderma* sp. no controle de doenças causadas em citros por *Rhizoctonia solani,* grandes esforços têm sido realizados na tentativa de isolar cepas de fungos eficazes na repressão de doenças de plantas causadas por outros fungos. Alguns exemplos específicos podem ilustrar a utilidade do controle biológico nos tempos modernos: o percevejo predador (*Podisus nigrispinus*) controla a lagarta parda *(Thyrinteina arnobia,* Stoll) em 400 mil hectares de reflorestamento brasileiro (Cavalcanti et al., 1994; Zanuncio et al., 1994); vários parasitóides controlam a densidade de pulgões nas plantações de trigo na América Latina e várias espécies de fungos entomopatogênicos, como *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e os do gênero *Nomuraea* são amplamente utilizados no combate à cigarrinha da cana-de-

açúcar, à lagarta que ataca o cartucho do milho e a alguns afídeos, respectivamente (Alves, 1986).

Dentre as bactérias entomopatogênicas, destacam-se as do gênero *Bacillus (Bacillus thuringiensis* Berliner, *Bacillus sphaericus* Neide) para o controle de insetos-pragas em hortaliças (Alves, 1986). O fungo saprófita do gênero *Trichoderma* é utilizado com sucesso no controle de algumas doenças de plantas causadas por fungos fitopatogênicos, como *Rhizoctonia* spp, *Sclerotium* spp, *Fusarium* spp. e outros (Chet, 1987; Melo, 1990; Melo, 1995; Melo & Azevedo, 1998). Fungicidas formulados com cepa ATCC 20476 de *Trichoderma* estão sendo comercializados em pequena escala há mais de vinte anos, principalmente para o combate de doenças causadas pela *Botrytis cinerea* em morangueiros, no norte da Europa (Ricard & Ricard, 1997). Entretanto, a despeito dos inúmeros registros que aparecem anualmente descrevendo o potencial de microrganismos como agentes de biocontrole de doenças de plantas (veja Melo & Azevedo, 1998), os casos de sucesso comercial são raros (Bélanger et al., 1995). Este insucesso deve-se muito mais à complexidade do processo de interação antagônico-fitopatógeno e ao desconhecimento dos mecanismos básicos envolvidos do que à falta de interesse científico e comercial na utilização de um fenômeno natural em favor da produtividade agrícola e da preservação do meio ambiente.

O controle biológico fundamenta-se nas interações antagônicas entre as espécies, entretanto os mecanismos envolvidos não são ainda suficientemente conhecidos. As interações mais estudadas e melhor caracterizadas são as que ocorrem entre os fungos fitopatogênicos e seus antagonistas (Chet, 1992; Haran et al., 1996a). Nelas, o fungo antagonista interfere na vida do fitopatógeno das seguintes maneiras: a) por **competição** - que reflete a luta pela aquisição de um recurso indispensável (espaço físico, nutriente, microelementos, água ou luz); b) por **antibiose** - que representa a hostilidade química (ação de substâncias e antibióticos voláteis ou não voláteis) com eliminação de um dos contendores; e c) por **micoparasitismo** - que reflete a hostilidade química (antibiose) e ação canibal (digestão por enzimas hidrolíticas, como quitinases, proteases, glucanases e lipases), resultando na eliminação de um e no aproveitamento dos restos celulares pelo sobrevivente. Dentre os três processos, o micoparasitimo é o que mais se destaca, pela complexidade e número de etapas

envolvidas. Estas incluem o reconhecimento do alvo pelo antagonista, a transmissão de sinais que resulta na interação entre antagonista e fitopatógenos, a indução e produção de metabólitos (enzimas) pelo antagonista e a digestão da célula-alvo. Dentro deste contexto, merece destaque o fato das células fúngicas serem protegidas pela parede celular, uma estrutura rígida que além de proteger a célula exerce a função de seletora de fluxo de material. Ainda que vista como uma estrutura estática, a parede celular está sempre sendo remodelada durante o crescimento da célula, o que necessariamente influencia os processos de interação antagonista-hospedeiro. Como as investigações científicas recentes têm dado ênfase às interações entre fungos, serão discutidos, a seguir, tópicos relativos à composição da parede celular dos fungos, à produção de enzimas hidrolíticas por fungos antagonistas, preferencialmente fungos do gênero *Trichoderma*, à possível ação das hidrolases no processo antagônico e aos possíveis mecanismos envolvidos de modo a se ter uma imagem clara sobre a participação de enzimas em controle biológico envolvendo micoparasitismo. Informações mais detalhadas poderão ser obtidas em livros sobre controle biológico (Melo & Azevedo, 1998), cinética enzimática (Segel, 1975) e em publicações específicas sobre hidrolases de fungos (Warren, 1996), amilases (Svenson, 1991; De Marco et al., 1996), celulases (Tomme et al., 1995), proteases (Santos et al., 1996a,b), hemicelulases (Couglan & Hazelwood, 1993; Filho 1994,1998; Prade 1996) e quitinases (Shaikh & Deshpande, 1993; Lima et al., 1997; Cohen-Kupiec & Chet, 1998). Finalmente, será apresentado também um apêndice, descrevendo os protocolos mais utilizados neste laboratório para dosagem das atividades de enzimas envolvidas com o processo de antagonismo e discutidas ao longo deste capítulo.

Composição da parede celular de fitopatógenos

As células fúngicas são envoltas por paredes celulares rígidas, cujas propriedades foram revistas em várias oportunidades (Ballow, 1982; Cabib et al., 1982, 1988, 1991; Bartnicki-Garcia, 1986; Peberdy, 1990; Ruiz-Herrera, 1992). Além de manter a forma da célula, protegê-la das intempéries e hostilidades ambientais, proporcionar ambiente adequado à organização e ocorrência de processos vitais e atuar como um filtro que permite a passagem de determinadas moléculas excluindo

outras, a parede celular serve ainda como receptor de feromônios e toxinas (Bulawa, 1993). Em suma, ela serve como barreira às ações exercidas pelos microrganismos antagonistas. Terá sucesso aquele que lograr êxito em romper a parede celular ou interromper os processos relacionados com sua síntese (Lorito et al., 1996a,b).

A parede celular de fungos é uma estrutura complexa, constituída de carboidratos, quase todos sob a forma de polissacarídeos (80% a 90%), tais como as β-1,3-glucanas (celulose, β-1,3 e β-1, 6-glucanas) e a quitina (Debono & Gordee, 1994). Alguns polímeros são relativamente simples, consistindo em cadeias lineares de resíduos unidos por uma única ligação, enquanto outros são mais complexos, apresentando uma variedade de ligações de forma a ter-se cadeias ramificadas. Além destes, carboidratos, proteínas, lipídios e íons inorgânicos aparecem também na composição da parede celular. Às vezes, o fungo apresenta quantidades razoáveis de pigmentos, tais como melanina e caroteno (Bartnicki-Garcia, 1968). Em *Saccharomyces cerevisae,* enquanto a quitina aparece em menores proporções (1-2% do peso seco da parede celular), as glucanas, juntamente com as mananas (proteínas altamente glicosiladas contendo manose como o principal constituinte) (Tanner, 1990) são os maiores componentes (Bulawa, 1993).

Celulose

A celulose (β-1,4-glucana) é um homopolissacarídeo linear e não-ramificado, constituído de 10.000 a 15.000 resíduos de D-glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo β-1,4. Tal estrutura resulta na formação de uma substância fibrosa, resistente e insolúvel em água. As fibras de celulose estão associadas umas às outras, principalmente por pontes de hidrogênio, formando estruturas compactas e insolúveis. Ao contrário da celulose vegetal, na qual as fibras se apresentam envolvidas por uma matriz de hemicelulose e lignina, nos fungos, as fibras de celulose estão associadas a outros polissacarídeos, tais como quitina, β-glucanas e glicogênio (Bartnicki-Garcia, 1968).

β-1,3- e, β-1,6-glucanas

Outras β-glucanas presentes na parede celular de fungos são

homopolímeros de D-glicose. Tais compostos formam cadeias lineares com ramificações, nas quais os resíduos de D-glicose estão unidos por ligações β-1,3 ou β-1,6 (Ruiz-Herrera, 1992). De maneira geral, as β-glucanas possuem estruturas mais ou menos rígidas, ditadas por ligações covalentes, conferindo estruturas tridimensionais, estabilizadas por interações fracas. Resultam daí mudanças distintas das propriedades do polímero, como por exemplo a solubilidade e estabilidade. Muitos fungos sintetizam β-glucanas tanto no citoplasma quanto extracelularmente, mas, em geral, sua localização é na parede celular. O envolvimento das β-glucanas na biologia dos fungos é bem diversificado, dependendo da estrutura, tamanho e propriedades físico-químicas e, mais importante, da localização. O envolvimento primário destas glucanas na parede celular dos fungos é, sem dúvida, na proteção e manutenção da rigidez. Uma outra função seria a de proteção das células contra a desidratação. Entretanto, a natureza e a localização das β-glucanas na parede celular sugerem também a possibilidade de serem degradadas e utilizadas como meios nutricionais quando ocorre a falta de nutrientes externos.

Quitina

A quitina é um dos componentes funcionalmente mais importantes da parede celular de fungos. É formada por moléculas de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), unidas por ligações glicosídicas β-1,4, resultando em cadeias lineares (Stirling et al., 1979; Ballow 1982; Cabib et al., 1982; Jeuniaux 1966). A quitina é encontrada nos organismos na forma de fibras associadas a proteínas, lipídeos ou a outros açúcares (Stirling et al., 1979). É um biopolímero linear e insolúvel em água, sendo abundantemente encontrado no exoesqueleto dos invertebrados que vivem no mar (lagostas, caranguejos e outros crustáceos), nos insetos e na parede celular de fungos e de algumas algas. A única diferença química entre a quitina e a celulose é a substituição da hidroxila do carbono 2 dos resíduos de glicose por um grupo aminoacetilado. Análises de difração de raio X revelaram três formas de interação intercadeias das moléculas de quitina (α-quitina, , β-quitina, e γ-quitina), que são estabilizadas por meio de pontes de hidrogênio. Dentre estas, apenas a α-quitina é encontrada na parede celular de fungos. Esse polímero consiste em cadeias antiparalelas

de poli-N-acetil-D-glicosamina, estabilizadas por pontes de hidrogênio inter e intracadeias. A unidade estereoquímica dessa forma é a quitobiose (N,N'diacetilquitobiose). As cadeias associadas por meio das pontes de hidrogênio entre as aminas de uma cadeia e as carbonilas da cadeia adjacente conferem insolubilidade à quitina na água e a formação de fibrilas (Cabib, 1987). A β-quitina caracteriza-se pela presença de cadeias paralelas de poli-N-acetil-D-glicosamina, diferenciando-se da α-quitina, sobretudo, pela capacidade de hidratação. Sua forma anidra apresenta uma estrutura refinada e assemelha-se à da α-quitina. Por outro lado, a γ-quitina apresenta duas cadeias paralelas e uma antiparalela de N-acetil-D-glicosamina, conforme as α- e β-quitina. Contudo, estas duas últimas formas não são importantes no processo de interação entre fungos, já que são encontradas apenas em organismos aquáticos e em membranas peritróficas de insetos. Não obstante, membranas peritróficas estão envolvidas no processo de evasão de protozoários do bolo alimentar para o corpo dos insetos vetores, podendo, assim, constituir alvo para procedimentos de controle biológico de parasitas transmitidos por insetos hematófagos.

Grupos de fungos quanto à composição da parede celular

Uma análise por microscopia eletrônica da parede das regiões apical e subapical de hifas de *Neurospora grassa, Schizophyllum commzine* e *Phytophthora parasitica* revelou a distribuição co-axial de polímeros, tais como β-1,3- e β-1,6-glucanas, glicoproteínas, proteínas, quitina e celulose (Hunsley & Burnett, 1970), indicando que a parede celular é uma estrutura definida, na qual os componentes estão arranjados em camadas (Farkas, 1979). A quitina e as β-1,3-glucanas estão embebidas em uma matriz de material amorfo e envoltas por substâncias contendo grupos amino não-acetilados como, por exemplo, a quitosana. Nesta estrutura, a quitina parece estar protegida pelas β-1,3-glucanas (Chérif & Benhamou, 1990) e os complexos quitina-glucanas parecem estar covalentemente ligados por meio de ligações glicosídicas na posição 6 do N-acetilglicosamina (quitina) e na posição 1 dos resíduos de glicose nas glucanas (Surarit et al., 1988). De certa forma, o arranjo e a composição da parede celular podem auxiliar a identificação do microrganismo (Bartnicki-Garcia, 1968; Dejaczenko & Cassone, 1972). Dentro deste contexto, várias categorias podem

ser reconhecidas e designadas, conforme o arranjo dos principais polímeros:

Celulose-glicogênio

Nesta categoria, estão incluídos os microrganismos cuja parede celular é constituída de celulose e glicogênio, na proporção de 1:1. A estrutura e a forma da parede celular dependem do polímero de celulose, que é insolúvel em soluções alcalinas (Debono & Gordee, 1994). Uma característica da categoria é a quantidade expressiva de glicosamina, proteínas e lipídios (Ward & Wright, 1965);

Celulose-glucana

A parede celular dos microrganismos incluídos nesta categoria é constituída de manose (0,6%), glicosamina (0,3%), glucana (75-90%), traços de galactosamina e ribose, celulose (17-25%), proteína (3-5%), lipídeo (1-3%) e total ausência de quitina. Uma característica importante deste grupo é a presença de proteínas contendo resíduos de hidroxiprolina, exclusivos das paredes celulares de fungos, algas (Punnett & Derrenbacker, 1966; *ap.* Bartnicki-Garcia, 1968) e plantas superiores (Lamport & Northcote, 1960; *ap.* Bartnicki-Garcia, 1968). Evidências indicam a importância da hidroxiprolina em ligações entre polissacarídeos e proteínas (Lamport, 1967; *ap.* Bartnicki-Garcia, 1968). Nesta categoria estão incluídos alguns gêneros de fungos fitopatogênicos, como *Phytophthora* (Bartnicki-Garcia, 1968; Aronson et al., 1967) e *Pythium* (Novaes-Ledieu et al., 1967; Cooper et al., 1967);

Celulose-quitina

A característica fundamental da parede celular dos microrganismos desta categoria é a presença da quitina e/ou da celulose na parede celular. Quando ambas estão presentes, a quitina localiza-se na superfície interna da parede celular (Fuller & Barshad, 1960). Apenas os ficomicetos aquáticos são considerados membros dessa categoria não sendo, portanto, importantes em controle biológico;

Quitosana-quitina

As características principais desse grupo são a ausência da glicose não

substituída nos polímeros e a presença do pigmento de melanina na parede celular do esporo, servindo de proteção contra a radiação visível e ultravioleta (Crook & Johnston, 1962, *ap.* Bartnicki-Garcia, 1968);

Quitina-glucana

A parede celular dos microrganismos membros desta categoria contém quitina (60%), uma porcentagem maior de β-1,3-glucana em relação a β-1,6-glucana, além de proteínas e lipídios em quantidades significativas. De todas as categorias, esta é a que apresenta maior número de espécies de microrganismos. Abrange cerca de três classes de fungos, a saber: Ascomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos. A classe dos Ascomicetos (gênero *Trichoderma)* tem galactose e galactosamina, mas não xilose e fucose em suas paredes. Entre os Basidiomicetos, a recíproca é verdadeira. Nos Deuteromicetos, além da presença de glicose, manose e galactose e da ausência de galactosamina, a presença de N-acetilglicosamina é marcante (Distler & Roseman, 1960; *ap.* Bartnicki-Garcia, 1968). Pertencem a esse grupo os fungos dos gêneros *Aspergillus, Neurospora, Rhizoctonia* e *Sclerotium.* Esta categoria de microrganismos é de extrema importância em controle biológico;

Manose-quitina

Neste grupo, a porcentagem de quitina na parede celular é alta em relação à manose. Algumas leveduras estão incluídas e são as únicas que possuem galactose, fucose e ácido aminobutírico na parede celular. Nesta categoria, se enquadram os gêneros *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*, que possuem caroteno como pigmento (Bartnick-Garcia, 1968).

Manose-glucana

A parede celular é constituída de polímeros de glicose, com ligações glicosídicas β-(1,6) na cadeia principal e ligações glicosídicas β-(1,3) nas cadeias laterais. As principais características do grupo são o grau de substituição do açúcar (manose) na cadeia principal e o tamanho das cadeias laterais que varia de 8 a 15 resíduos de glicose. Pertencem a este grupo algumas leveduras (Bartnicki-Garcia, 1968);

Poligalactosamina-galactana

A parede celular dos microrganismos desta categoria é constituída de galactosamina (30%), galactose (10%), xilose (3%) e proteínas (30%). Destaca-se, ainda, nos membros deste grupo, a ausência de quitina, celulose e lipídios. O polímero principal da parede celular é de natureza hemicelulolítica (xilose + galactose). Dentre os fungos que apresentam tal composição da parede celular inclui-se o grupo taxonômico *Trichomycetos* - fungos, tipicamente comensais, que habitam os tratos digestivos dos hospedeiros, especialmente algumas espécies de artrópodes. Prescinde, portanto, de interesse em controle biológico (Bartnicki-Garcia, 1968).

Enzimas que hidrolisam componentes da parede celular de fungos

A viabilidade celular depende da integridade dos componentes da parede celular, a qual funciona como barreira seletiva ante as pressões físico-químicas exercidas pelo meio ambiente em que o microrganismo sobrevive. Tal barreira é o ponto inicial das interações envolvidas no processo de antagonismo entre fungos. As enzimas hidrolíticas capazes de hidrolisar os componentes da parede celular desempenham, portanto, papel fundamental no processo antagônico. Dentre as hidrolases destacam-se as celulases, as β-glucanases (celulases, β-1,3- e β-1,6-glucanases), as quitinases e as proteases (Chet & Baker, 1980; Elad et al., 1983a; Benhamou & Chet, 1993; Haran et al., 1996). As principais características e propriedades de enzimas microbianas que hidrolisam polissacarídeos foram descritas em revisão recente (Warren, 1996). Por sua vez, as lipases são ainda pouco consideradas como participantes do antagonismo por micoparasitismo. Da mesma forma, não existem registros que demonstrem a importância em controle biológico de outras enzimas hidrolíticas, como hemicelulases (Filho, 1994; Filho et al., 1996; Ximenes et al., 1996) e amilases (veja De Marco, 1996), que desempenham funções primordiais nos processos fisiológicos e biotecnológicos de hidrólise de componentes de paredes de células vegetais. Existem, no entanto, registros sobre a produção de amilases (De Marco et al., 1997, 1998; Azevedo et al., 1998) e hemicelulases (Ximenes et al., 1996) por isolados de *Trichoderma*, que apresentam atividade antagônica contra fitopatógenos.

Celulases

As celulases constituem o sistema celulolítico produzido por bactérias e fungos aeróbicos e anaeróbicos. Os sistemas produzidos por fungos do gênero *Trichoderma* (Béguin, 1990; Kubicek et al., 1993) são os mais bem caracterizados. O sistema do *T. reesei* consiste em três classes gerais de enzimas: a *exo-glucanase (1,4-β-D-glucana celobiohidrolase; EC 3.2.1.91)*, que age sobre as extremidades não-redutoras da cadeia de celulose, liberando unidades celobiosídicas; a *endo-glucanase (1,4-β-D-glucana 4-glucanohidrolase; EC 3.2.1.4)*, a qual cliva as ligações glicosídicas, de uma forma aleatória, dentro da molécula do substrato; e *a 1,4-β-D-glucosidase (celobiase; β-D-glicosidio glicohidrolase, EC 3.2.1.21)* que, por sua vez, cliva celo-oligossacarídeos para produção de glicose (Kubicek et al., 1993; Haran et al., 1996a). Além das atividades individuais, tais enzimas atuam em sinergismo, isto é, em ação conjunta, proporcionando um aumento na eficiência do sistema celulolítico. Em *T. reesei*, há pelo menos duas celobiohidrolases, duas ou mais endoglucanases e uma β-glucosidase operando em sinergismo na degradação da celulose. Inicialmente, as endoglucanases hidrolisam aleatoriamente ligações glicosídicas internas nas cadeias da superficie das fibras de celulose, produzindo algumas extremidades livres. Em seguida, as celobiohidrolases liberam, uma por uma, unidades de celobiose (dissacarídeos) das extremidades não-redutoras destas cadeias. Por fim, as celobiases hidrolisam os celo-oligossacarídeos, produzindo glicose. Membros de cada um destes grupos de enzimas produzidas por *Trichoderma* foram caracterizados em níveis molecular e genômico (veja Nevalainen & Pentila, 1995). Cepas industriais de *T. reesei*, construídas por extensivos programas de mutagênese, produzem quantidades substanciais de misturas de proteínas extracelulares, dominadas por umas poucas celulases, que foram as primeiras a serem isoladas e caracterizadas em nível gênico. Dentre os genes caracterizados, aparecem o *cbhI* (Shoemaker et al., 1983; Teeri et al., 1983) e o *cbh2* (Chen et al., 1987; Teeri et al., 1987), codificantes de duas principais celobiohidrolases; e o *egl1* (Pentilla et al., 1986; van Arsdell et al., 1987) e *egl2* (originalmente chamado *egl3,* Saloheimo et al., 1988), que codificam duas endoglucanases principais. Três genes adicionais *egl3* (Ward et al., 1993), *egl4* (Saloheimo et al., 1997) e *egl5* (Saloheimo et al., 1994), para endoglucanases de

menor expressão, foram isolados posteriormente. Com exceção da EGII and BGLI (β-glucosidase), todas as celulases de *T. reesei* cujos genes foram caracterizados possuem uma estrutura modular. Elas apresentam um domínio de ligação da celulose (CBD) conservado em sua porção N-terminal ou C-terminal, separado do domínio catalítico por uma região intermediária rica em resíduos de treonina e prolina (veja Saloheimo et al., 1997).

O sistema celulolítico produzido pelos fungos difere substancialmente daquele produzido por bactérias. Nas bactérias anaeróbicas, o exuberante complexo celulolítico constitui verdadeiras organelas exocelulares - denominadas originalmente celulosomas - resultantes da associação das subunidades catalíticas independentes (veja Felix & Ljungdahl, 1993). Além de ser altamente eficiente quanto à hidrólise de celulose cristalina, a eficiência catalítica do celulosoma ultrapassa significativamente as de suas próprias subunidades individuais e as dos sistemas celulolíticos produzidos por fungos filamentosos. Entretanto, a maior capacidade antagônica dos fungos compensa a eficiência catalítica do sistema celulolítico das bactérias anaeróbicas.

β-glucanases

As β-1,3- e β-1,6-glucanas representam a maior parte das β-glucanas presentes na parede celular de fungos filamentosos. O sistema hidrolítico das β-1,3-glucanas é composto das exo e endo-β-1,3-glucanases, que hidrolisam ligações β-glicosídica em uma ação sinergística, com diferentes modos de ação. As β-*1,3-exoglucanases (EC 3.2.1.58)* clivam o polímero, liberando resíduos de glicose a partir da extremidade não-redutora. São as mais abundantes em fungos (Kanzawa et al., 1994). As β-*1,3-endoglucanases (EC 3.2.1.6 ou 3.2.1.39)* clivam aleatoriamente as ligações do tipo b no interior da molécula, liberando pequenos oligossacarídeos (Prokop et al., 1993). Algumas β-1,3-glucanases apresentam atividades endohidrolíticas e exohidrolíticas liberando proporções iguais de glicose, de dissacarídeos e quantidades maiores de oligossacarídeos, a partir da hidrólise de β-glucanas (Pitson et al., 1993). Muitas β-1,3-glucanases de fungos são extracelulares (De La Cruz et al., 1995) e podem hidrolisar polissacarídeos extracelularmente para uma eventual assimilação feita pela célula para o seu interior, viabilizando, assim, o uso de β-glucanas como

única fonte de carbono (Stahmann et al., 1992; *ap.* Pitson et al., 1993). Apresentam, ainda, funções relacionadas com a morfogênese de fungos (crescimento e desenvolvimento) ou com o processo de micoparasitismo. Tanto as β-1,3-glucanases (Lorito et al., 1994a), quanto as β-1,6-glucanases (Lorito et al., 1995) são capazes de inibir a germinação de esporos e inibir o crescimento celular de fitopatógenos. Vários trabalhos indicam que o fungo *Trichoderma harzianum* produz, pelo menos, duas β-1,3-exoglucanases (Dubourdieu et al., 1985; Kitamoto et al., 1987), duas β-1,3-endoglucanase (Lorito et al., 1994a; Noronha & Ulhoa, 1996) e duas β-1,6-glucanases (De La Cruz et al., 1995). Recentemente, uma análise bioquímica da expressão do sistema β-1,3-glucanolítico deste fungo revelou que a cepa IMI 206040 secreta pelo menos sete β-1,3-glucanases, quando induzida por laminarina, uma β–1,3-glucana solúvel (Vasques-Garciduenas et al., 1998). As massas moleculares de cinco destas enzimas variam na faixa de 60 a 80kDa. Destas cinco, uma exo-β-1,3-glucanase de 77kDa foi isolada e caracterizada. As propriedades destas glucanases foram consideradas em revisão (Haran et al., 1996a) e artigos (Noronha & Ulhoa, 1996; Vasques-Garciduenas et al., 1998) recentes. Evidências indicam que várias destas enzimas atuam em sinergismo com outras enzimas hidrolíticas de *T. harzianum* na hidrólise de parede celular de fitopatógenos, como *Botrytis cinerea, Gibberella fujikuroi, Phytophthora syringae* e *Saccharomyces cerevisae* (De La Cruz et al., 1995). Além de participar nos processos de micoparasitismo (Lorito et al., 1994a), as β-glucanases são importantes também para os mecanismos de defesa de plantas contra ataques de fungos fitopatogênicos (Jach et al., 1995).

A manipulação do potencial de produção de β-glucanases por engenharia genética em fungos é ainda incipiente. A endo-β-1,3-glucanase BGN13.1 de *T. harzianum* CECT 2413 foi clonada utilizando um oligonucleotídeo sintetizado a partir de uma seqüência interna da enzima purificada. A seqüência deduzida revelou uma massa molecular de 78kDa para a proteína recombinante processada, que contém três regiões: uma seqüência N-terminal líder, uma seqüência não-definida e uma seqüência C-terminal, rica em cisteína. A análise da seqüência primária indica que esta enzima pertence a um grupo diferente daqueles que incluem β-1,3-glucanases de bactérias, leveduras e plantas. O gene *bgnl3.1* é reprimido por glucose e induzido

por paredes celulares ou micélio autoclavado (De La Cruz et al., 1995). Até bem recentemente, apenas o gene (*bgn16.2*) da β-1,6-endoglucanase de *T. harzianum* havia sido clonado. A seqüência deduzida da proteína ativa apresentou baixa homologia com outras β-glucanases. A proteína recombinante foi produzida em *Saccharomyces cerevisiae* sob o controle de um promotor de levedura, tendo a levedura recombinante alta atividade lítica contra β-1,6- glucana (Lora et al., 1995).

Quitinases

As enzimas quitinolíticas foram descritas pela primeira vez em 1911, como "fator" antifúngico encontrado em bulbos de orquídeas (Bernard, 1911; *ap.* Flach et al., 1992). Entretanto, são encontradas também na mucosa do trato digestivo de alguns vertebrados, como peixes, aves e anfíbios (Stirling et al., 1979) e em microrganismos e plantas (Sahai & Manocha, 1993).

Inúmeros fungos produzem quitinases (Sahai & Manocha, 1993; Lima et al., 1995, 1996, 1997, 1998; De Marco et al., 1997, 1998) que, em geral, constituem sistemas quitinolíticos, cuja complexidade é um desafio bioquímico. As características gerais desses sistemas foram resumidas por Sahai & Manocha (1993). Considerando os produtos de hidrólise da quitina, três tipos de enzimas quitinolíticas foram descritas: as *exoquitinases*, as *endoquitinases* e as β-*1,4-N-acetilglicosaminidases*.

A exoquitinase (EC 3.2.1.14) libera somente diacetilquitobiose ou apenas quitobiose (dímeros de N-acetilglicosamina) de uma forma progressiva, a partir da extremidade não-redutora do polímero. A endoquitinase (EC 3.2.1.14) age aleatoriamente, liberando oligossacarídeos como quitotetrose, quitotriose e quitobiose. Por sua vez, a β-1,4 N-acetilglicosaminidase (EC 3.2.1.30) hidrolisa os oligossacarídeos, formando monômeros de N-acetilglicosamina (GlcNAc) como produto final. A atividade de quitobiase (Ulhoa & Peberdy 1991a), que produz monômeros de GlcNAc a partir da quitobiose, estaria incluída no grupo das β-1,4-N-acetil-glicosaminidases.

A nomenclatura apresentada acima foi revista por Harman et al. (1993) que propuseram, considerando a Nomenclatura Enzimática e trabalhos de purificação e caracterização das respectivas enzimas, uma simplificação:

- *Exoquitinases* (classe das enzimas β-1,4-N-acetilglicosaminidases ou

simplesmente glicosaminidases) são as enzimas que liberam monômeros das extremidades não-redutoras e necessitam de, no mínimo, uma quitobiose como substrato para atuarem;

- β-*1,4-quitobiosidases* atuam liberando unidades diméricas das extremidades não-redutoras e necessitam, no mínimo, de uma quitotriose como substrato para atuarem;
- *Endoquitinases* clivam aleatoriamente polímeros ou oligômeros e não reconhecem as extremidades não-redutoras. Para atuar, estas enzimas necessitam, no mínimo, de uma quitotetrose como substrato.

As propriedades das quitinases, seu envolvimento nos processos antagônicos e sua importância no controle biológico têm despertado grande interesse. Assim como ocorre no sistema celulolítico, os sistemas quitinolíticos mais bem estudados são aqueles produzidos por fungos do gênero *Trichoderma.* A maioria dos trabalhos foi realizada com *T. harzianum,* um agente de biocontrole efetivo para o controle de doenças de plantas causadas por fungos. Considerando apenas aquelas já caracterizadas, sete quitinases induzidas por quitina e com massas moleculares variando na faixa de 31-33kDa a 102-118kDa são produzidas por *T. harzianum.* Dentre elas, estão duas N-acetilglucosaminidase - CHIT 102 (Haran et al., 1995; Ulhoa & Peberdy, 1991a,b) e CHIT 73 (Lorito et al., 1994; Haran et al., 1995); quatro endoquitinases - CHIT 52 (Haran et al., 1995), CHIT 42 (De La Cruz et al., 1992; Ulhoa & Peberdy, 1992; Harman et al., 1993; Lima et al., 1997), CHIT 33 (De La Cruz et al., 1992; Haran et al., 1995), e CHIT 31 (De La Cruz et al., 1992; Haran et al., 1995); e uma exoquitinase - CHIT 40 (Harman et al., 1993).

Um número limitado de genes de quitinases fúngicas foi clonado. Dentre eles, aparece o gene *(ech-42)* da CHIT 42, isolado de um clone de cDNA de T. *harzianum* (Hayes et al., 1994; Garcia et al., 1994). A seqüência inteira, designada previamente ThEn-42, consiste em 1554pb, com uma região ORF codificante de uma proteína de 424 resíduos de aminoácidos. A massa molecular deduzida a partir da clonagem para esta proteína (42.66*kDa*) corresponde ao valor determinado experimentalmente (41kDa) (Hayes et al., 1994). A análise da seqüência N-terminal revelou a presença de um peptídio sinal de 34 aminoácidos (Garcia et al., 1994). A

comparação da sequência genômica e do cDNA revelou uma massa molecular de 46*kDa*, valor relativamente próximo ao calculado (41kDa) para a proteína processada. A análise computacional da seqüência deduzida revelou uma homologia de 73% com a quitinase produzida pelo fungo *Aphanocladium albus* (Carsolio et al., 1994). Outro gene de *T. harzianum* clonado corresponde a um endoquitinase de 33kDa. O cDNA correspondente codifica uma proteína contendo uma seqüência de 321 resíduos de aminoácidos, que inclui um peptídio sinal de 10 aminoácidos (Limón et al., *1995)*. Um gene de *T. harzianum*, codificante de uma N-acetilglucosaminidase de 72kDa (*nagl*), foi o terceiro gene a ser clonado (Peterbauer et al., 1996*)*. A seqüência deduzida da proteína resultante apresentou alta similaridade com N-acetilglucosaminidases de outros eucariontes tais como *Candida albicans* e de tecidos de vertebrados e invertebrados. Tal gene é fortemente induzido por quitina, GlcNAc e parede celular de *Botrytis cinerea* (Peterbauer et al., 1996*)*.

As características moleculares e a atividade biológica de quitinases de fungos, insetos outras foram consideradas em revisões recentes (Haran et al., 1996 *a;* Kramer & Muthukrishnan, 1997). Já é amplamente aceito que o potencial biotecnológico das quitinases não está restrito às enzimas de fungos. Quitinases de plantas e de várias espécies de insetos apresentam alto potencial para o controle de pragas causadas por insetos e fungos. Os vírus transformados, produtores de quitinases de insetos, apresentam alta atividade inseticida, e plantas transgênicas, que expressam constitutivamente quitinases de insetos, exibem resistência significativa ao ataque de pragas. Recentemente, o gene correspondente a uma quitinase (chit1) do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* foi isolado e a seqüência de nucleotídios, analisada (Bogo et al., 1998).

Proteases

O termo *protease*, usado como sinônimo de *peptídio hidrolase*, refere-se a todas as enzimas que clivam ligações peptídicas. As denominações endopeptidase e exopeptidase foram criadas para designar as enzimas que têm ação hidrolítica nas ligações peptídicas internas, amino-terminais e carboxi-terminais, respectivamente (Bergman & Ross, 1936). A denominação proteinase é utilizada como sinônimo de

endopeptidase. As proteases podem ser classificadas quanto às condições hidrogeniônicas ótimas para sua ação (ácidas, neutras e alcalinas), quanto à especificidade ao substrato (colagenase, elastase etc.) ou quanto à similaridade com proteases bem caracterizadas (pepsina, tripsina, catepsina etc.) (North, 1982). O sistema de classificação mais funcional baseia-se na comparação de sítios ativos, de mecanismo de ação e da estrutura tridimensional. Até o momento, quatro classes são reconhecidas pela *União Internacional de Bioquímica*, envolvendo seis famílias cujos membros são, provavelmente, originados por evolução divergente de um ancestral comum (Neurath, 1984): *Serinoprotease I (quimotripsina,* tripsina, elastase); *Serinoprotease II* (subtilisina); *Cisteinoprotease* (papaína); *Aspárticoprotease* (penicilopepsina, renina); *Metaloprotease I* (carboxipeptidase A bovina) e *Metaloprotease II* (termolisina). Considerando a relação estrutural e a função das proteases, uma classificação mais minunciosa incluindo 84 famílias de proteases foi proposta recentemente (Rawling & Barret, 1993).

Muitos fungos produzem proteinases capazes de hidrolisar proteínas nativas, como a proteinase A de *Aspergillus niger* e as *proteinases A1, A2 e B* de *Scytalidium lignicolum.* As metaloproteinases produzidas por fungos apresentam zinco como parte de sua estrutura (Markaryan et al., 1994). Fungos produzem também serinoproteinases, como a proteinase *K* de *Tritirachium album* (Ebeling et al., 1975) e a queratinase de *A. fumigatus (*Santos et al., 1996 a,b). Por outro lado, a ocorrência de cisteinoproteinases em fungo é bastante limitada.

A parede celular de fungos filamentosos contém também proteínas, além de quitina e glucanas (Hunsley & Burnett, 1970). Entretanto, pouca atenção tem sido dada às proteases dentro do contexto de controle biológico. Assim como as proteases secretadas por bactérias e fungos oportunistas ou patogênicos mediam no hospedeiro uma série de processos patológicos (Maeda & Yamamoto, 1996), inclusive o crescimento de hifas através de proteínas fibrilares como colágeno e elastina (Reichard, 1998), as proteases de fungos antagônicos apresentam, possivelmente, funções bem definidas nos processos de antagonismo. De fato, paredes celulares de *Fusarium oxisporum* expostas à ação de proteases tornam-se muito mais sensíveis à ação de hidrolases fúngicas (Sivan & Chet, 1989), indicando, assim, que as proteínas aí

presentes protegem o esqueleto da parede celular do ataque de microrganismos antagônicos. Outros estudos também corroboram o envolvimento das proteases no processo de micoparasitismo. A cepa IMI 206040 de *T. harzianum*, quando na presença de micélio inativado por autoclavagem, de preparações de parede celular de fungos ou de quitina, produz uma protease alcalina (Prb1) capaz de atuar nessa estrutura. Essa proteinase foi bioquimicamente caracterizada e o cDNA e os clones genômicos correspondentes, isolados (Geremia et al., 1993). A seqüência de aminoácidos deduzida indica que esta proteína é sintetizada como uma pré-proenzima e apresenta características de serinoproteinase. Interessante notar que a produção desta enzima é induzida por parede celular ou componentes desta, como a quitina. Na natureza, a secreção desta protease deve ser induzida por um sinal proveniente ou presente na parede celular da célula antagonizada, neste caso, o fitopatógeno.

O isolado de *T. harzianum* 1051, com capacidade antagônica contra *Crinipellis perniciosa*, o agente causador da "vassoura-de-bruxa" do cacaueiro, produz em meio de cultura líquido, contendo caseína como única fonte de carbono, quantidades substanciais de atividade proteolítica (De Marco et. al., 1997, 1998). Uma protease com massa molecular de 18kDa foi isolada deste meio de cultura e apresentou a propriedade de hidrolisar a parede celular de *C. perniciosa*.

Participação de enzimas hidrolíticas no processo antagônico

As interações sociais entre indivíduos de qualquer nível organizacional requerem a existência de afinidade associativa, independentemente da natureza amistosa ou hostil da interação. Em controle biológico de doença de plantas, destacam-se dois níveis associativos nos quais a afinidade é fundamental para a ocorrência das interações envolvidas: no primeiro nível, aparece a afinidade entre o fitopatógeno e o vegetal, o que gera um estado fisiológico (doença) a ser controlado; no segundo, destaca-se a afinidade do antagonista pelo fitopatógeno, afinidade esta que deve ser superior e reverter o estado gerado pela interação destacada anteriormente. No presente caso, interessa-nos entender os processos envolvidos na associação antagonista-fitopatógeno. As afinidades estão aí representadas pelas capacidades de sobrevivência do antagonista e do fitopatógeno no mesmo nicho ecológico, da conversão

dos substratos disponíveis, do reconhecimento celular mútuo e dos poderes destrutivos e defensivos dos microrganismos interagentes. As duas primeiras propriedades são determinantes, ou seja, na ausência delas não existiria a patogenicidade, nem a capacidade de biocontrole. Por sua vez, o sucesso do controle biológico é diretamente proporcional ao poder destrutivo do microrganismo antagônico e inversamente proporcional ao poder de escape do fitopatógeno às agressões impostas. Em ambos os casos, as intensidades são graduais e a virulência dos fiitopatógenos não é uma escolha autônoma. O controle deles dependerá, portanto, da disponibilidade de microrganismos antagônicos que exibam as melhores propriedades em suprimir o desenvolvimento de fitopatógenos. Como já mencionado, microrganismos antagônicos podem atacar fitopatógenos por competição, antibiose, micoparasitismo ou por uma combinação sinergística destes modos de ação (Deacon & Berry, 1992). Experimentos conduzidos no laboratório (Elad et al., 1984; Lima et al., 1997) e experimentos pilotos conduzidos no campo (Latunde-Dada, 1993) mostraram claramente que fungos antagônicos atacam o micélio de fungos fitopatogênicos. Ainda que os mecanismos responsáveis não sejam devidamente conhecidos, inúmeras evidências, inclusive aquelas obtidas com mutantes deficientes (Chernin et al., 1995), indicam que o micoparasitismo envolvendo enzimas hidrolíticas assume papel fundamental no processo (Inbar & Chet, 1994; Lima et al., 1997). O *T. harzianum* na presença de cicloheximida, um inibidor de síntese *de novo* de proteínas, é incapaz de micoparasitar *R. solani* e *S. rolfsii* (Elad et al., 1983a). Inúmeras evidências foram obtidas também com bactérias quitinolíticas, tais como *Serratia marcescens, Arthrobacter* spp. e *Enterobacter* spp. (Hadar et al., 1979; Jones et al., 1986). A despeito da incapacidade de células selvagens de *Escherichia coli* produzirem qualquer efeito antagônico, células dessa bactéria contendo o gene de quitinase de *S. marcescens* inibem o crescimento de *R. solani* e S. *rolfsii*, reduzindo significativamente (~ 60%) a incidência de doenças em feijão e algodão (Shapira et al., 1989). Ao contrário, uma linhagem mutante da bactéria *S. marcescens* (quitinase deficiente) não se opõe ao crescimento de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. (Jones et al., 1986).

Chet (1992) descreveu os passos no processo de micoparasitismo por *Trichoderma* spp. O antagonismo inicia-se com a detecção do hospedeiro pelo

antagonista que, provavelmente, ocorre em resposta à presença de estímulos químicos liberados pelo hospedeiro. O segundo passo seria o reconhecimento e ligação do micoparasita ao seu hospedeiro: crescer paralelamente ou "enrolar-se nele". *R. solani* e *S. rolfsii* possuem, na parede celular, lectinas (glicoproteínas que aglutinam células e precipitam glicoconjugados) que se ligam a resíduos de galactose e fucose, presentes na parede celular de *T. harzianum* (Elad et al., 1983a; Barak et al., 1985). Tais componentes conferem, assim, uma certa especificidade ao sistema antagônico (Sivan & Chet, 1992). Inbar & Chet (1992, 1994) utilizaram fios de nylon para testar uma nova lectina purificada de S. *rolfsii*. A presença da lectina purificada na superfície dos fios de nylon induziu o processo de micoparasitismo, fazendo com que o fungo *T. harzianum* se enrolasse no fio e produzisse estruturas semelhantes a apressórios. Confirmou-se, assim, a participação das lectinas no processo antagônico. A terceira etapa do processo antagônico seria, portanto, a ocasional degradação e lise da parede celular do microrganismo antagonizado. Estudos de microscopia eletrônica de varredura e transmissão revelaram a seqüência dos eventos associados com a degradação de *Botrytis cinerea* por uma cepa de *Trichoderma harzianum* com alta capacidade de biocontrole (Belanger et al., 1995). A primeira mudança ultra-estrutural do micélio de *B. cinerea* foi observada 12h antes do contato entre os organismos presentes na cultura pareada. Estas modificações estruturais estavam caracterizadas por invaginações pontuais do plasmalema e foram seguidas por uma retração gradual, nos quais houve desorganização do citoplasma e pela perda do turgor. A seguir, a morte celular ocorreu 48h após o contato entre *Trichoderma* e *B. cinerea*. As primeiras evidências de penetração de *B. cinerea* por *Trichoderma* ocorreram 72h após o início do contato, devido à pressão mecânica ou digestão enzimática localizada da parede celular. Somente após tempos prolongados (10 dias) de antagonismo, apareceram os indícios de hidrólise generalizada da quitina, indicando que a hidrólise deste componente celular foi aparentemente o último processo na cascata de eventos ocorridos no processo de antagonismo entre *Trichoderma* e *B. cinerea*. As evidências então obtidas indicam que o fungo *Trichoderma* ataca os fitopatógenos primaria e preferencialmente por antibiose (antibióticos), induzindo o fitopatógeno à morte celular, que é seguida da hidrólise dos componentes celulares pelas enzimas quitinolíticas. Neste caso, a

antibiose precede o parasitismo e a colonização interna da hifa hospedeira. Provavelmente, as células enfraquecidas ou mortas são mais facilmente invadidas e as quitinases contribuem mais para a fase saprofítica. Este modelo reflete o que ocorre nas interações fitopatógeno-plantas, nas quais o primeiro desorganiza as células hospedeiras antes de usá-las como nutrientes (Yoder, 1980). Entretanto, ainda não é aceito o fato de a antibiose ser o principal mecanismo de ação do *Trichoderma* na natureza. Existem evidências que indicam claramente que a gliotoxina é o principal determinante do potencial de biocontrole de *Gliocladium virens* (Lumsden & Lewis, 1989). Por outro lado, é bastante conhecido o fato de que a glioxina apresenta a capacidade de atuar sinergisticamente com quitinases purificadas (Di Pietro et al., 1993).

A primeira enzima a ser sintetizada durante o micoparasitismo induzido por estímulo biomimético com fibras de nylon contendo lectina (Inbar & Chet, 1994) foi uma glucosaminidase de 102kDa (CHIT 102), produzida em uma fase precoce do processo. Consistentemente, a CHIT 102 foi a primeira enzima a ser produzida por *T. harzianum* na presença de *S. rolfsii,* crescidos em cultura pareada. Com o progresso da interação, a atividade da CHIT 102 diminuiu concomitantemente ao aparecimento da atividade de outra glucosaminidase de massa molecular de 73kDa (CHIT 73) (Inbar & Chet, 1995). Atividades quitinolíticas são produzidas por *T. harzianum* na presença de parede celular de *B. cinerea* (De La Cruz et al., 1993). De forma idêntica, foi constatada a alta expressão da endoglucanase CHIT 42 durante a interação de *T. harzianum* com *R. solani (*Carsolio et al., 1994) e da quitobiosidase de 40kDa (CHIT 40) e endoquitinase de 41kDa durante o crescimento de T. *harzianum*, na presença de parede celular de *B. cinerea* (Schirmböck et al., 1994). Estas enzimas são reprimidas por glicose. Outras evidências da participação de enzimas quitinolíticas no processo antagônico foram obtidas de forma indireta. Na presença de quitina, *T. harzianum* produz endoquitinases de 40-42kDa (Ulhoa & Peberdy, 1992) e 46kDa (CHIT 46) (Lima et al., 1997; Lima et al. 1998) que, quando isoladas, afetam drasticamente tanto o micélio de *Sclerotium rolfsii* (Figura 1b) quanto as estruturas de resistência, como os escleróciosdeste fitopatógeno (Figura 2b). Na realidade, existem diferenças de expressão gênica induzidas por quitina (Lora et al., 1994). Oligossacarídios de

GlcNAc produzidos pela hidrólise parcial da parede celular de fitopatógenos atuam como sinais para uma resposta antifúngica generalizada. Entretanto, as expressões gênicas da CHIT 42 e CHIT 33 são reguladas diferencialmente.

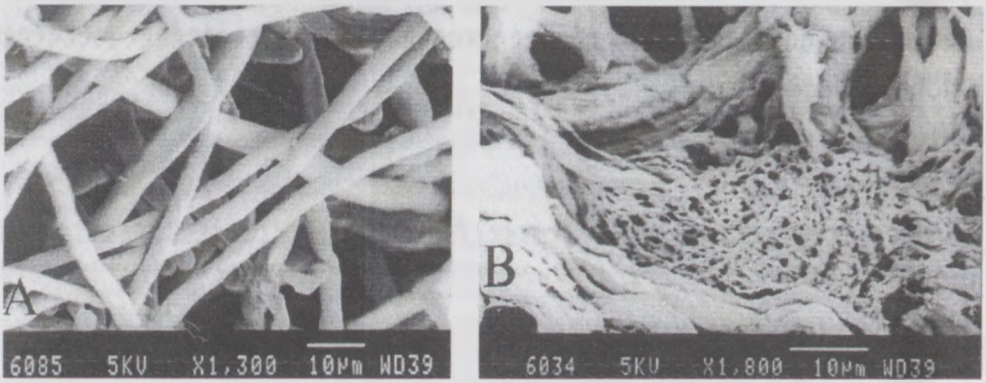


FIGURA 1. Micrografia eletrônica de varredura de estruturas miceliais de *Sclerotium rolfsii*. **A**. Estruturas não-hidrolisadas; **B**. Estruturas submetidas à hidrólise por quitinase (CHIT 46) de *Trichoderma* sp. isolado T_6 (para detalhes sobre metodologia utilizada, vide Lima et al., 1997).

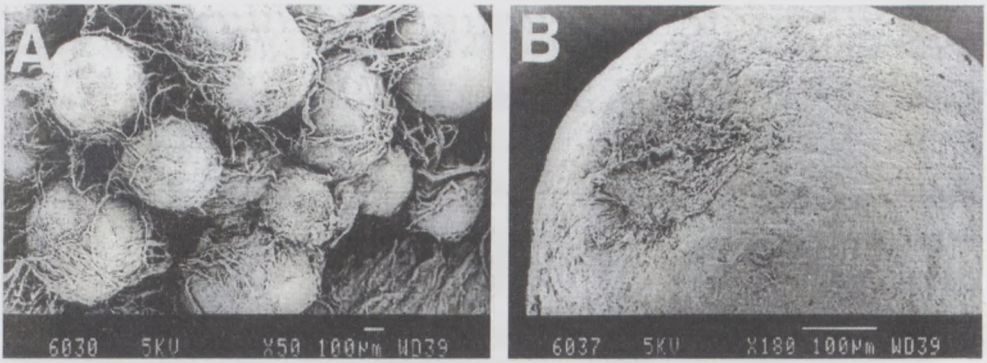


FIGURA 2. Micrografia eletrônica de varredura de estruturas de resistência de *Sclerotium rolfsii*. **A**.estruturas não-hidrolisadas; **B**. Estruturas submetidas à hidrólise por quitinase (CHIT 46) de *Trichoderma* sp. isolado T_6 (para detalhes sobre metodologia utilizada, vide Lima et al., 1997).

A despeito da eficiência das hidrolases microbianas na degradação de paredes celulares de células vegetais e de microrganismos, pouca importância tem

sido dada à participação de celulases nos processos de antagonismo. As informações disponíveis são, em geral, favoráveis a esta participação. Uma cepa hipercelulolítica de *Trichoderma longibrachiatum* mostrou-se muito mais efetiva no combate à infecção de sementes de legumes por *Pythium* do que a linhagem selvagem (Migheli et al., 1994). Por outro lado, a associação de *Trichoderma* com outras células nem sempre está associada com a produção de hidrolases extracelulares. Cepas de *T. harzianum*, celulase-deficientes obtidas por mutagênese com luz ultravioleta, apresentaram alta competência de colonização de rizosfera de *Phaseolus vulgaris*, ao contrário de cepas superprodutoras de celulases obtidas pela mesma metodologia (Melo et al., 1997). As β-1,3- e β-1,6-glucanases de *Trichoderma* são induzidas por paredes celulares de fitopatógenos, isoladas por quitina e por outros substratos, inclusive glicose (Tangarone et al., 1989; De La Cruz et al., 1993; Lorito et al., 1994a). A indução realizada por um açúcar simples indica que a presença do substrato nem sempre é necessária para a síntese de hidrolases, podendo estas ser produzidas constitutivamente (Pitson et al., 1993). Entretanto, a indução simultânea de várias classes de hidrolases, como neste caso, β-glucanases e quitinases, é também uma possibilidade plausível, já que estas duas classes de enzimas apresentam atividades antifúngicas sinergísticas. Estando os substratos destas duas classes de enzimas associados na natureza, assim como na parede celular de fungos (vide acima), uma indução conjunta de glucanases e quitinases pode representar uma vantagem ecológica.

Ao contrário da importância que tem sido dada à participação de proteases nos processos invasivos em humanos por fungos patogênicos e oportunistas (Maeda & Yamamoto 1996; Reichard 1998), os exemplos sobre a participação destas enzimas nos processos de antagonismo em fungos são ainda escassos. Na presença de paredes celulares de *Botrytis cinerea* (Schirmböck et al., 1994), *T. harzianum* produziu quitinases e originou, paralelamente, considerável atividade proteolítica. A protease alcalina (prbl) com possível envolvimento no processo antagônico por *T. harzianum* (Geremia et al., 1993) é induzida também em condições biomiméticas de antagonismo (Flores et al., 1997). Além disso, o envolvimento desta enzima nos processos de antagonismo é fortalecido pelo fato de que paredes celulares de *Rhizoctonia solani* e células intactas do próprio fitopatógeno são capazes de induzir,

em tempo relativamente curto, a expressão do gene correspondente à protease prb1. Recentemente, ficou demonstrado por Lima et al. (1997) que uma protease de 18kDa de massa molecular produzida por um isolado de *Trichoderma* com potencial antagônico contra *Crinipellis pernicosa* (agente causador da "vassoura-de-bruxa" do cacaueiros) é capaz de hidrolisar *in vitro* a parede celular deste fitopatógeno (Figura 3a, b).

FIGURA 3. Micrografia eletrônica de varredura de estruturas miceliais de *Crinipellis perniciosa*. **A**. estruturas não-hidrolisadas; **B**. Estruturas submetidas à hidrólise por protease de *Trichoderma harzianum* 1051 (para detalhes sobre metodologia utilizada, vide Lima et al., 1997).

Sinergismo entre enzimas hidrolíticas e outros metabólitos

Os mecanismos envolvidos nos processos antagônicos não estão restritos à ação de uma única classe de hidrolases, ou mesmo unicamente à ação de enzimas. O *Gliocladium virens* é um eficiente agente de biocontrole dos fitopatógenos *Pythium ultimum, Rhizoctonia solani* e *Phytophtora cactorum* (Di Pietro et al., 1993). Esse fungo produz enzimas quitinolíticas e antibióticos, tais como gliotoxina e gliovirina, que apresentam efeitos inibitórios sobre vários fitopatógenos. A endoquitinase pura, em uma concentração de 150μg.ml^{-1}, inibe eficazmente a germinação de esporos e destrói drasticamente a parede celular nas pontas de hifas. A dose ED_{50} calculada para a gliotoxina foi de 1,25μg.ml^{-1}. Quando adicionados juntos, verificou-se um efeito sinérgico significativo. Doses de 25μg.ml^{-1} e 50μg.ml^{-1} de endoquitinase reduziram para 0,75μg.ml^{-1} e 0,5μg.ml^{-1}, respectivamente, a ED_{50} da gliotoxina. Quando aplicadas individulamente nas concentrações de 0,75μg.ml^{-1} e 75μg.ml^{-1}, a gliotoxina e a

endoquitinase, respectivamente, inibiram em apenas 20% o crescimento das hifas, enquanto que, em conjunto, nestas mesmas concentrações, os dois componentes apresentaram um efeito inibitório de 95%. Na presença da parede celular de *Botrytis cinerea*, *T. harzianum* produz concomitantemente enzimas hidrolíticas e os antibióticos peptabólicos tricloroazina A_1 (TA_1) e B_1 (TB_1) (Schirmböck et al., 1994),os quais, quando isolados, assim como as enzimas hidrolíticas purificadas, inibem a germinação de esporos e o alongamento de hifas de *B. cinerea*, de forma menos eficiente do que o meio de cultura contendo as enzimas e os antibióticos. O efeito inibitório de mistura de enzimas e antibióticos purificados é semelhante ao efeito exercido pelo meio de cultura, sugerindo o sinergismo entre antibióticos e enzimas hidrolíticas. Adicionalmente, o meio de cultura de T. *harzianum*, contendo atividade quitinolítica significante, induzida por quitina, afeta drasticamente *in vitro* o micélio de S*clerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani* (Figura 4a). Entretanto, a quitinase (CHIT 46) isolada deste meio de cultura (Lima et al., 1997) hidrolisa a parede celular de S. *rolfsii*, mas não apresenta qualquer efeito hidrolítico sobre a estrutura celular *R. solani* (Figura 4b). Considerando que o *T. harzianum* antagoniza eficazmente o fitopatógeno *R. solani*, a ação do meio de cultura sobre este fitopatógeno representa uma ação sinergística entre enzimas ou entre estas e outros componentes presentes no meio.

FIGURA 4. Micrografia eletrônica de varredura de estruturas miceliais de *Rhizoctonia solani*. **A.** submetidas à hidrólise pelo sobrenadante de cultura de *Trichoderma* sp. Isolado T_6 **B.** Estruturas não-hidrolisadas (para detalhes sobre metodologia utilizada veja em Lima et al., 1997).

Os eventos moleculares envolvidos no sinergismo entre hidrolases e antibióticos foram estudados durante a interação antagônica entre *T. harzianum* e

Botrytis cinerea (Lorito et al., 1996b). A atividade de β-glucana, sintase da membrana plasmática de *B. cinerea*, pode ser inibida *in vitro* por antibióticos peptabólicos (Triclorozianina TA e TB). Adicionalmente, a incorporação da glicose na parede celular é inibida concomitantemente pelos antibióticos e por β-1,3-glucanases de *T. harzianum*. Tal sinergismo pode ser relevante para o sucesso da ação antagônica de fungos contra fitopatógenos, embora essa característica não seja única de fungos fitopatogênicos. Enzimas quitinolíticas de fungos entomopatogênicos atuam em sinergismo com enzimas proteolíticas, na solubilização de cutículas de insetos, durante a principal etapa de invasão (Bogo et al., 1998).

Uso de genes heterólogos no melhoramento de agentes de biocontrole

Considerando o papel exercido pelas enzimas hidrolíticas no processo antagônico, é esperado que microrganismos superprodutores de hidrolases apresentem capacidade antagônica superior. Entretanto, "os microrganismos evoluíram para adaptação ecológica e não para a eficiência biotecnológica." Tal fato conduz ao estabelecimento, na natureza, de um equilíbrio entre as espécies. Assim como para outros campos da biotecnologia, a simples procura de microrganismos diferenciados não é suficiente para a otimização do controle de doenças de plantas. A maioria das atividades microbianas, que servem como base para aplicações biotecnológicas, provavelmente não funcionará adequadamente, sob condições normais (Timmis, 1994). Uma alternativa para a situação é a obtenção de microrganismos transgênicos com componentes genéticos, que conferem propriedades antagônicas melhoradas. Neste aspecto, a manipulação do genoma pela tecnologia do DNA recombinante pode resultar na obtenção de cepas hiperprodutoras de enzimas hidrolíticas e, conseqüentemente, com poder antagônico superior. Quitinases e glucanases de *T. harzianum* aumentam substancialmente a capacidade antagonista de uma cepa do bioagente *Enterobacter cloacae,* fortalecendo, assim, a concepção de que as hidrolases microbianas e os genes correspondentes são instrumentos potentes para o combate biológico de doenças de plantas (Lorito et al., 1994b).

De fato, várias manipulações gênicas envolvendo enzimas hidrolíticas

foram realizadas em fungos antagonistas. O gene *(chitA)* codificante da maior quitinase de *Serratia marcescens* foi clonado em *Escherichia coli* (Shapira et al., 1989). A proteína recombinante ativa afetou drasticamente as pontas de hifas de *Sclerotium rolfsii,* além de reduzir a incidência das doenças causadas por este fitopatógeno em feijão e por *Rhizoctonia solani* em algodão. Além disso, a eficácia da quitinase de *S. marcescens* foi demonstrada pela introdução do gene *chitA* no simbionte *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti* (Sitrit et al., 1993), que coloniza nódulos radiculares de alfafa. As colônias de *Sinorhizobium* contendo o gene *chiA*, possuíam alta atividade antifúngica durante a simbiose nas raízes de alfafa.

Vários aspectos moleculares do fungo antagonista *Trichoderma,* como sua capacidade de expressão de genes homólogos e heterólogos (Nevalainen et al., 1990) e o potencial de seus genes e produtos gênicos (Lorito et al., 1994b), já são conhecidos. Na expectativa de obter-se elevada taxa de produção de atividade hidrolítica extracelular e elevada capacidade antagônica, protoplastos de *Trichoderma harzianum* foram co-transformados com dois plasmídeos: a) pSL3ChitAII, contendo o gene da quitinase da bactéria *S. marcescens*, sob o controle de um promotor viral constitutivo; e b) p3SR2, contendo o gene para acetamidase clonado de *Aspergillus nidulans,* como um marcador para seleção após transformação. Após crescimento em glicose, os transformantes produziram e secretaram, de forma constitutiva, uma proteína de 58kDa, cujo tamanho corresponde à quitinase de S. *marcescens.* A alta atividade quitinolítica dos transformantes era superior à do fungo selvagem. Por outro lado, o crescimento do fungo em quitina resultava na clivagem proteolítica de uma proteína de 58kDa, em duas proteínas de 40 e 18kDa. Avaliações utilizando culturas pareadas mostraram que os transformantes, assim como o fungo selvagem, sobrepunham-se às culturas de *Sclerotium rolfsii*, apresentando taxas de produção de enzimas hidrolíticas superiores àquelas apresentadas no fungo selvagem. Adicionalmente, a atividade quitinolítica dos transformantes apresentou eficiência quanto à proteção de sementes contra fitopatógenos durante a germinação. Interessante notar que a expressão constitutiva resulta na produção antecipada de atividade hidrolítica. Por outro lado, a produção induzida de enzimas hidrolíticas pelo antagonista ocorre em uma fase tardia, ou seja, após contato deste fungo com o

fitopatógeno, período em que a infecção já tenha sido levada a efeito.

A maioria dos trabalhos com *T. harzianum* como agente de biocontrole foi realizada utilizando fitopatógenos que contêm principalmente β-glucanas e quitina na parede celular. Entretanto, a importância de celulases e proteases, nos processos de antagonismo entre fungos, foi convincente com a utilização de microrganismos manipulados geneticamente. *T. longibrachiatum* foi co-transformado com o plasmídeo pTLEG12, que contém o gene *egl1* de β-1,4-endoglucanase de *T. longibrachiatum* e com o plasmídeo pAN7-1, que confere resistência à higromicina B. Os transformantes hipercelulolíticos resultantes reduziram de 60% para 28% a incidência da doença causada pelo fitopatógeno *Pythium ultimum* em sementes de legumes (Sanches-Torrez et al., 1994). Adicionalmente, o gene da proteinase alcalina pbr1 da cepa IMI 206040 de T. *harzianum* foi inicialmente clonado (Geremia et al., 1993) e reintroduzido em multicópias no genoma do mesmo fungo (Flores et al., 1997). O número de cópias nos transformantes foi estimado em 2-6. Entretanto, a análise da produção de mRNA *prbl* e da proteína prb1 indicou que a alta produção de mRNA *prb*1 não resultava necessariamente em alta produção de proteína. Os vários transformantes obtidos apresentaram um gradiente de produção de proteinase e uma eficácia de proteção das sementes de algodão contra *R. solani.* A proteção conferida, de até cinco vezes em relação à cepa selvagem, confirmou a inferência de que a introdução de multicópias de genes de enzimas hidrolíticas em fungos, sob o controle de seu próprio promotor, resulta no aumento do potencial do microrganismo como agente de biocontrole.

APÊNDICE

ENSAIOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Quitinases

Nome sistemático: poli [1,4-β-2 acetamido-2 desoxi-D-glucosídio]-glicano hidrolase - EC 3.2.1.14.

Reação catalisada: Quitina (N-acetil-glucosamina)$_n$ + H_2O ® N-acetil-glucosamina + quitina (N-acetil-glucosamina)$_m$, sendo que n e m representam

número de resíduos de N-acetilglucosamina, e n > m.

Substrato: quitina

Ensaio enzimático: Duas metodologias são mais utilizadas para ensaios de atividade de quitinases, ou seja, utilizando quitina regenerada ou quitina coloidal como substratos.

1.- O primeiro ensaio é baseado no método originalmente descrito por Molano et al., (1977) e modificado por Ulhoa & Peberdy (1992). Consiste na quantificação de açúcar redutor (método DNS), liberado pela hidrólise da quitina regenerada. A mistura de reação contém 1,0ml de quitina regenerada a 0,5% (p/v) em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,2 e 1,0ml de amostra enzimática. A mistura é incubada em banho-maria a 37°C, durante o tempo mínimo de 6 horas. Em cada experimento são incluídos os seguintes controles: branco da reação (excluindo apenas o substrato); branco total (reação contendo o tampão e água); e branco do substrato (excluindo somente a amostra enzimática). Após esse período, a 200μL de amostra de reação, é acrescentado 1,0ml do reagente DNS e a quantidade de açúcar redutor formada é determinada conforme descrito anteriormente. Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de proteína necessária para produzir 1μmol de açúcar redutor por hora.

2.- O segundo ensaio consiste na determinação da quantidade de N-acetilglicosamina (GlcNAc) liberada da quitina, conforme uma modificação do método de Reissig et al. (1955). A mistura de reação contém 1,0ml de quitina regenerada, a 0,5% (p/v) de tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,2 e 1,0ml de amostra enzimática (Molano et al., 1977; Ulhoa & Peberdy, 1992). A mistura é incubada em banho-maria a 37°C, durante o tempo mínimo de 6 horas. Do volume final de reação (2ml), 250μL são retirados e transferidos para tubos de ensaio contendo 50μL de tampão tetraborato de potássio 0,8M e pH 9,1. Esta mistura é fervida durante 3 minutos, e à ela é adicionada 1,5ml de solução de *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) 1% (p/v)/HCl 1,25% (v/v), dissolvidos em ácido acético. O tubo é incubado a 37°C, por 10 minutos, para a estabilização da coloração. A absorbância da amostra é feita a 595nm e a

quantidade de GlcNAc é determinada utilizando uma curva padrão. Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de proteína necessária para formar 1μmol de GlcNAc por hora, a 37°C.

Curiosidade: (Brune et al., 1998)

Quitina: é o principal componente do exoesqueleto dos invertebrados que vivem no mar (lagostas, caranguejos e outros crustáceos), dos insetos e da parede celular de fungos e de algumas algas, sendo um dos aminopolissacarídeos mais abundantes da natureza. É um biopolímero linear e insolúvel em água, consistindo em moléculas formadas por cadeias de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), unidas por ligações glicosídicas β-1,4.

Quitosana: possui a estrutura da quitina, no entanto contém grupos amino não-acetilados. Encontra-se nas paredes celulares de alguns fungos e é um agente de defesa contra patógenos em plantas e animais.

β-N-acetil-D-glucosaminidase

Nome sistemático: 2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucosido-acetamido-desoxigluco-hidrolase-EC 3.2.1.30.

Reação catalisada: Quitobiose ® GlcNAc + GlcNAc.

Substrato: *p*-nitrofenil-N-acetilglicosamina.

Preparo do substrato: Solução *p*-nitrofenil-N-acetilglicosamina 5mM, dissolvida em tampão fosfato de sódio 10mM , pH 6,0.

Ensaio enzimático:

A atividade de N-acetilglicosaminidase é quantificada medindo-se a 405nm o *p*-nitrofenol (*p*NP) produzido a partir do substrato *p*-nitrofenil-N-acetilglicosamina (Yabuki et al., 1986). A mistura de reação contém 350mL de tampão fosfato de

sódio 10mM (pH 6,0), 50mL de amostra enzimática e 100mL da solução de substrato. A reação é conduzida por 15 minutos, a 37°C e interrompida pela adição de carbonato de sódio 0,25M. Determina-se a absorbância da amostra a 405nm, e a quantidade de *p*NP formado usando uma curva padrão. Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de proteína necessária para produzir 1mmol de *p*NP por minuto.

β-1,3 Glucanase

Nome sistemático : β-1,3-glicano glicanoidrolase - EC 3.2.1.39

Reação catalisada: laminarina ® $(glicose)_m$ + $(glicose)_m$, sendo n e m número de resíduos de glicose.

Substrato utilizado: laminarina

Preparo do substrato: laminarina 1% (p/v) dissolvida em tampão acetato de sódio 50mM (pH 5,0).

Ensaio enzimático:

A atividade de β-1,3 glucanase é determinada pela quantificação de açúcar redutor (método DNS) liberado da hidrólise de laminarina (Santos et al., 1977). A mistura de ensaio contém 100µL de amostra enzimática e 100µL de laminarina 1% (p/v) dissolvida em tampão acetato de sódio 50mM (pH 5,0). As amostras são incubadas durante 30 minutos, a 37°C. Em seguida, é adicionado a cada amostra 1ml do reagente de DNS. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de proteína necessária para produzir 1mmol de açúcar redutor por minuto.

CELULASES

Nome sistemático: 1,4-β-D-glucano-4-glucano-hidrolase.

Reação catalisada: $(glicose)_n \xrightarrow{®} (glicose)_m + (glicose)_p$, sendo $n > m > p$ e $p \geq 1$

Substrato: celulose (celulose microcristalina, papel de filtro, carboximetilcelulose), celobiose, r-nitrofenil-β-D-glicopiranosídio.

Ensaio enzimático:

Ensaio para celulase total

A atividade de celulase total é determinada utilizando-se celulose microcristalina ou papel filtro como substrato (Mandels et al., 1976). Em um tubo de ensaio, contendo 500μl de tampão citrato de sódio 50mM, pH 4,5, e 30mg de celulose microcristalina ou uma tira de papel Whatman nº1 (1 x 6cm), adiciona-se 250μl de amostra enzimática. A mistura é incubada a 50°C, por 60 minutos e a reação interrompida pela adição de 1,5ml do reagente de dinitrossalicílico (Miller, 1959), sob aquecimento em banho de água fervente por 5min. A quantidade de açúcar redutor formado é estimada espectrofotometricamente a 550nm, utilizando-se glicose como padrão. Uma unidade de enzima é definida como sendo a quantidade de proteína que libera 1mg de açúcar redutor por minuto nas condições descritas.

Ensaio para Endo-1,4-β-glucanase - EC 3.2.1.4

(Sinônimo: CM-Celulase)

A determinação da atividade para CM-Celulase é feita pela adição da amostra enzimática (0-250μL) a 500μL de tampão citrato 50mM, pH 6,0, contendo 1% de CMC (baixa viscosidade). Esta mistura é então incubada durante 1h, a 50°C, e a reação é interrompida com a adição de 1,5ml de DNS (Miller, 1959). A quantidade de açúcar redutor formada é estimada espectrofotometricamente a 550nm, utilizando-se glicose como padrão. Uma unidade de enzima é definida como sendo a quantidade de enzima que libera 1mg de açúcar redutor por minuto nas condições descritas anteriormente.

Ensaio para β-glicosidase - EC 3.2.1.21

(Sinônimo: Celobiase)

A atividade de celobiase é feita pela adição de 1ml da amostra de uma solução de celobiose (15mM), dissolvida em tampão acetato de sódio (50mM), pH 5,0. Após homogeneização, a mistura é incubada por 30 minutos, a 50°C e a reação é interrompida por imersão dos tubos em banho de água fervente, por 5 min. A quantidade de glicose formada é determinada utilizando-se o método de glicose-oxidase (Trinder, 1969). Uma unidade de enzima é definida como sendo a quantidade de proteína que produz 1mg de glicose por minuto (Sternberg et al., 1970).

Ensaio de aril-β-D-glicosidase - EC 3.1.1.2

(Sinônimo: rNPGase)

A atividade de aril-β-D-glicosidase é medida adicionando-se amostra enzimática (10 - 250µL) a 250µL de rNPG (4mM) e 500µL de tampão acetato de sódio (100mM), pH 5,0. A mistura é incubada a 42°C, durante 10 minutos e a reação é interrompida pela adição de 1ml de carbonato de sódio (1M). A quantidade de *p*-nitrofenil (rNP) formada é determinada medindo-se a absorbância da amostra a 405nm, e utilizando-se uma curva padrão construída com rNP. Uma unidade de enzima é definida como sendo a quantidade de proteína que libera 1mmol de rNP por minuto, nas condições acima.

PROTEASE (Kunitz, 1946)

Nome sistemático: peptidil-peptídio hidrolase (EC 3.4.)

Reação catalizada: $(\text{aminoácido})_n$ à $(\text{aminoácido})_m$ + $(\text{aminoácido})_p$, sendo n > m > p, e p ³ 1.

Ensaio enzimático:

A atividade proteolítica total é determinada segundo o método descrito por Kunitz (1946), com pequenas modificações. O sistema de reação consiste de 500µL de uma solução de caseína "Hammarsten" 1%, dissolvida em tampão Hepes

0,1M, pH 8,0, 250μL deste mesmo tampão e 250μL de enzima. A mistura é incubada a 37°C, durante 20 minutos e a reação é interrompida pela adição de TCA 5%. Após 40 minutos de incubação no gelo, as amostras são centrifugadas e a absorbância do sobrenadante determinada a 280nm. Uma unidade de atividade enzimática é definida como sendo a quantidade de proteína necessária para aumentar, em uma unidade, a absorbância do sobrenadante da mistura de reação a 280nm, por 20 minutos de reação.

Lipase (Kordel et al., 1991)

Nome sistemático: triacilglicerol acil-hidrolase EC 3.1.1.3.
(Sinônimo: glicerol éster hidrolase).

Reações catalizadas: As lipases hidrolisam mono-, di- e triacilgliceróis, podendo a acila do ácido ser de comprimento bem variado. As lipases ainda revertem a reação, atuando então por esterificação. A hidrólise, assim como a esterificação, requer substrato não-solúvel em água e ocorre em interfase óleo-água.

Substratos: *p*-nitrofenilpalmitato, *p*-nitrofenilbutirato, tri-butiril-tioglicerol

Preparo do substrato: O substrato é preparado segundo a descrição feita por Winkler & Stuckmann (1979), com pequenas modificações:

Solução A: *p*-nitrofenilpalmitato (p-NPP) ou *p*-nitrofenilacetato (p-NPA) são dissolvidos em 10ml de 2-propanol em concentrações finais de 16,5 e 50mM, respectivamente, utilizando-se um sonicador por 6 minutos, à temperatura ambiente.

Solução B: para o ensaio de p-NPP é necessário uma solução tampão Tris-HCl 50mM, pH 8.0, contendo Triton X-100 a 0,4% e goma arábica a 0,1%. Para o ensaio de p-NPA é necessário uma solução tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7.0. O *p*-nitrofenilacetato é instável em pH acima de 7 e, por ser um reagente solúvel, não é necessária a utilização de Triton X-100 e goma arábica.

Obs: As soluções são estáveis por duas semanas, quando refrigeradas.

Ensaio enzimático:

A mistura de reação contendo uma parte da solução A e nove partes da solução B é preparada no momento da utilização. A 100µL de amostra enzimática são acrescentados 900µL da mistura de reação. O sistema reagente é então incubado a 37°C durante 10 minutos. O progresso da reação é quantificado medindo-se a absorbância da mistura a 410nm. Nessas condições, o coeficiente de extinção (ϵ_{410}) de *p*-nitrofenol é calculado em 15 x $10^6 cm^2/mol$. Uma unidade de atividade de lipase é definida como sendo a quantidade de proteína necessária para liberar 1mmol de ácidos graxos ou *p*-nitrofenol de trioleina (triolein) e pNPP, respectivamente, por minuto.

OUTRAS METODOLOGIAS

Preparo de quitina regenerada

O procedimento consiste na acetilação de quitosana ("chitosan"), conforme descrito por Molano et al. (1977). Um grama de quitosana dissolvida em 100ml de ácido acético 10%(v/v) é macerado em um gral de porcelana e incubado por 17 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, adicionam-se, lentamente, 30ml de metanol e a solução obtida é filtrada em gaze. Ao filtrado é adicionado anidrido acético, sob agitação lenta, até que a solução fique gelatinosa. Deixa-a para solidificar por 30 minutos, à temperatura ambiente. A mistura gelatinosa é homogeneizada em um liquidificador, com um volume de metanol e posteriormente centrifugada a 12.000g, por 15 minutos a 4°C. O sedimento é lavado exaustivamente com água destilada até a sua neutralização (pH 7,0), liofilizado e estocado a 20°C.

Preparo de quitina coloidal

Vinte gramas de quitina sólida são dissolvidos em 500ml de ácido clorídrico concentrado sob agitação por 4 horas a 4°C. A mistura obtida é então filtrada em lã de vidro e são adicionados ao filtrado, 500ml de etanol 50% (v/v). A agitação é mantida por mais um período de aproximadamente 30 minutos, até a formação de um precipitado branco. Deixa-se a solução para decantar por 15 horas, a 4°C. O

precipitado é então coletado por filtração a vácuo em papel Whatman nº 1, com lavagens sucessivas em água destilada até a neutralização do pH. A quitina obtida é liofilizada e estocada a temperatura ambiente (Barreto, 1995).

Preparo do reagente de dinitrossalicilato (DNS)

O reagente DNS é preparado adicionando-se lentamente à solução A (10g de DNS dissolvidos em 200ml de NaOH 2M aquecido a aproximadamente 70°C) solução B (300g de tartarato de Na^+ e K^+ tetrahidratado dissolvidos em 500ml de H_2O) e o volume final completado com água para 1 litro.

Dosagem de açúcar redutor

Amostras de 200µ são adicionadas a 1,0ml de reagente DNS e a mistura é incubada a 96°C, por 10 minutos (Miller, 1959). A quantidade de açúcar redutor presente é determinada espectrofotometricamente a 550nm utilizando-se curvas-padrões construídas com um açúcar redutor. Para ensaio de quitinase, a curva é construída com N-acetil-glicosamina; para ensaio de celulases e β-1,3 glucanase, utiliza-se glicose como açúcar redutor padrão.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr.Sebastião Corrêa Côrtes e à Professora Laura Campos, pela revisão do manuscrito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos.** São Paulo: Manole, 1986.
ARONSON, J. M.; Cooper, B.A.; Fuller, M.S. Glucans of Oomycete cell walls. **Science**, v.155, p. 332-335, 1967.

AZEVEDO, A. M. C.; MARCO, J. L.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FELIX, C. R. Purification of an amylase from *Trichoderma* which has antagonistic activity against *Crinipellis perniciosa*. In:REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 27, 1998, Caxambu, MG. **Anais**. Caxambu, 1998. Resumo K 52.

BALLOW, C. E. Yeast cell wall and cell surface. In: STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BOACH, J.R., ed. **The molecular biology of the yeast Saccharomyces**: metabolism and gene expression. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab., 1982. p.335-360.

BARAK, R.; ELAD, Y.; MICRELMAN, O.; CHET, I. Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, v.15, p.458-462, 1985.

BARTNICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. **Annual Review of Microbiology**, v.22, p.87-109, 1968.

BARRETO, C.C. Quitinases do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 88p. Dissertação de Mestrado.

BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, v.44, p.219-248, 1990.

BÉLANGER, R. R.; DUFOUR, N.; CARON, J.; BENHAMOU N. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. **Biocontrol Science and Technology**, v.5, p.41-53, 1995.

BENHAMOU, N.; CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. **Phytopathology**, v.83, p.1062-1071, 1993.

BERGMAN, M.; ROSS, W. F. On proteolytic enzymes. X. The enzymes of papain and their inativation. **Journal of Biological Chemistry**, v.114, p. 717-726, 1936.

BOGO, M. R.; ROTA, C. A.; PINTO JR., H.; OCAMPOS, M.; CORREA, C. T.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. **Current Microbiology**, v.37, p.221-225, 1998.

BOSCH R.V.; Messenger P. S. The history and development of biological control. In: BOSCH, R.V.; MESSENGER, P.S. **Biological control**. [S.l.]: Intext Press, 1974. p.19-33.

BRUNE, W.; ALFENAS, A.C.; JUNGHANS, T.G. Identificações específicas de enzimas em géis. In: ALFENAS, A.C., ed. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, 1998. p.287.

BULAWA, C. E. Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. **Annual Review of Microbiology**, v.47, p.505-534, 1993.

CABIB, E.; ROBERTS, R.; BOWERS, B. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v.51, p.763-793, 1982.

CABIB, E. The synthesis and degradation of chitin. **Advances in Enzymology**, v.59, p.59-101, 1987.

CABIB, E.; BOWERS, B.; SBURLATI, A.; SILVERMAN, S.J. Fungal cell wall synthesis: Construction of a biological structure. **Microbiology Science**, v.5, p.370-375, 1988.

CABIB, E.; SILVERMAN, S.J.; SHAW, J. A. Chitin synthetases 1 and 2 from yeast, two isoenzymes with diferent functions. In: LATGÉ, J.P.; BOUCIAS, D., ed. **Fungal cell wall and imune response**. Berlin: Springer-Verlag, 1991. p.39-48. (NATAO ASI Series, H53).

CARSOLIO, C.; GUTIERREZ, A.; JIMENEZ, B.; VAN MONTAGU, M.; HERRERA-ESTRELLA, A. Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. **Proceedings of the National Academy of Science (USA)**, v.91, p.10903-10907, 1994.

CAVALCANTI, M. G.; VILELA, E. F.; EIRAS, A. E.; ZANUNCIO, J. C. Comportamento de busca do percevejo predador *Podisus connexivus*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4., 1994, Gramado, RS. **Anais**: sessão de pôsteres. Pelotas: EMBRAPA-CPACT, 1994. p.288.

CHEN, C. C.; GRITZALI, M.; STAFFORD, D. W. Nucleotide sequence and deduced primary structure of cellobiohyudrolase II from *Trichoderma reesei*. **Biotechnology**, v.5, p.274-278, 1987.

CHÉRIF, M.; BENHAMOU, N. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum f.* sp. *radicis-lycopersici*. **Phytopathology**, v.80, p.1406-1414, 1990.

CHERNIN, L.; ISMAILOV, Z.; HARAN, S.; CHET. I. Chtinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. **Journal of Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1720-1726, 1995.

CHET, I. *Trichoderma* - Application, mode of action and potential as a biocontrol agents of soilborne plant pathogenic fungi. In: CHET, I., ed. **Innovative approaches to plant disease control**. New York: J. Wiley, 1987. p.137-160.

CHET, I. Microbial control of plant diseases. In: **Environmental microbiology**. New York: Wiley-Liss, 1992. p.335-354.

CHET, I.; Baker, R. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology**, v.70, p.994-998, 1980.

COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. **Current Opinion in Biotechnology**, v.9, n.3, p.270-277, 1998.

COOPER, B.A.; ARONSON, J. M. Cell wall structure of *Pythium debaryanum*. **Mycologia**, v.59, p.658-670, 1967.

COUGLAN, M.P.; HAZELWOOD, G.P., ed. **Hemicellulases**. London: Portland Press, 1993.

DEACON, J. W.; BERRY, L. A. Modes of action of mycoparasites in relation to biocontrol of soilborne plant pathogens.In: TJAMOS, E.C.; PAPAVIZAS, G.C.; COOK, R.J., ed. **Biological control of plant diseases**. New York: Plenum Press, 1992. p.157-167.

DEBACH, P **Biological control of insect pests and weeds**. New York: Reinhold, 1964. 844p.

DEBONO, M.; GORDEE, R. S. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. **Annual Review of Microbiology**, v.48, p.471-497, 1994.

DE LA CRUZ, J.; HIDALGO-GALLEGO, A.; LORA, J. M.; BENITEZ, T.; PINTOR-TORO, J. A.; LLOBELL, A. Isolation and

characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. **European Journal of Biochemistry**, v.206, p.859-867, 1992.

DE LA CRUZ, J.; REY, M.; LORA, J. M.; HIDALGO-GALLEGO, A.; DOMINGUEZ, F.; PINTOR-TORO, J. A.; LLOBELL, A.; BENITEZ, T. Carbon source control on b-glucanases, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. **Archives of Microbiology**, v.159, p.316-322, 1993.

DE LA CRUZ, J.; PINTOR-TORO, J. A.; BENITEZ, T.; LLOBELL, A. Purification and characterization of an endo-b-1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.6937-6945, 1995.

DE MARCO, J. L.; BATAUS, L. A.; VALÊNCIA, F. F.; ULHOA, C. J.; ASTOLFI-FILHO, S.; FELIX, C. R. Purification and characterization of a truncated *Bacillus subtilis* a-amylase produced by *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.44, p.746-752, 1996.

DE MARCO, J. L.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FELIX, C. R. Production of hydrolytic enzymes by two *Trichoderma* isolates showing antagonistic activity agains the cocoa witches' broom fungus *Crinipellis perniciosa*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 26., 1997, Caxambu, MG. **Programa e resumos**. Caxambu, 1997.

DE MARCO, J. L.; FELIX, C. R.; LIMA, L. H. C.; VALADARES-INGLIS, M. C. Avaliação da produção de enzmimas hidrolíticas por isolados de *Trichoderma harzianum* com potencial antagônico contra o agente (*Crinipellis perniciosa*) causador da "Vassoura-de-bruxa". In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., 1998, Rio de Janeiro, RJ. **Anais**. Rio de Janeiro, 1998. p.20.

DI PIETRO, A.; LORITO, M.; HAYES, C. K.; BROADWAY, R. M.; HARMAN, G. E. Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. **Phytopathology**, v.83, p.308-313, 1993.

DJACZENKO, W.; CASSONE, A. Visualization of new structural components of *C. albicans* with fixative containing TAPO. **Journal of Cell Biology**, v.52, p.186-190, 1972.

DUBOURDIEU, D.; DESPLANQUES, C.; VILLETTAZ, J. C.; RIBEREAU-GAYON, P. Investigations of na industrial b-D-Glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Carbohydrate Research**, v.144, p.277-287, 1985.

EBELING, W.; HENNRICH, N.; KLOCKOW, M.; METZ, H.; ORTH, H. D.; LANG, H. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. **European Journal of Biochemistry**, v.47, p.91-97, 1975.

ELAD, Y.; BARAK, R.; CHET I. Possible role of lectins in mycoparasitism. **Journal of Bacteriology**, v.154, p.1431-1435, 1983.

ELAD, Y., BARAK, R.; CHET I. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.16, p.381-386, 1984.

FARKAS, V. Biosynthesis of cell walls in fungi. **Microbiology Review**, v.43, p.117-144, 1979.

FELIX, C.R.; LJUNGDAHL, L. G. The Cellulosome: The exocellular organelle of *Clostridium*. **Annual Review of Microbiology**, v.47, p.791-819, 1993.

FILHO, E.X.F. The Xylan-degrading enzyme system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.27, p.1093-1109, 1994.

FILHO, E. X. F.; Puls, J.; Coughlan, M. P. Purification and characterization of two arabinofuranosidases from solid-state cultures of th fungus *Penicillim capsulatum* **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.168-173, 1996.

FILHO, E.X.F. Hemicellulases and Biotechnology. **Recent Research Development in Microbiology**, v.2, p.165-176, 1998.

FLACH, J.; PILET, P.; JOLLÈS, P. What's new in chitinase research. **Experientia**, v.48, p.701-715, 1992.

FLORES, A.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* strains by over-expression of the proteinase encoding gene prb1. **Current Genetics**, v.31, n.1, p.30-37, 1997.

FULLER, M. S.; BARSHAD I. Chitin and cellulose in the cell walls of *Rhizidiomyces* sp. **American Journal of Botany**, v.47, p.838-842, 1960.

GARCIA I.; LORA, J. M.; DE LA CRUZ, J.; BENÍTEZ, T.; LLOBELL, A.; PINTOR-TORO, J. A. Cloning and characterization of a chitinase (CHIT 42) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. **Current Genetics**, v.27, p.83-89, 1994.

GEREMIA, R.; GOLDMAN, G. H.; JACOBS, D.; ARDILES, W.; VILA, S. B.; VAN MONTAGU, M.; HERRERA-ESTRELLA, A. Molecular characterization of the proteinase-enconding gene, prb1, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. **Molecular Microbiology**, v.8, p.603-613, 1993.

HADAR, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v.69, p.64-68, 1979.

HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; LORITO, M; BROADWAY, R. M.; DI PIETRO, A.; PETERBAUER, C.; TRONSMO, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. **Phytopathology**, v.83, p.313-318, 1993.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; OPPENHEIM, A.; CHET, I. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. **Mycological Research**, v.99, p.441-446, 1994.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; CHET, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, v.142, p.2321-2331, 1995.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; OPPENHEIM, A.; CHET, I. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. **Phytopathology**, v.86, p.980-985, 1996.

HAYES, C. K.; KLEMSDAL, S.; LORITO, M.; DI PIETRO, A.; PETERBAUER, C., NAKAS, J. P.; TRONSMO, A.; HARMAN, G. E. Isolation and sequence of an endochitinase gene from a cDNA library of *Trichoderma harzianum*. **Gene**, Amsterdam, v.138, p.143-148, 1994.

HUNSLEY, D.; BURNETT, J. H. The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi. **Journal of General**

Microbiology, v.62, p.203-218, 1970.

INBAR, J.; CHET, I. Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.1055-1059, 1992.

INBAR, J.; CHET, I. A newly isolated lectin from the plant pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*: purification, characterization and its role in mycoparasitism. **Microbiology**, v.140, p.651-657, 1994.

INBAR, J.; CHET, I. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, v.141, p.2823-2829, 1995.

JACK, G.; GORNHARDT, B.; MUNDY, J.; LOGEMANN, J.; PINSDORF, E.; LEAH, R.; SCHELL, J.; MASS, C. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. **Plant Journal**, v.8, p.97-109, 1995.

JEUNIAUX. Chitinases. **Methods in Enzymology**, v.8, p.644-650, 1966.

JONES, D. G.; GRADY, K. L.; SUSLOW, T.V.; BEDBROOK, J. R. Isolation and characterization of gene enconding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens*. **EMBO Journal**, v.5, p.467-473, 1986.

KANZAWA, Y.; KURASAWA, T.; KANEGA, Y.; HARADA, A.; HARADA, T. Purification and properties of a new exo-b-1,3-glucanase from *Bacillus circulans* YK9 capable of hydrolysing resistant curdlan with formation of only laminaribiose. **Microbiology**, v.140, p.637-642, 1994.

KITAMOTO, Y.; KONO, R.; SHIMOTORI, A.; MORI, N.; ICHIKAWA, Y. Purification and some properties of an exo-b-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Agriculture and Biological Chemistry**, v.51, p.3385-3386, 1987.

KORDEL, M.; HOFMANNM, B.; SHOMBURGB, D.; SCHMID, R. D. Extracellular lipase of Pseudomonas sp. Strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.4836-4841, 1991.

KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinases: Molecular biology and potential use as biopesticieds. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.27, p.887-900, 1997.

KUBICEK, C.; MESSNER, R.; GRUBER, F.; MACH, R.; KUBICEK-PRANZ, M.; KUBICEK-PRANZ, E. The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme Microbiology Technology**, v.15, p.90-99, 1993.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. **Journal of General Physiology**, v.29, p.149-154, 1946.

LATUNDE-DADA,O. A. Biological control of southern blight disease of tomato caused by *Sclerotium rolfsii* with simplified mycelial formulations of *Trichoderma koningii*. **Plant Pathology**, v.42, p.522-529, 1993.

LIMA, L.H.C.; ULHOA, C.J.; FELIX, C.R. Análises de enzimas hidrolíticas produzidas por isolados de *Trichoderma* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 27., 1995, Ilheus, BA. **Anais.** Ilheus: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1995.

LIMA, L.H.C.; ULHOA, C.J.; FELIX, C.R. Ação da quitinase de *Trichoderma* sp. Nos fitopatógenos *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu, PR. **Anais.** Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1996.

LIMA, L. H. C.; ULHOA, C.J.; FERNANDES, A. P.; FELIX, C. R. Purification of a chitinase from *Trichoderma* sp and its action on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.43, p.31-37, 1997.

LIMA, L. H. C.; DE MARCO, J. L.; ULHOA, C. J.; FELIX, C. R. Synthesis of a *Trichoderma* chtinase which affects the *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. **Folia Microbiologica**, v.44, p.45-49, 1999.

LIMON, M. C.; LORA, J. M.; GARCIA, I.; DE LA CRUZ, J.; LLOBELL, A.; BENITEZ, T.; PINTOR-TORO, J. A. Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chtinase gene from the mycoparasite fungus *Trichoderma harzianum*. **Current Genetics**, v.28, p.478-483, 1995.

LORA, J. M.; DE LA CRUZ, J.; BENITEZ, T.; LLOBELL, A.; PINTOR-TORO, J. A. A putative catabolite-repressed cell wall protein from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. **Molecular and General Genetics**, v.242, p.461-466, 1994.

LORA, J. M.; DE LA CRUZ, J.; LLOBELL, A.; BENITEZ, T.; PINTOR-TORO, J. A. Molecular characterization and heterologous expression of na endo-b-1,6-glucanase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. **Molecular and General Genetics**, v.247, p.639-645, 1995.

LORITO, M.; HAYES, C. K.; DI PIETRO, A.; WOO S. L.; HARMAN, G. E. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan b-1,3-glucosidase and an N-acetyl-b-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v.84, p.398-405, 1994a.

LORITO, M.; HAYES, C. K.; ZOINA, A.; SCALA, F.; DEL SORBO, G.; WOO, S. L.; HARMAN, G. E. Potential of genes and gene products from *Trichoderma* sp. and Gliocladium sp. for the development of biological pesticides. **Molecular Biotechnology**, v.2, p.209-217, 1994b.

LORITO, M.; MACH, R. L.; SPOSATO, P.; STRAUSS, J.; PETERBAUER, C. K.; KUBICEK, C. P. Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protgein to promoter sequences of the ech42 (endochtitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. **Proceedings of the National Academy of Science (USA)**, v.93, p.14868-14872, 1996 a.

LORITO, M.; FARKAS, V.; REBUFFAT, S.; BODO, B.; KUBICEK, C. P. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.6382-6385, 1996 b.

LORITO, M.; WOO, S. L.; FERNANDEZ, I. G.; GOLUCCI, G.; HARMAN, G. E.; PINTOR-TORO, J. A.; FILIPPONE, E.; MUCCIFORA, S.; LAWRENCE, C. B.; ZOINA, A.; TUZUN, S.; SCALA, F. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proceedings of the National Academy of Science (USA)**, v.95, p.7860-7865, 1998.

LUMSDEN, R. D.; LEWIS, J. A. Selection, production, formulation and commercial use of plant disease biocontrol fungi: problems and progress. In: WHIPPS, J.M.; LUMSDEN, R.D. **Biotechnology of fungi for improving plant growth**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. p.171-190.

MAEDA, H.; YAMAMOTO, T. Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections. **Biological Chemistry Hoppe Seyler**, v.377, p.217-226, 1996.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurment of saccharifying cellulase. **Biotechnology and Bioengeneering Symposium**, v.16, p.21-33, 1976.

MARKARYAN, A.; MOROZOVA, I.; YU, H.; KOLATTUKUDY, P. E. Purification and characterization of ana elastinolytic metalloprotgease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron ;microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. **Infection and Immunology**, v.62, p.2149-2157, 1994.

MELO, I. S. Controle biológico de fitopatógenos de solo. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2., 1990, Brasília, DF. **Anais**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1990. p.63.

MELO, I. S. Feasibility of classical biological control of plant diseases. In: INTERNATIONAL PLANT PROTECTION CONGRESS, 12., 1991, Rio de Janeiro,RJ. **Plenary lectures and symposia**. Symposium NBR 10 "Classical approaches of biological control". Rio de Janeiro, 1991a.

MELO, I. S. Potencialidades da utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W., org. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991b. p.135-156.

MELO, I. S. Controle de patógenos de raízes por fungos antagônicos e seus metabólitos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28., 1995, Ilheus, BA. **Anais**. Ilheus: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1995. Palestra n. P-8.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L., ed. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. v.1.

MELO, I. S.; FAULL, J. L.; GRAEME-COOK, K. A. Relationship between in vitro cellulase production of uv-induced mutants of *Trichoderma harzianum* and their rhizosphere competence. **Mycological Research**, v.101, p.1389-1392, 1997.

MIGHELI, Q.; FRIARD, O.; RAMON-VIDAL, D.; GONZALES-CANDELAS, L. Hypercelluloytic transformants of *Trichoderma longibrachiatum* are active in reducing *Pythium* damping-off on cucumber. In: DANIELS, M.J., ed. **Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. v.3

MILLER, G. L. Use of dinitrosalycilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.

MOLANO, J.; DURAM, A.; CABIB, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. **Analytical Biochemistry**, v.83, p.648-656, 1977.

NEVALAINEN, K. M. H.; PENTILLA, M. J.; TEEREI, T. T.; KNOWLES J. The molecular biology of *Trichoderma* and its application to the expression of both homologous and heterologous genes. In: LEONG, S.A.; BERKA, R.M., ed. **Molecular industrial mycology:** system and application for filamentous fungi. New York: Marcel Dekker, 1990. p.129-149.

NEVALAINEN, H.; PENTTILä, M. Molecular biology of cellulolytic fungi. In: KUCK, U., ed. **The Mycota II**: genetics and biotechnology. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.303-319.

NORONHA E. F.; ULHOA C. J. Purification and characterization of an endo-b-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.1039-1044, 1996.

NORTH, J. N. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. **Microbiological Reviews**, v.46, p.308-331, 1982.

NOVAES-LEDIEU, M.; JIMENEZ-MARTINEZ, A.; VILLANUEVA, J. R. Chemical composition of hyphal wall of *Phycomycetes*. **Journal of General Microbiology**, v.47, p.237-245, 1967.

PEBERDY, J. F. Fungal cell walls - A review. In: KUHN, P.J.; TRINCI, A. P. J.; JUNG, M.J.; GOOSEY, M. W.; COPPING, L. G., ed. **Biochemistry of cell walls and membranes in fungi.** Berlin: Spring-Verlag, 1990. p.5-29.

PENTTILä, M.; LEHTOVAARA, P.; Nevalainen, H.; Bhikhabhai, R.; Knowles, J. Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene. **Gene.** Amsterdam, v.45, p.253-263, 1986.

PETERBAUER, C.K.; LORITO, M.; HAYES, C.K.; HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. Molecular cloning and expression of the *nag*1 gene (N-acetyl-b-D-glucosaminidase-encoding gene) from *Trichoderma harzianum* P1. **Current Genetics**, v.30, p.325-331, 1996.

PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; MCDOUGALL, B. M. Non-cellulolytic fungal b-glucanases: their physiology and regulation. **Enzyme Microbial Technology**, v.15, p.178-192, 1993.

PRADE, R. A. Xylanase: from biology to biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engeneering Review**, v.13, p.101-131, 1996.

PROKOP, A.; RAPP, P.; WAGNER, F. Production, purification, and characterization of an extracellular endo-b-1,3-glucanase from monocaryon of *Schizophyllum commune* ATCC 38548 defective in exo-b-1,3-glucanase formation. **Canadian Journal of Microbiology**, v.40, p.18-23, 1993.

RAWLINGS, N. D.; BARRET, A. J. Evolutionary families of peptidases. **Biochemical Journal**, v.290, p.205-218, 1993.

REICHARD, U. The significance of secretrory and structure-associated proteases of *Aspegillus fumigatus* for the pathogenesis of invasive aspergillosis. **Mycoses**, v.41, p.78-82, 1998.

REISSIG, J. L.; STROMINGER, J. L.; LELOIR, L.; F. A modified colorimetric method for the determination of N-acetylamino sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v.217, p.959-966, 1955.

RICARD, J. L.; RICARD, T. J. The ethics of biofungicides - A case study: *Trichoderma harzianum* ATCC 20 476 on Elsanta strawberries against *Botriytis cinerea* (gray mold). **Agriculture and Human Values**, v.14, p. 251-258, 1997.

RIDGWAY, R. L. **Biological pest control.** Yearbook of Science and the Future. [S.l.]: Encyclopaedia Britannica, Inc., 1981. p.92-105.

RUIZ-HERRERA, J. **Fungal cell wall**: structure, synthesis, and assembly. Boca Raton: CRC Press, 1992.

SAHAI, A.; MANOCHA, M. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews**, v.11, p.317-338, 1993.

SALOHEIMO, M.; LEHTOVAARA, P.; PENTTILÄ, M.; TEERI, T. T.; STAHLBERG, J.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G; CLAEYSSENS, M.; TOMME, P.; KNOWLES, J. EGIII, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both gene and enzyme. **Gene**, Amsterdam, v.63, p.11-21, 1988.

SALOHEIMO, M.; HENRISSAT, B.; HOLFFRÉM, A. M.; TELEMAN, O.; PENTTILÄ, M. A. novel, small endoglucanase gene, *egl5*, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast. **Molecular Microbiology**, v.13, p.219-228, 1994.

SALOHEIMO, M.; NAKARI-SETäLä, T.; TENKANE, M.; PENTTILÄ, M. CDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. **European Journal of Biochemistry**, v.249, p.584-591, 1997.

SANCHES-TORRES, P.; GONZALEZ, R.; PEREZ-GONZALEZ, J. A.; GONZALEZ-CANDELAS, L.; RAMON, D. Development of a transformation system for *Trichoderma longibrachiatum* and its use to construct multcopy transformants for *egl* 1 gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.41, p.440-446, 1994.

SANTOS, R. M. D. B. Hidrólise de queratina pelo fungo *Aspergillus fumigatus*: purificação e caracterização da proteinase queratinolítica com potencial biotecnológico. Brasília: Universidade de Brasília, 1996a. Tese de Doutorado.

SANTOS, R. M. D. B.; FIRMINO, A. P.; DE SÁ, C. M.; FELIX, C. R. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Current Microbiology**, v.33, p.364-370, 1996b.

SANTOS, T.; VILLANUEVA, J. R.; NOMBELA, C. Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* b-glucanases. **Journal of Bacteriology**, v.129, p.52-58, 1977.

SCHIRMBÖCK, M.; LORITO, M.; WANG, Y. L.; HAYES, C. K.; ARISAN-ATAC, I.; SCALA, F.; HARMAN, G.; KUBICEK, C. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.4364-4370, 1994.

SEGEL, I. H. **Enzyme kinetics** - Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. New York: John Wkiley, 1975.

SHAIKH, S.A.; Deshpande, M.V. Chitinolytic enzymes: their contribuition to basic and applied research. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.9, p.468-475, 1993.

SHAPIRA, R.; ORDENTLICH, A.; CHET I.; OPPENHEIM A. B. Control of plant diseases by chitinase expressed from cloned DNA In *Escherichia coli*. **Phytopathology**, v.79, p.1246-1249, 1989.

SIVAN, C. J.; CHET, I. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. **Journal of General Microbiology**, v.135, p. 675-682, 1989.

SHOEMAKER, S.; SCHWEICKART, V.; LADNEER, M.; GELFAND, D.; KWOK, S.; MYAMBO, K.; INNIS, M. Molecular cloning of exo-cellobioshydrolase derived from *Trichoderma reesei* strain L27, **Biotechnology**, v.1, p.691-695, 1983.

SITRIT, Y.; BARAK, Z.; KAPULNIK, Y.; OPPENHEIMER, A.; CHET, I. Expression of *Serratia marcesscens* chtinase gene in *Rhizobium meliloti* during symbiosis on alfafa roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p.293-298, 1993.

SIVAN, C. J.; CHET, I. Microbial control of plant diseases.- Biocontrol of plant pathogens. In: **Environmental microbiology**. New York: Wiley-Liss, 1992. p.335-354, 1992.

STERNBERG, D.; VIJAYKUMAR, P.; REESE, E. T. b-glucosidase: microbiology of production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. **Canadian Journal of Microbiology**, v.23, p.134-147, 1970.

STIRLING, J.; COOK, G.; POPE, A. Chitin and its degradation. In: BRITISH MYCOLOGICAL SOCIETY. **Fungal wall and hyphal growth**. [S.l.]: British Mycological Society, 1979. p.169-188.

SURARIT, R.; GOPAL P. K.; SHEPHERD, M. G. Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. **Journal of General Microbiology**, v.134, p.1723-1730, 1988.

SVENSSON, B. Structure function relationships in starch-hydrolases and related enzymes. **Denpun Kagaku**, v.38, p.125-133, 1991.

TANGARONE, B.; ROYER, J. C.; NAKAS, J. P. Purification and characterization of an endo-1,3-b-D-glucanase from *Trichoderma longibrachiatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.177-184, 1989.

TANNER, W. Synthesis and function of glycosylated proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. In: KUHN, P.J.; TRINCI, A.P.J.; JUNG, M.J.; GOOSEY, M.W.; COPPING, L.G., ed. **Biochemistry of cell walls and membranes in fungi**. New York, Springer-Verlag, 1990. p.109-118.

TEERI, T.; SALOVUORI, I.; KNOWLES, J. The molecular cloning of the major cellulase gene from *Trichoderma reesei*. **Biotecnology**, v.1, p.696-699, 1983.

TEERI, T.T.; LEHTOVAARA, P.; KAUPPINEN, S.; SALOVUORI, I.; KNOWLES, J. Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes: gene sequence and expression of cellobiohydrolase II. **Gene**, Amsterdam, v.51, p.43-52, 1987.

TIMMIS, K. N. Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. **Annual Review of Microbiology**, v.48, p.525-557, 1994.

TOMME, P.; WARREN, R.A.J.; GILKES, N.R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. **Advances in Microbiology and Physiology**, v.37, p.1-81, 1995.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using and oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **Journal of Clinical Pathology**, v.22, p.246, 1969.

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Purification and characterization of an extracellular chitobiase from *Trichoderma harzianum*. **Current Microbiology**, v.23, p.285-289, 1991a.

ULHOA, C. J. Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. **Journal of General Microbiology**, v.137, p.2163-2169, 1991b.

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. **Enzyme Microbial Technology**, v.14, p.236-240, 1992.

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Effect of carbon sources on chitobiase production by *Trichoderma harzianum*. **Mycological Research**, v.97, p.45-48, 1993.

VAN ARSDELL, J.N.; KWOK, S.; SCHWEICKART, V.L.; LADNER, M. B.; GELFAND, D. H.; INNIS, M. A. Cloning, characterization and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of endoglucanase I from *Trichoderma reesei*. **Biotechnology**, v.5, p.60-64, 1987.

VASQUEZ-GARCIDUENAS, S.; LEAL-MORALES, C. A.; HERRERA-ESTRELLA., A. Analysis of the b-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.1424-1446, 1988.

WARD, C.; WRIGHT, B. E. Cell wall synthesis in *Dictyostelium discoideum*. **Biochemistry**, v.4, p.2021-2027, 1965.

WARD, M.; WU, S.; DAUBERMAN, J.; WEISS, G.; LARENAS, E.; BOWER, B.; REY, M.; CLARKSON, K.; BOTT, R. Cloning, sequence and preliminary structural analysis of a small, high pI endoglucanase (EGIII) from *Trichoderma reesei*. In: SUOMINEN, P.; REINIKAINEN, T., ed. **Proceedings of the Second TRICEL Symposium on *Trichoderma reesei* Cellulases and other Hydrolases.** Helsinki: Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, 1993. p.153-158.

WARREN, R. A. J. Microbial hydrolysis of polysaccharides. **Annual Review of Microbiology**, v.50, p.183-212, 1996.

WEINDLING, R.; FAWCETT, W. S. Experiment in the control of *Rhizoctonia* damping-off of citrus seedling. **Hilgardia**, v.10, p.1-16, 1936.

XIMENES, F. A.; SILVEIRA, F. Q. P.; FILHO, E. X. Production of b-xylosidase activity by *Trichoderma harzianum* strains. **Current Microbiology**, v.33, p.71-77, 1996.

YABUKI, M.; MIZUSHIMA, K.; AMATATOU, T.; ANDO, A.; FUJI, I.; SHIMADA, M.; YAMASHIDA, M. Purification and characterization of chitinase and a chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* subsp *anaerogenes* A52. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.32, p.25-32 , 1986.

YODER, O. C. Toxins in pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v.18, p.103-129, 1980.

ZANUNCIO, J. C.; ALVES, J. B.; ZANUNCIO, T. V.; GARCIA, J. F. Hemipterous predators of eucalypt defoliator caterpillars. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4., 1994, Gramado, RS. **Anais**. Pelotas: EMBRAPA-CPACT, 1994. p.224.

9

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA SISTÊMICA MEDIADA POR RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

Rosa de Lima Ramos Mariano
Reginaldo da Silva Romeiro

INTRODUÇÃO

Ao se aproximar o Terceiro Milênio, é necessário investigar, com seriedade e persistência, métodos alternativos para o controle de enfermidades de plantas que sejam, ao mesmo tempo, eficientes e menos agressivos à saúde humana e ao equilíbrio de ecossistemas. Encontrar uma forma, a mais inócua possível, de ativar os mecanismos de defesa da planta deixando que ela própria se proteja contra patógenos, ao invés de saturá-la e intoxicá-la com defensivos, por certo será a estratégia politicamente correta do futuro.

Qualquer solo abriga uma heterogênea e diversificada comunidade biológica, da qual microrganismos, quer eucariotas quer procariotas, constituem maioria, tanto em número quanto em multiplicidade. Muitos procariotas elegem como nichos ecológicos preferenciais a rizosfera e/ou o rizoplano de plantas, onde se multiplicam e sobrevivem ativamente, resistindo à pressão antagonística do restante da microflora do solo. Esses organismos têm sido genericamente denominados rizobactérias (Binder et al.,1989; Kloepper et al.,1992; Neuenschwander et al.,1995; Uknes et al., 1995). Interagindo com a planta, rizobactérias podem ter efeito deletério, nulo ou benéfico (Kloepper et al., 1992; Kloepper, 1996). Aquelas que exercem efeito benéfico - promoção de crescimento e controle biológico de enfermidades - são chamadas PGPRs

(Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas), correspondente à sigla PGPRs (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria).

As PGPRs têm sido usadas, inclusive comercialmente, para aumentar a produtividade de culturas e para o controle biológico específico de certas enfermidades de plantas (Leeman et al., 1995; Liu et al., 1995c; Kloepper, 1996; Moura et al., 1996; Kloepper et al., 1997).

Resistência sistêmica induzida (ISR) como mecanismo de controle

Pesquisas realizadas para o entendimento dos mecanismos através dos quais PGPRs promovem crescimento de plantas mostram a produção de reguladores de crescimento (auxinas, giberelinas, citocininas e etileno), aumento da fixação de nitrogênio e disponibilidade de nitrato, solubilização de fósforo e oxidação de enxofre, bem como aumento de permeabilidade das raízes, estimulando a absorção de nutrientes (Enebak et al., 1998). Para o biocontrole de doenças, essas bactérias produzem metabólitos que agem diretamente sobre o patógeno tais como antibióticos, enzimas que degradam a parede celular, sideróforos e ácido cianídrico (Enebak et al., 1998; Kloepper et al., 1999). Todavia, há casos em que a separação espacial entre antagonista e patógeno indica a ocorrência de um outro mecanismo chamado resistência sistêmica induzida (ISR). A ISR clássica ou resistência sistêmica adquirida (SAR) é definida como a ativação das defesas químicas e físicas da planta hospedeira por um agente indutor que pode ser uma substância química ou microrganismo, o que leva ao controle de vários patógenos (Kloepper et al., 1992; Kloepper et al., 1997). O agente indutor pode ser um ativador químico como os derivados benzotiadiazólicos e outros compostos (Friedrich et al., 1996; Lawton et al., 1996; Kunz et al., 1997; Shah et al., 1997; Benhamou & Belanger, 1998), extratos de células de microrganismos (Leeman et al., 1995; Romeiro & Kimura, 1997) ou microrganismos vivos (Liu et al., 1995a; Liu et al., 1995b; Liu et al., 1995c; Hoffland et al., 1996). Neste último caso, quase sempre, os agentes são PGPRs (Alström, 1991; Kloepper et al., 1992; Kloepper et al., 1997) e diz-se que o mecanismo é a ISR mediada por PGPRs.

A ISR mediada pelas PGPRs é uma alternativa ao uso de indutores químicos e de patógenos que faz parte da estratégia da ISR clássica ou SAR.

Em 1991 a indução de ISR por PGPRs foi demonstrada por três grupos de pesquisadores em diferentes sistemas patógeno-hospedeiro. Aplicações de *Pseudomonas fluorescens* isolado WCS417 em cubos de lã de rocha resultaram no controle da murcha de *Fusarium* do cravo (*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*). O patógeno foi espacialmente separado das PGPRs pela inoculação em caule uma semana após a aplicação da *Pseudomonas*, e a separação foi confirmada pelo não isolamento de WCS417 dos caules (van Peer et al., 1991). O tratamento de sementes de feijoeiro com *P. fluorescens* isolado S97 reduziu o número de lesões foliares causado por subseqüentes inoculações com *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, agente do crestamento do halo do feijoeiro (Alström, 1991). Em pepino, 94 isolados conhecidos de PGPRs foram testados para o controle da antracnose causada por *Colletotrichum orbiculare*. Seis isolados foram consistentes em reduzir significativamente o diâmetro e o número das lesões quando o patógeno foi aplicado 21 dias após o plantio (Wei et al., 1991). Num estudo subseqüente com seis PGPRs indutoras (Kloepper, 1993) nenhuma pôde ser recuperada dos pecíolos das folhas, confirmando a separação espacial entre patógeno e PGPRs.

Nos estudos dos mecanismos de ação de PGPRs e outros microrganismos biocontroladores, a ISR só pode ser comprovada quando for caracterizada a separação espacial entre patógeno e agentes de biocontrole (Liu et al., 1995b). Além da separação espacial, deve-se preferir a inoculação do patógeno de modo natural (por exemplo em raízes para controle de patógenos habitantes do solo), o que implicará num melhor resultado quando o agente indutor for aplicado no controle biológico prático. Um dos sistemas mais utilizados que permite essa separação espacial, no caso de patógenos radiculares, é o "split-root" com vários modelos: cubos de lã de rocha para rabanete (Leeman et al., 1995), corte do sistema radicular e posicionamento em vasos plásticos diferentes (Liu et al.,1995b; Koike et al.,1997) e sistema de três vasos plásticos (Hoffmann-Hergarten et al., 1997; Martinez-Ochoa et al., 1997). A eficiência da separação espacial deve ser sempre monitorada para verificar se não houve movimentação de PGPRs para os tecidos não tratados, o que pode ser feito através de isolamentos ou utilizando-se um gene marcador para bioluminescência (Liu et al., 1995b).

Em Auburn, foi demonstrado que a ISR mediada pelas PGPRs foi tão efetiva quanto a SAR contra múltiplos patógenos. *Pseudomonas putida* 89B-27 e *Serratia marcescens* 90-166, os quais induziam resistência sistêmica em pepino ao CMV (Raupach et al.,1996) e à antracnose (*C. orbiculare*) (Wei et al., 1991), também induziram resistência à murcha de *Fusarium* (*F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum*), quando aplicados como tratamento de raízes (Liu et al.,1995b) e à mancha angular, reduzindo número, tamanho de lesões e a população de *P. syringae* pv. *lachrymans* nas folhas inoculadas (Liu et al., 1995a). Uma vez que a SAR envolvendo a aplicação de patógenos no campo pode ser perigosa, a utilização de PGPRs não-patogênicas indutoras de resistência sistêmica, torna-se uma alternativa atraente a ser considerada em programas de manejo integrado para uma agricultura sustentável.

Embora a ISR mediada pelas PGPRs seja uma alternativa para o manejo integrado de doenças, ela atualmente tem papel secundário no controle biológico prático. Isto porque existem poucos estudos de campo para determinar sua eficácia e estabilidade, sob um potencial múltiplo de inóculo natural, com ou sem o uso de produtos químicos. Raupach & Kloepper (1998) demonstraram que a ISR mediada por *Bacillus pumilus* INR7, *Curtobacterium flaccumfaciens* ME1 e *B. subtilis* GBO3 pode substituir o controle químico na produção de pepino no campo, controlando a antracnose, mancha angular e murcha bacteriana (*Erwinia tracheiphila*), isoladamente ou em conjunto, com inóculo natural ou artificial de alta pressão. Houve uma tendência para um controle maior quando misturas de PGPRs foram utilizadas, principalmente em infecções múltiplas, o que pode ser explicado pelos prováveis diferentes modos de ação dos isolados, levando ao sinergismo. Misturas de PGPRs também foram utilizadas para promoção de crescimento e controle do mal-do-pé do trigo (Pierson & Weller, 1994). No entanto, tem sido recomendado como essencial que as interações microbianas entre os biocontroladores sejam investigadas, no sentido de entender e predizer a atuação desses microrganismos e suas combinações (De Boer et al., 1998; Raupach & Kloepper, 1998). De certa forma, a qualidade de multiplicidade da resistência induzida mediada por PGPRs é um fator favorável à sua inclusão entre os produtos biológicos do futuro, pois segundo Fravel (1999), enquanto a especificidade pode ser vantajosa do ponto de vista de evitar efeitos adversos em outros organismos

vivos, é considerada uma desvantagem pela indústria, pois mercados específicos geram menos lucros que mercados amplos.

A ISR mediada por PGPRs influencia também os vetores de patógenos. Pesquisa na Universidade de Auburn demonstrou que esse tipo de ISR contra a murcha bacteriana das cucurbitáceas (*E. tracheiphila*) também foi eficiente em reduzir a alimentação dos vetores do patógeno, os besouros *Diabrotica undecimpunctata howardi* e *Acalymma vittatum*, reduzindo a incidência da murcha comparada a plantas-controle não tratadas e plantas pulverizadas semanalmente com o inseticida esfenvalerato (Zehnder et al., 1997). Sabendo-se que o hábito alimentar desses besouros é fortemente influenciado pela presença de cucurbitacina, um grupo de metabólitos de plantas triterpenoides que ocorre em cucurbitáceas, foi aventado que a redução na alimentação dos vetores havia sido causada pela redução nos teores desta substância, o que foi comprovado por análise em HPLC. Sugeriu-se, portanto, que o mecanismo de ISR mediado por PGPRs, reduzindo a alimentação dos besouros em pepino, envolve uma mudança no modelo metabólico de síntese de cucurbitacina (Kloepper et al., 1999)

Também, Yao et al. (1997) demonstraram que a ISR mediada por PGPRs (*B. pumilus* SE34, *Bacillus amiloliquefaciens* IN937a, *B. subtilis* IN937b e *Kluyvera cryocrescens* IN114) contra o CMV em tomate foi eficiente em campo. Em dois experimentos consecutivos houve redução do desenvolvimento dos sintomas, da porcentagem de infecção e do acúmulo de vírus nas plantas. No primeiro experimento todos os quatro tratamentos aumentaram a altura das plantas e produção, o que não ocorreu no segundo. Portanto, mais experimentos em diferentes condições de campo são ainda necessários para verificar a estabilidade do controle através da ISR mediada por PGPRs em tomate. Aliás, isto é verdadeiro não apenas para este tipo de controle biológico, mas para o biocontrole de doenças de maneira geral, uma vez que o tamanho do mercado, inconsistência e métodos necessários para produção, formulação e distribuição fazem as indústrias relutantes em apoiar a pesquisa com biocontrole de doenças (Fravel, 1999).

A ISR mediada por PGPRs como mecanismo de controle para nematóides parasitas de plantas não tem sido estudada extensivamente. Martinez-Ochoa et al. (1997) realizaram um estudo em casa de vegetação com tomate e pepino, concluindo

que o biocontrole de *M. incognita* usando PGPRs com atividade ISR não estava associado a um único mecanismo, pois houve ausência de um único perfil fenotípico para todos os isolados de PGPRs biocontroladores. Por outro lado, *Agrobacterium radiobacter* G12 e *Bacillus sphaericus* B43 reduziram significativamente (66%) a taxa de penetração de *Globodera palida* em batata, tendo sido comprovado, através de experimentos 'split-root', que o mecanismo envolvido era a ISR (Hoffmann-Hergarten et al., 1997). Não houve efeito negativo na capacidade reprodutiva das fêmeas nem na razão sexual macho-fêmea, indicando que a ISR age nos estágios iniciais da interação patógeno-hospedeiro. Tanto as células bacterianas mortas pelo calor quanto as células vivas apresentaram o mesmo grau de controle sugerindo que estruturas superficiais termoestáveis ou metabólitos bacterianos pré-formados eram os agentes indutores de ISR (Hoffmann-Hergarten et al., 1997).

A busca por rizobactérias com atividade de indução de resistência sistêmica a enfermidades de plantas tem sido uma das linhas básicas de pesquisa do Setor de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Embora muitos resultados ainda se revistam de caráter preliminar, há muitos projetos em andamento.

Romeiro et al. (1997) isolaram, de rizosfera e de rizoplano de plantas sadias de tomateiro, rizobactérias que não exerciam atividade *in vitro* contra *P. syringae* pv. *tomato*. Algumas delas, quando utilizadas na microbiolização, por embebição, de sementes sadias do hospedeiro, aparentemente induziram resistência a *P. syringae* pv. *tomato* em plantas originadas dessas sementes (Figura 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Bentes et al. (1998) ao testarem rizobactérias para o biocontrole de doenças bacterianas da parte aérea de tomateiro (Figura 2) e por Romeiro et al. (1997) com actinomicetos previamente selecionados para o biocontrole de *R. solanacearum* em tomateiro e capazes de induzir resistência em filoplano de tomateiro à mancha bacteriana pequena incitada por *P. syringae* pv. *tomato* (Figura 3). Considerada a separação espacial entre os componentes da interação microbiana, posto que as rizobactérias foram posicionadas no sistema radicular e os patógenos desafiantes inoculados na parte aérea, os autores hipotetizaram haver ocorrido indução de resistência, provavelmente desencadeada pela colonização das raízes pelas rizobactérias.

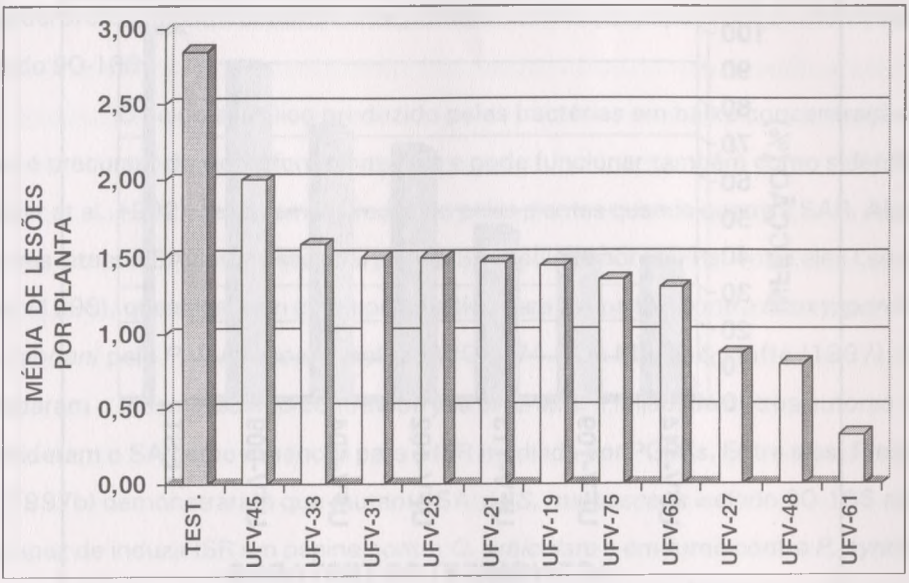


FIGURA 1. Indução de resistência sistêmica em plantas de tomateiro oriundas de sementes microbiolizadas com rizobactérias previamente selecionadas a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Adaptado de Romeiro et al., 1997.

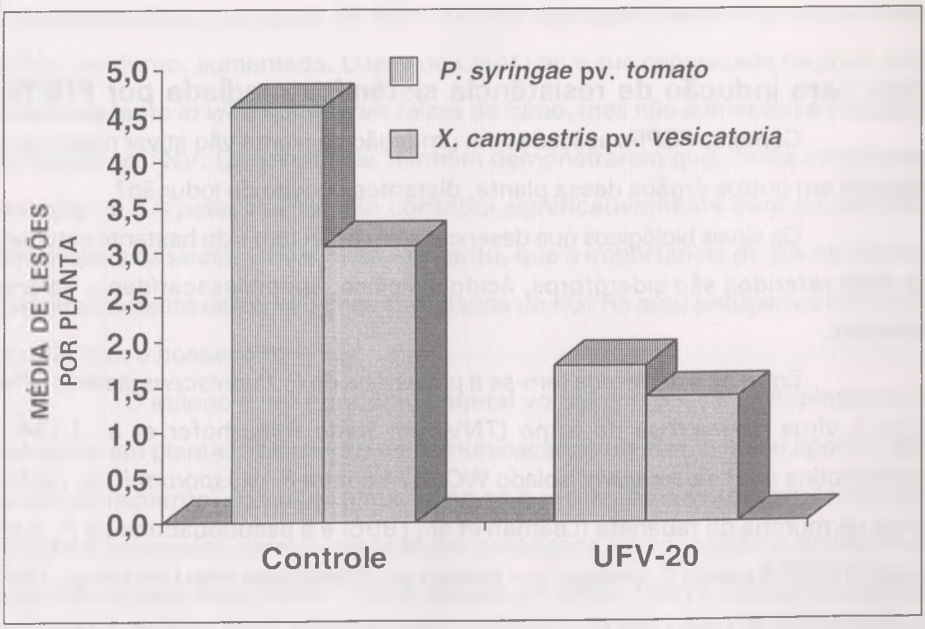


FIGURA 2. Evidência de indução de resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em plantas de tomateiro pela microbiolização de sementes com rizobactéria pré-selecionada. Adaptado de Bentes et al., 1998.

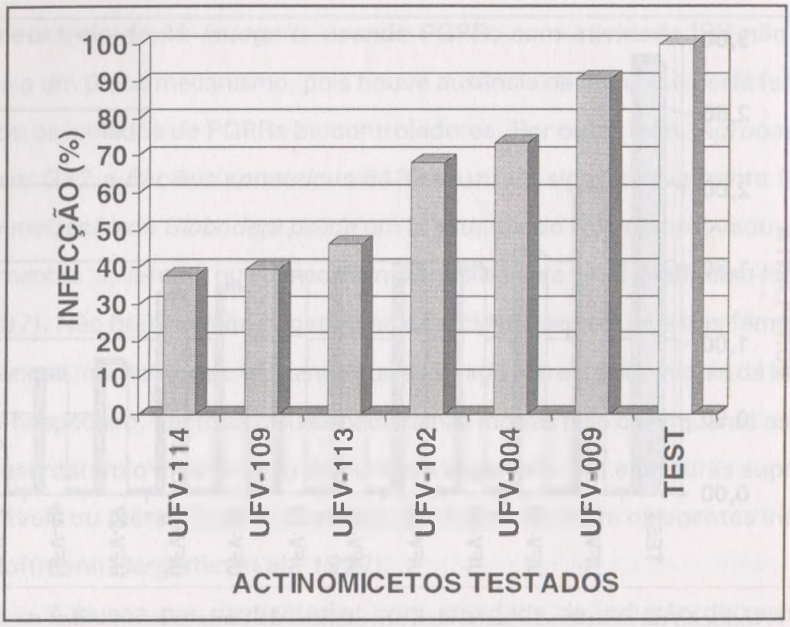


FIGURA 3. Indução de resistência sistêmica a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em plântulas de tomateiro pela microbiolização de sementes com propágulos de actinomicetos. Adaptado de Romeiro et al.,1997.

Sinais para indução de resistência sistêmica mediada por PGPRs

Como as PGPRs aplicadas em um órgão da planta vão ativar mecanismos de defesa em outros órgãos dessa planta, distantes do sítio de indução?

Os sinais biológicos que desencadeiam a ISR têm sido bastante estudados e os mais referidos são sideróforos, ácido salicílico, lipopolissacarídeos, etileno e jasminatos.

Entre os sideróforos tem-se a pioverdina de *P. fluorescens* isolado CHAO contra o vírus da necrose do fumo (TNV) em fumo (Maurhofer et al.,1994); a pseudobactina de *P. fluorescens* isolado WCS374 contra *F. oxysporum* f. sp. *raphani*, agente da murcha do rabanete (Leeman et al.,1996) e a pseudobactina de *P. putida* isolado WCS358 contra *P. syringae* pv. *tomato* em *Arabidopsis* (van Loon et al.,1997). Em *Arabidopsis* um novo tipo de sideróforo, fluorobactina, pode explicar a indução de resistência associada ao ácido salicílico (SA) em rabanete (van Loon et al., 1998). No entanto, Press et al. (1977a; 1997b) observaram após diversos estudos que a produção

de sideróforos não era determinante primário de ISR em pepino por *S. marcescens* isolado 90-166.

O ácido salicílico produzido pelas bactérias em baixa concentração de ferro é precursor do sideróforo pioquelina e pode funcionar também como sideróforo (Meyer et al.,1992), sendo ainda produzido pelas plantas quando ocorre a SAR. Alguns autores citam o SA como essencial para a ISR mediada por PGPRs, entre eles Leeman et al. (1996), que sugeriram um papel positivo para SA na ISR contra *F. oxysporum* f. sp. *raphani* pela *P. fluorescens* isolado WCS374 e De Meyer & Höfte (1997), que estudaram o mesmo isolado contra *Botrytis cinerea* em feijão. Já outros autores não consideram o SA como essencial para a ISR mediada por PGPRs. Entre eles, Press et al. (1997b) demonstraram que mutante SA^- de *S. marcescens* isolado 90-166 ainda foi capaz de induzir ISR em pepino contra *C. orbiculare* e em fumo contra *P. syringae* pv. *tabaci*. Utilizando um método diferente, Maurhofer *et al.*, (1998) introduziram os genes pchBA (que codificam para produção de SA em *P. aeruginosa*) em *P. fluorescens* P3, um isolado naturalmente SA^- e em *P. fluorescens* isolado CHAO, SA^+. O isolado P3 tornou-se capaz de produzir SA *in vitro* e teve sua capacidade de induzir resistência ao TNV, em fumo, aumentada. O isolado CHAO teve sua capacidade de produzir SA aumentada tanto *in vitro* quanto nas raízes de fumo, mas não aumentou a indução de resistência ao TNV. Os resultados também demonstraram que, nesta solanácea, a produção de SA pelas PGPRs não contribui significativamente para o controle de *Thielaviopsis basicola*. Observa-se, portanto, que a importância da SA na ISR varia consideravelmente de acordo com os isolados de PGPRs e/ou patógenos envolvidos e, ainda, com o hospedeiro.

O etileno é um hormônio vegetal volátil que possui múltiplas funções fisiológicas em plantas, inclusive o de comunicação entre elas, o que o aponta, ainda que potencialmente, como um sinal. Sabe-se que plantas o sintetizam tanto como resposta a ferimentos como à infecção por patógenos e à exposição a eliciadores de mecanismos de defesa (Boller, 1990; Grosskopf et al., 1991). Conforme relato de Abeles (1971) e Boller (1990), exposição de plantas a etileno induz mecanismos de defesa associados a SAR/ISR como síntese de PRPs e lignificação.

Ácido jasmínico, jasminatos e seus derivados encontram-se largamente

distribuídos em tecidos de plantas (Stumpf & Conn, 1981) e participam em múltiplos processos anatomo-fisiológicos em vegetais, como alongamento de raízes, abertura de estômatos, processo geral de senescência, dentre outros (Koda, 1992). Sticher et al. (1997) consideram ainda um pouco controvertidas as evidências experimentais de que JA e seus derivados podem se constituir em sinais bioquímicos de resistência induzida. Entretanto, a freqüência com que eles ocorrem em tecidos vegetais, aliada à sua conhecida mobilidade nos tecidos e entre plantas (análogos voláteis) podem apontar na direção de uma função sinalizadora (Farmer & Ryan, 1990).

Gundlach et al. (1992) pressupõem que JA seja um sinal de resistência sistêmica por associá-lo à ativação de genes correspondentes em plantas. Também Sticher et al. (1997), mesmo colocando em dúvida a real função de JA e seus análogos como sinais de SAR/ISR, lembram que eles devem ter algum envolvimento com a resistência sistêmica, já que sua aplicação em plantas induz a síntese de eventos tipicamente associados à fenomenologia de SAR, como síntese de osmotina (um dos tipos de PRP), de sintetase chalcônica, de PAL e de LOX. Em resumo, se sua participação em SAR/ISR parece evidente, sua função como sinal ainda não é muito clara.

Cohen et al. (1993) relatam haver conseguido induzir resistência local e sistêmica em tomateiro e em batata a *Phytophthora infestans* pela aplicação exógena de JA, o que permite caracterizá-lo como um possível agente de SAR, pelo menos nesse caso. Trabalhando com o patossistema cevada-*Magnaporthe grisea*, Schweizer et al. (1993) demonstraram que tanto inoculações com o patógeno como exposição a INA (um ativador químico de resistência induzida) ocasionam uma elevação de teores de JA nos tecidos.

De acordo com van Loon et al. (1998) e Pieterse et al. (1999) em contraste com a SAR induzida por patógenos, a ISR mediada por PGPRs nem sempre requer SA. A SAR associada à produção de SA induz a formação de proteínas PR, mas este fato não foi observado em rabanete e *Arabidopsis* expressando ISR. Além disso, em plantas de *Arabidopsis* transformadas com o gene *nahG* e, portanto, incapazes de acumular SA, a ISR foi totalmente expressa. Em contraste, *Arabidopsis* com mutações no gene *etr1*, insensíveis ao etileno, ou no gene *jar1*, insensíveis ao ácido

jasmônico, deixaram de expressar ISR. Isto sugere que PGPRs induzindo ISR seguem um modelo diferente de transmissão de sinais, que indepedende da acumulação de SA e ativação de genes PR, mas depende da percepção de etileno e ácido jasmônico.

Diversos experimentos têm demonstrado que parte da LPS (lipopolissacarídeo da membrana externa de bactérias Gram negativas) de PGPRs é capaz de induzir resistência sistêmica. Van Peer & Schippers (1992) utilizaram células inativadas pelo calor ou preparações purificadas da LPS de *P. fluorescens* WCS417r contra a murcha de *Fusarium* do cravo, e verificaram que elas foram capazes de elicitar ISR similarmente a células vivas da bactéria. Também a LPS de *P. putida* isolado WCS358 foi considerada capaz de induzir ISR em *Arabidopsis*, embora, neste caso, houvesse também o envolvimento de sideróforos (van Loon et al., 1997). Segundo Leeman et al. (1995), a LPS purificada de *P. fluorescens* isolados WCS374 e WCS417, biocontroladores da murcha de *Fusarium* do rabanete, foi capaz de causar ISR, embora a LPS purificada de WCS358 não tenha induzido este efeito, sugerindo especificidade de isolado. Também mutantes dos dois primeiros isolados, resistentes a fagos, sem a cadeia lateral antigênica O (OA⁻) e com capacidade de colonização semelhante aos selvagens, não induziram resistência. Além disso, nem esses mutantes, nem suas paredes celulares não purificadas, nem os complexos lipídio A-cerne interno foram capazes de causar ISR (Leeman et al., 1995), sugerindo que a cadeia lateral antigênica O é a parte da LPS responsável pela ISR. De acordo com Press & Kloepper (1997) a LPS e membrana citoplasmática de *P. fluorescens* 89B-61, mas não de *S. marcescens* 90-166 induziram ISR em pepino a *C. orbiculare*, reduzindo a severidade da antracnose em relação ao controle. Esta diferença é interessante, pois sugere especificidade de isolados, como já citado por Leeman et al. (1995). Segundo van Loon et al. (1998), na ISR mediada por *Pseudomonas* spp. em cravo, rabanete e *Arabidopsis*, a cadeia lateral antigênica O da LPS age como indutora de resistência, mas outros fatores podem estar envolvidos.

Mecanismos de ISR ativados pelas PGPRs

Dentre os mecanismos ativados pelas PGPRs na ISR são citados a produção de PR-proteínas, o acúmulo de lignina, calose, compostos fenólicos e

fitoalexinas.

As Proteínas Relacionadas com Patogênese (PRPs) começaram a ser investigadas no início da década de 70, por van Loon & van Kammen (1970) como macromoléculas envolvidas em resistência induzida, tendo fumo-TMV como patossistema modelo. Hoje tem-se conhecimento que PRPs são produzidas por muitas plantas como resposta a infecção por patógenos (Sticher et al., 1997) e participam ativamente no fenômeno de resistência induzida, tanto quando a indução é por fatores bióticos (Bol et al., 1990) como quando ocorre por abióticos (Shah et al., 1997) Usualmente elas se acumulam em plantas como resposta à infecção e como resposta à indução de resistência. Como se demonstrou estarem as PRPs estreitamente relacionadas com o fenômeno de SAR, às vezes são denominadas de SAR-proteínas e os genes que codificam para as proteínas envolvidas em sua síntese, de SAR-genes (Sticher et al., 1997). van Loon et al. (1994) propuseram uma nomenclatura para as PRPs, classificando-as em 11 "famílias". As mais comumente investigadas são PR-1, PR-2 (β-1,3-glucanases), PR-3 (Quitinases) e PR-5 (Osmotina). As PRPs acumulam-se em locais de infecção e em sítios remotos destes, em casos de indução de resistência sistêmica (Sticher et al., 1997). Sua síntese e acúmulo possuem, pois, caráter de resposta ativa e de sistemicidade, em casos de resistência induzida (van Loon, 1983; Bol et al., 1990; Uknes et al., 1992; Lawrence et al., 1996; van Loon, 1997).

Após a indução de resistência, o modo exato como as PRPs atuam ainda é objeto de investigação (Sticher et al., 1997). Sabe-se que, dependendo da planta e do agente de indução, elas se acumulam tanto nos espaços intercelulares (quando teriam uma ação direta sobre o patógeno) como em vacúolos (quando teriam ação após eventos de patogênese que culminam com a descompartimentalização). Geralmente as PRPs possuem potente atividade antimicrobiana *in vitro* (Enkerli et al., 1993; Ponstein et al., 1994; Niderman *et al.*, 1995; Penninckx et al.,1996; Hu et al., 1997; Sticher et al., 1997), e é de se presumir que a possuam também *in vivo* (van Loon, 1983; Herbers et al., 1995; Kloepper, 1996). As PRPs podem também ocasionar a liberação de eliciadores de fitoalexinas (Kuc, 1985; Bol et al., 1990; Neuenschwander et al., 1995) como também induzir a síntese de compostos fenólicos (Keen & Yoshikawa, 1983; Kurosaki et al., 1986).

A proteína PR-1a tem função ainda desconhecida, sendo fortemente induzida durante o estabelecimento de SAR em fumo. Park et al. (1997) estudaram o potencial de indução do promotor de PR-1a ligado ao gene repórter GUS em plantas transgênicas de fumo. Todos os isolados de PGPRs testados, anteriormente conhecidos como indutores de resistência sistêmica em pepino, ativaram o promotor de PR-1a em fumo, embora com diferentes modelos de expressão, sendo que alguns em nível similar ao do indutor SA, utilizado como controle positivo. Como a expressão de PR-1a está estreitamente correlacionada a SAR, estes resultados sugerem que o caminho seguido pelas PGPRs na ISR pode ser similar ao da SAR. Maurhofer et al. (1994) também relataram que proteínas PR acumularam-se em fumo, apresentando ISR produzida por *P. fluorescens* isolado CHAO contra TNV. Já outros autores relataram que a ISR mediada por PGPRs em rabanete (Hoffland et al., 1995), fumo (Chen et al.,1996a), *Arabidopsis* (Pieterse et al., 1996) e pepino (Jetiyanon et al.,1997) não está correlacionada com a expressão de genes PR.

Segundo Pieterse & van Loon (1999), o que acontece pode ser explicado se a indução de resistência for esquematizada como tendo três causas principais: (1) rizobactérias não-patogênicas; (2) infecção por patógenos (2a) que causam necrose, (2b) que induzem a ativação do gene *PDF1.2* (gene da planta para substâncias de defesa) e (3) ferimentos.

A ISR mediada por PGPRs (1) é SA independente, está associada a um aumento de sensibilidade a JA e/ou Etileno, mais do que um aumento na produção desses compostos, é dependente do fator regulador NPR1 e forma compostos de defesa ainda desconhecidos. A SAR induzida pela infecção por patógenos necrotróficos (2a) pode, predominantemente, (i) implicar produção de SA, não envolver JA ou Etileno, dependendo de NPR1 e resultando em PRPs induzidas por SA ou (ii) ser SA independente, implicar produção de JA + Etileno, não dependendo de NRP1 e originando PRPs, similarmente à reação induzida por patógenos não necrotróficos (2b). Neste caso pode haver ainda a produção de defensinas. Dependendo do patógeno invasor, a composição dos compostos de defesa produzidos após a infecção pode variar entre predominantemente SA induzíveis e JA ou Etileno induzíveis. Neste aspecto, JA e Etileno têm efeito positivo na ação de AS, enquanto este parece ter efeito negativo

nas defesas induzidas por JA e Etileno. Os ferimentos (3) também resultam na ativação de defesas induzidas por JA e Etileno. No entanto, a composição destas substâncias (PRPs não induzidas por SA, defensinas, tioninas e inibidores de proteinases) é diferente daquelas produzidas na infecção por patógenos. Isto provavelmente acontece porque JA e Etileno são sinais dominantes no ferimento enquanto os níveis de SA não aumentam (Pieterse & van Loon, 1999).

O fenômeno de lignificação é uma resposta ativa de plantas a invasão por patógenos (Hammerschmidt & Kuc, 1982; Busam et al., 1997b; Sticher et al., 1997) e acumulam-se evidências de que constitui importante mecanismo de defesa (Vance et al., 1980; Hammerschmidt & Kuc, 1982; Agrios, 1997; Busam et al., 1997a; Sticher et al., 1997). Friend (1985), assim como Busam et al. (1997a) e Sticher et al. (1997) considerou que lignificação é uma das características de resistência induzida.

Resumidamente, ligninas são biopolímeros complexos, que têm sua origem na rota fenilpropanóide, pela polimerização desidrogenativa de precursores (Stumpf & Conn, 1981). Em lignificação, fenil-alanina-amônea-liase (PAL) é uma enzima importante, já que ela promove a desaminação da fenil-alanina originando ácido cinâmico e de outros precursores e compostos intermediários na síntese de lignina (Vance et al., 1980). Tanto assim que, segundo Carver et al. (1994) e Mauch-Mani & Slusarenko (1996), inibidores específicos de PAL reduzem a resistência de plantas a doenças, talvez pelo impedimento da síntese dos derivados fenilpropanóides necessários à formação de lignina.

Embora se saiba que a síntese de lignina é uma resposta de resistência da planta, que essa síntese pode ser induzida por agentes bióticos e abióticos, possui caráter de sistemicidade e está intrinsicamente associada a resistência induzida, o modo como a lignina protege plantas contra patógenos ainda é assunto pouco investigado.

Sabe-se que a lignificação torna a parede celular da planta resistente ao ataque de enzimas hidrolíticas, reduz a difusão de toxinas do patógeno e impede a utilização de nutrientes do hospedeiro, reduzindo o avanço e crescimento do patógeno (Pascholati & Leite, 1994). Anderson e Guerra (1985) sugeriram que *P. putida* poderia

proteger feijão contra a podridão de raízes causada por *Fusarium solani* em estágios iniciais de desenvolvimento da doença, alterando a resistência do hospedeiro pelo aumento de lignina nos tecidos da raiz. Jetiyanon et al. (1997) relataram que *B. pumilus* isolado SE49, sabidamente indutor de ISR contra *C. orbiculare* e também de hipersensibilidade, aumentou rapidamente a lignificação e a atividade total de peroxidase e superóxido dismutase. Wei et al. (1991) também observaram estímulo de atividade de peroxidase. Já Benhamou et al. (1997) demonstraram que células bacterizadas com PGPRs apresentavam modificações físicas e bioquímicas apenas quando em contato com o patógeno. Estas modificações caracterizaram-se pela preservação da parede celular e aposições de calose nos locais de pressão de penetração dos fungos patógenos, além de presença de compostos fenólicos em células vizinhas e envolvendo as células fúngicas.

A síntese e acúmulo de fitoalexinas em plantas de cravo bacterizadas com *Pseudomonas* sp. e exibindo ISR contra a murcha de *Fusarium* foi registrada ainda em 1991. As fitoalexinas só foram detectadas em plantas bacterizadas e inoculadas com o patógeno (van Peer et al., 1991).

Conclusões

Lyon et al. (1996) postulam que o controle de enfermidades de plantas, tenham elas etiologia fúngica, bacteriana ou virótica, pode ser conseguido pelo estímulo apropriado de mecanismos de resistência de plantas a enfermidades, sejam esses mecanismos bióticos (PGPRs, por exemplo) sejam abióticos. No entender do autor, estratégias de indução de resistência em plantas a doenças serão componentes indispensáveis em medidas de controle integrado, nos anos vindouros. Também Oku (1994) chama a atenção do leitor para as continuadas e brutais agressões ao meio ambiente e à saúde de seres humanos face ao uso excessivo e indiscriminado de pesticidas, preferindo mesmo nomear as alternativas politica e ecologicamente corretas de "agentes de controle de enfermidades" para diferençá-las dos armas químicas convencionais a que simplesmente denominamos "pesticidas".

Afinal, plantas possuem seus próprios mecanismos de defesa – altamente eficientes, por sinal - e é preciso que se aprenda a desenvolver tecnologia específica

para ativá-los (Colson & Deverall, 1996).

Chen et al.(1996b) relatam a experiência chinesa, desde a década de 60 até o presente momento, com o uso rotineiro de rizobactérias como ativadoras de defesas e como promotoras de crescimento de plantas. A microbiolização de sementes, antes do plantio, com propágulos de rizobactérias, tem sido prática agronômica rotineira na China Continental onde o governo se encarrega de distribuir aos agricultores 3.000 toneladas de formulaçòes de células de rizobactérias todos os anos, para serem utilizadas em 35.000.000 de hectares! Talvez por razões políticas que motivaram o isolamento da República Popular da China em todos os níveis, de intercâmbio científico inclusive, talvez pela própria filosofia de pesquisa e enfoque de problemas, somente em tempos recentes o mundo ocidental tem tomado conhecimento e percebido a incomensurável potencialidade do desenvolvimento de tecnologias específicas para ativação de mecanismos de defesa de plantas como alternativa inteligente ao uso indiscriminado de agrotóxicos.

No momento atual, a agricultura sustentável requer a utilização de estratégias que permitam o aumento da produtividade, sem prejuízo ao meio ambiente e saúde, de forma econômica e com justiça social. Uma das alternativas potenciais para atingir este objetivo é o uso de PGPRs, com destaque para aquelas capazes de mediar ISR, exercendo o controle múltiplo de patógenos com níveis semelhantes ao da SAR e com menor risco. Uma das maiores dificuldades a ser superada para uma rápida implementação deste tipo de controle é a pequena quantidade de estudos específicos no âmbito de campo, o que reflete o pequeno número de pesquisadores envolvidos, bem como as poucas chances de financiamento na área. Paralelamente, existe a necessidade da continuidade dos estudos sobre mecanismos de ação e fatores que determinam a ISR mediada pelas PGPRs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, F. B.; BOSSHART, R. P.; FORRENCE, L. E.; HABIG, W. H. Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves. **Plant Physiology**, v.47, p.129-134, 1971.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. 635 p.

ALSTROM, S. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.37, p.495-501, 1991.

ANDERSON, A.J.; GUERRA, D. Responses of bean to root colonization with *Pseudomonas putida* in a hydroponic system. **Phytopathology**, v.75, p.992-995, 1985.

BENHAMOU, N.; BELANGER, R. R. Induction of systemic resistance to Pythium damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Plant Journal**, v.14, p.13-21, 1998.

BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W.; BÉLANGER, R.R.; PAULITZ, T.C.; TUZUN, S. Bacterial-mediated induced resistance against fungal pathogens: cytology of the host response. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, Y.; HOMMA, Y.; KODAMA, F.; KONDO, N.; AKINO, S., ed. **Plant growth-promoting rhizobacteria – present status and future prospects**. Sapporo: OECD, 1997. p.303.

BENTES, J.L.S.; ROMEIRO, R.S.; FERNANDES, M.C.A.; BRITO, R.P.; PAUL, P.A. Rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica a doenças do tomateiro mas com ausência de efetividade para murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*). **Fitopatologia Brasileira**, v.23, p.208, 1998. (Abstract).

BINDER, A.; BAER, G.; HOFMAN, C.; KOVATS, K. Mechanisms in systemic reduced disease resistance. In: LUGTENBERG, B.J.J. ed. Signal molecules in plants and plant microbe interactions. In: NATO ADVANCED RESEARCH WORKSHOP ON MOLECULAR SIGNALS IN MICROBE PLANT SYMBIOTIC AND PATHOGENIC SYSTEMS, 1989, Biddinghuizen. **Proceedings...** Berlin: Springer-Verlag, 1989. p.267-272.

BOL, J. F.; LINTHORST, H. J. M.; CORNELISSEN, B. J. C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p.113-38, 1990.

BOLLER, T. Ethylene and plant-pathogen interactions. **Current Topics in Plant Physiology**, v.5, p.138-145, 1990.

BUSAM, G.; JUNGHANNS, K. T.; KNEUSEL, R. E.; KASSEMEYER, H. H.; MATERN, U. Characterization and expression of caffeoyl-coenzyme a 3-O-methyltransferase proposed for the induced resistance response of *Vitis vinifera* L. **Plant Physiology**, v.115, p.1039-1048, 1997.

BUSAM, G.; KASSEMEYER, H. H.; MATERN, U. Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. **Plant Physiology**, v.115, p.1029-1038, 1997b.

CARVER, T. L. W.; ZEYEN, R. J.; BUSHNELL, W. R.; ROBBINS, M. P. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase increases quantitative susceptibility of barley to powdery mildew (*Erysiphe graminis* D.C.). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.44, p.261-72, 1994.

CHEN, J.; JACOBSON, L.M.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. Compatibility of systemic acquired resistance and microbial biocontrol for suppression of plant disease in a laboratory assay. **Molecular Ecology**, v.5, p.73-80, 1996a.

CHEN, Y.; MEI, R.; LIU, L.; KLOEPPER, J. W. The use of yeld increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: UTKHEDE, R. S.; GUPTA, V. K., ed. **Management of soil born diseases**. Ludhiana: Kalyani Publishers, 1996b. chapter 8, p.165-184.

COHEN, Y.; GISI, U.; NIEDERMAN, T. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. **Phytopathology**, v.83, p.1054-1062, 1993.

COLSON, E.; DEVERALL, B. Helping plants fight their own disease battles. **Australian Cottongrower**, v.17, p. 76-80, 1996.

DE BOER, M; van der SLUIS, I; van LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. In vitro compatibility between fluorescent *Pseudomonas* strains can increase effectivity of *Fusarium* wilt control by combinations of these strains. In:: DUFFY, B.; ROSENBERGER, U.; DÉFAGO, G., ed. **Molecular approaches in biological control**.. Delémont: IOBC/OILB, 1998. p.257-261.

DE MEYER, G.; HÖFTE, M. Salicylic acid produced by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. **Phytopathology**, v.87, p.588-593, 1997.

ENEBAK, S.A.; WEI, G.; KLOEPPER, J.W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. **Forest Science**, v.44, p.139-144, 1998.

ENKERLI, J.; GISI, U.; MOSINGER, E. Systemic acquired resistance to *Phytophthora infestans* in tomato and the role of pathogenesis related proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.43, p.167-171, 1993.

FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.87, p.7713-7716, 1990.

FRAVEL, D. Hurdles and bottlenecks on the road to biocontrol of plant pathogens. **Australasian Plant Pathology**, v.28, p.53-56, 1999.

FRIEDRICH, L.; LAWTON, K.; RUESS, W.; MASNER, P.; SPECKER, N.; RELLA, M. G.; MEIER, B.; DINCHER, S.; STAUB, T.; UKNES, S. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **Plant Journal**, v.10, p.61-70, 1996.

FRIEND, J. Phenolic substances and plant disease. In: van SUMERE, C.F.; LEA, P.J. **The biochemistry of plant phenolics**. Oxford: Clarendon Press, 1985. p.367-392.

GROSSKOPF, D. G.; FELIX, G.; BOLLER, T. A yeast-derived glycopeptide elicitor and chitosan or digitonin differentially induce ethylene biosynthesis, phenylalanine ammonia-lyase and callose formation in suspension-cultured tomato cells. **Journal of Plant Physiology**, v.138, p.741-746, 1991.

GUNDLACH, H.; MULLER, M. J.; KUTCHAN, T. M.; ZENK, M. H. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.89, p.2389-2393, 1992.

HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**, v.20, p.61-71, 1982.

HERBERS, K.; MONKE, G.; BADUR, R.; SONNEWALD, U. A simplified procedure for the subtractive cDNA cloning of photoassimilate-responding genes: isolation of cDNAs encoding a new class of pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, v.29, p.1027-1038, 1995.

HOFFLAND, E.; HAKULINEN, J.; van PELT, J.A.; Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. **Phytopathology**, v.86, p.757-762, 1996.

HOFFLAND, E.; PIETERSE, C.M.J.; BILK, L.; van PELT, J.A. Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.46, p.309-320, 1995.

HOFFMANN-HERGARTEN, S.; HASKY, K.; REITZ, M.; SIKORA, R.A. Induced systemic resistance by rhizobacteria toward the cyst nematode *Globodera palida* on potato. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, Y.; HOMMA,Y.; KODAMA, F.; KONDO, N.; AKINO, S., ed. **Plant growth-promoting rhizobacteria – present status and future prospects**. Sapporo: OECD, 1997. p.292-295.

HU, X.; REDDY, A.S.N.; HU, X. Cloning and expression of a PR5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth bybacterially expressed protein. **Plant Molecular Biology**, v.34, p.949-959, 1997.

JETIYANON, K.; TUZUN, S.; KLOEPPER, J.W. Lignification, peroxidase and superoxide dismutases as early plant defense reactions associated with PGPRs-mediated induced systemic resistance. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, Y.; HOMMA,Y.; KODAMA, F.; KONDO, N.; AKINO, S., ed. **Plant growth-promoting rhizobacteria – present status and future prospects**. Sapporo: OECD, 1997. p.265-268.

KEEN, N. T.; YOSHIKAWA, M. 1,3-Endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from funguscell walls. **Plant Physiology**, v.71, p.460-465, 1983.

KLOEPPER, J. W. Host specificity in microbe-microbe interactions. **BioScience**, v.46, p.406-409, 1996.

KLOEPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: METTING, B., ed. **Soil microbial technologies**. New York: Marcel Dekker, 1993. p.255-274.

KLOEPPER, J.W.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; ZEHNDER, G.W.; MURPHY, J.F.; SIKORA, E.; FERNÁNDEZ, C. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australasian Plant Pathology**, v.28, p.21-26, 1999.

KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S.; KÚC, J. Proposed definitions related to induced disease resistance. **Biocontrol Science and Technology**, v.2, p.349-351, 1992.

KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S.; ZEHNDER, G. W.; WEI, G.; WEI, G. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance - historical precedence. **Phytopathology**, v.87, p.136-137, 1997.

KODA, Y. The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. **International Review of Cytology**, v.135, p.155-199, 1992.

KOIKE, N.; KAGEYAMA, K.; HYAKUMACHI, M. Induction of systemic resistance in cucumber against anthracnose, bacterial angular leaf spot and Fusarium wilt by selected strains of plant growth-promoting fungi. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, Y.; HOMMA,Y.; KODAMA, F.; KONDO, N.; AKINO, S., ed. **Plant growth-promoting rhizobacteria – present status and future prospects**. Sapporo: OECD, 1997. p.277-280.

KUC, J. Increasing crop produtivity and value by increasing disease resistance through non-genetic techniques. In: SYMPOSIUM ON FOREST POTENTIALS: productivity and value, 1985, Tacoma. **Proceedings...** Washington: Weyerhaeuser, 1985. p.147-190.

KUNZ, W.; SCHURTER, R.; MAETZKE, T. The chemistry of benzothiadiazole plant activators. **Pesticide Science**, v.50, p.275-282, 1997.

KUROSAKI, F.; AMIN, M.; NISHI, A. Induction of phytoalexin production and accumulation of phenolic compounds in cultured carrot cells. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.28, p.359-370, 1986.

LAWRENCE, C. B.; JOOSTEN, M. H. A. J.; TUZUN, S. Differential induction of pathogenesis related proteins in tomato by Alternaria solani and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.48, p.361-377, 1996.

LAWTON, K. A.; FRIEDRICH, L.; HUNT, M.; WEYMANN, K.; DELANEY, T.; KESSMANN, H.; STAUB, T.; RYALS, J. Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. **Plant Journal**, v.10, p.71-82, 1996.

LEEMAN, M.; DEN OUDEN, F.M.; van PELT, J.A.; DIRKX, F.P.M.; STEIJL, H; BAKKER, P.A.H.M.; SCHIPPERS, B. Iron availability affects induction of systemic resistance to Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, v.86, p.149-155, 1996.

LEEMAN, M.; van PELT, J.A.; DEN OUDEN, F.M.; HEINSBROEK, .M.; BAKKER, P.A.H.M.; SCHIPPERS, B. Induction of systemic resistance against Fusarium wilt of radish by lypopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, v.85, p.1021-1027, 1995.

LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v.85, p.843-847, 1995a.

LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v.85, p.695-698, 1995b.

LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. **Phytopathology**, v.85, p.695-698, 1995c.

LYON, G. D.; FORREST, R. S.; NEWTON, A. C. SAR - the potential to immunise plants against infection. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE: Pests & Diseases, 1996, Brighton. **Proceedings...** Brighton: BCPC, 1996. p.939-946.

MARTINEZ-OCHOA, N.; KLOEPPER, J.W.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; JI, P. Induced resistance and phenotypic characteristics of several PGPRs compared to biocontrol activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, Y.; HOMMA,Y.; KODAMA, F.; KONDO, N.; AKINO, S., ed. **Plant growth-promoting rhizobacteria – present status and future prospects**. Sapporo: OECD, 1997. p.296-300.

MAUCH-MANI, B.; SLUSARENKO, A. J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of Arabidopsis to *Peronospora parasitica*. **Plant Cell**, v.8, p.203-212, 1996.

MAURHOFER, M.; HASE, C.; MEUWLY, P.; MRAUX, J-P.; DÉFAGO, G. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: influence of the *gacA*-gene and of pyoverdine production. **Phytopathology**, v.84, p.149-146, 1994.

MAURHOFER, M.; REIMMANN, C.; SCHMIDLI-SACHERER, P.; HEEB, S.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Saliculic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. **Phytopathology**, v.88, p.678-684, 1998.

MEYER, J.M.; AZELVANDRE, P.; GEORGES, C. Iron metabolism in *Pseudomonas*: salicylic acid, a siderophore of *Pseudomonas fluorescens* CHAO. **Biofactors**, v.4, p.23-27, 1992.

MOURA, A. B.; ROMEIRO, R. S.; NEVES, M. C. P. Actinomicetos com atividade semelhante a PGPRs em plantas de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.337, 1996.

NEUENSCHWANDER, U.; FRIEDRICH, L.; DELANEY, T.; VERNOOIJ, B.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Activation of plant disease resistance. **Aspects of Applied Biology**, v.42, p.217-225, 1995.

NIDERMAN, T.; GENETET, I.; BRUYÈRE, T.; GEES, R.; STINTZI, A.; LEGRAND, M.; FRITIG, B.; MOSINGER, E. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. **Plant Physiology**, v.108, p.17-27, 1995.

OKU, H. **Plant pathogenesis and disease control**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. 193p.

PARK, K.S.; MOYNE, A.; TUZUN, S.; KIM, C.H.; KLOEPPER, J.W. Induction of a PR-1a promoter in a transgenic tobacco reporter system by selected PGPRs strains which induce resistance. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, Y.; HOMMA,Y.; KODAMA, F.; KONDO, N.; AKINO, S., ed. **Plant growth-promoting rhizobacteria – present status and future prospects**. Sapporo: OECD, 1997. p.256-259.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência a doenças. In: LUZ, W.C., ed. **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo, 1994. v.2, p.1-51.

PENNINCKX, I.; EGGERMONT, K.; TERRAS, F.R.G.; THOMMA, B.; SAMBLANX den, G. W.; BUCHALA, A.; METRAUX, J.P.; MANNERS, J.M.; BROEKAERT, W.F.; DE SAMBLANX, G.W. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. **Plant Cell**, v.8, p.2309-2323, 1996.

PIERSON, E.A.; WELLER, D.M. Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and to improve the growth of wheat. **Phytopathology**, v.84, p.940-947.

PIETERSE, C.M.J.; van LOON, L.C. Salicylic acid-independent plant defence pathways. **Trends in Plant Science**, v.4, p.52-58, 1999.

PIETERSE, C.M.J.; van VEES, S.C.M.; HOFFLAND, E. van PELT J.A.; van LOON, L.C. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is dependent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene-expression. **Plant Cell**, v.8, n.8, p.1225-1237, 1996.

PONSTEIN, A. S.; BRES VLOEMANS, S. A.; SELA BUURLAGE, M.B.; ELZEN, P. J. M.; MELCHERS, L. S.; CORNELISSEN, B. J. C.; van den ELZEN, P. J. M. A novel pathogen- and wound- inducible tobacco (Nicotiana tabacum) protein with antifungal activity. **Plant Physiology**, v.104, p.109-118, 1994.

PRESS, C.M.; KISAALITA, W.; WILSON, M.; TUZUN, S.; KLOEPPER, J.W. Effects of iron and siderophores on induced systemic resistance of cucumber mediated by *Serratia marcescens* 90-166. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, Y.; HOMMA,Y.; KODAMA, F.; KONDO, N.; AKINO, S., ed. **Plant growth-promoting rhizobacteria – present status and future prospects**. Sapporo: OECD, 1997. p.251-255.

PRESS, C.M.; KLOEPPER, J.W. Role of bacterial cell constituents in PGPRs-mediated induced systemic resistance of cucumber. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, Y.; HOMMA,Y.; KODAMA, F.; KONDO, N.; AKINO, S., ed. **Plant growth-promoting rhizobacteria – present status and future prospects**. Sapporo: OECD, 1997a. p.260-264.

PRESS, C.M.; WILSON, M.; TUZUN, S.; KLOEPPER, J.W. Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p.761-768, 1997b.

RAUPACH, G.S.; KLOEPPER, J.W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, v. 88, p.1158-1164, 1998.

RAUPACH, G.S.; LIU, L.; MURPHY, J.F.; TUZUN, S.; KLOEPPER, J.W. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria PGPRs. **Plant Disease**, v.80, p. 891-894, 1996.

REIMMANN, C.; MAURHOFER, M.; SCHMIDLI, P.; GAILLE, C.; DAAS, D.; DÉFAGO, G. Role of salicylate produced by *Pseudomonas fluorescens* in the suppression of tobacco diseases. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, Y.; HOMMA,Y.; KODAMA, F.; KONDO, N.; AKINO, S., ed. **Plant growth-promoting rhizobacteria – present status and future prospects**. Sapporo: OECD, 1997. p.248-250.

ROMEIRO, R. S.; KIMURA, O. Induced resistance in pepper leaves infiltrated with purified elicitors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of Phytopathology**, v.145, p.495-498, 1997.

ROMEIRO, R. S.; LEITE, R. S. V.; BRITO, R. P.; MATSUOKA, K.; BARBOSA, U. G. Experimental evidence of induced systemic resistance in tomato to *P. syringae* pv. *tomato* after seed microbialization with selected rhizobacteria. **Phytopathology**, v.87, p. 183, 1997. (Abstract).

SCHWEIZER, P.; GEES, R. E. M.; MOSINGER, E. Effect of jasmonic acid on the interaction of barley (*Hordeum vulgare* L.) with the powdery mildew *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. **Plant Physiology**, v.102, p.503-511, 1993.

SHAH, J.; TSUI, F.; KLESSIG, D. F. Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sai1) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the tms2 gene. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.10, p.69-78, 1997.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.235-270, 1997.

STUMPF, P. K.; CONN, E. E. E. **The biochemistry of plants - secondary plant products**. New York: Academic Press, 1981. 798p.

UKNES, S.; DINCHER, S.; FRIEDRICH, L.; NEGROTTO, D.; WILLIAMS, S.; THOMPSON TAYLOR, H.; POTTER, S.; WARDS, E.; RYALS, J. Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco. **Plant Cell**, v.5, p.159-169, 1992.

UKNES, S.; VERNOOIJ, B.; WILLIAMS, S.; CHANDLER, D.; LAWTON, K.; DELANEY, T.; FRIEDRICH, L.; WEYMANN, K.; NEGROTTO, D.; GAFFNEY, T.; GUT RELLA, M.; KESSMANN, H.; ALEXANDER, D.; WARD, E.; RYALS, J. Systemic acquired resistance. **HortScience**, v.30, p.962-963, 1995.

van LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.753-765, 1997.

van LOON, L. C. The induction of pathogenesis-related proteins by pathogens and specific chemicals. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.89, p.265-273, 1983.

van LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Induction and expression of PGPRs-mediated induced resistance against pathogens. In: DUFFY, B.; ROSENBERGER, U.; DÉFAGO, G., ed. **Molecular approaches in biological control**. Delémont: IOBC/OILB, 1998. p.103-110.

van LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Mechanisms of PGPRs-induced resistance against pathogens. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, Y.; HOMMA,Y.; KODAMA, F.; KONDO, N.; AKINO, S., ed.. **Plant growth-promoting rhizobacteria – present status and future prospects**. Sapporo: OECD, 1997. p.50-57.

van LOON, L.C.; PIERPOINT, W.S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.12, p.245-264, 1994.

van LOON, L. C.; van KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". **Virology**, v.40, p.199-211, 1970.

van PEER, R.; NIEMANN, G.J.; SCHIPPERS, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. **Phytopathology**, v.81, p.728-734, 1991.

van PEER, R.; SCHIPPERS, B. Lipopolysaccharides of plant growth-promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS 417r induce resistance in carnation to Fusarium wilt. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.98, p.129-139, 1992.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.18, p.259-288, 1980.

WEI, G.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by selected strains of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v.81, p.1508-1512, 1991.

YAO, C.; ZEHNDER, G.W.; MURPHY, J.; KLOEPPER, J.W. Evaluation of induced systemic resistance and plant growth promotion in tomato with selected PGPRs strains. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, Y.; HOMMA,Y.; KODAMA, F.; KONDO, N.; AKINO, S., ed. **Plant growth-promoting rhizobacteria – present status and future prospects**. Sapporo: OECD, 1997. p.285-288.

ZEHNDER, G.; KLOEPPER, J.; TUZUN, S.; YAO, C.; WEI, G.; CLAMBLISS, O.; SHELBY, R. Insect feeding on cucumber

mediate by rhizobacteria-induced plant resistance. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.83, p.81-85, 1997.

10

A MODERNA BIOTECNOLOGIA COMO AUXILIAR NO CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE PRAGAS DA AGRICULTURA

João Lúcio de Azevedo
José Luiz Caldas Wolff

INTRODUÇÃO

A Biotecnologia, entendida como o uso de sistemas biológicos no desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico e social, é bastante ampla. Ela abrange, desde o melhoramento tradicional de microrganismos, plantas e animais, o emprego de tecnologias de fermentação industrial para obtenção de antibióticos e outros fármacos, enzimas, etanol e muitos outros produtos, técnicas de cultura de tecidos vegetais e animais, até outras mais sofisticadas como a fusão de protoplastos e a tecnologia do DNA recombinante, conhecida popularmente como engenharia genética.

O controle biológico de insetos-praga da agricultura e de doenças de plantas é uma das áreas mais valorizadas recentemente, pela sua potencialidade em diminuir ou mesmo eliminar o uso de agroquímicos, reduzindo, assim, os problemas que estes compostos causam no ambiente devido ao seu uso abusivo e indiscriminado. Particularmente, o controle microbiológico, isto é, o uso de microrganismos como os vírus, as bactérias e os fungos, tem se mostrado eficiente para reduzir os efeitos danosos causados por insetos-praga da agricultura e microrganismos fitopatogênicos. Desta maneira, microrganismos empregados neste controle têm sido submetidos a um melhoramento genético, visando a uma maior eficiência e otimização das etapas que ocorrem desde sua fabricação industrial até a aplicação em campo, no controle

de pragas e doenças agrícolas.

O controle microbiológico de pestes agrícolas não é novo. Ele vem sendo usado, embora empiricamente, desde a antigüidade. Um dos relatos mais interessantes é o de Evelyn que, no século XVII, descreve em seu livro Sylva a utilização de um macerado de lagartas, possivelmente infectadas por um vírus no controle de uma praga que atacava essências florestais. Atualmente, existem disponíveis no mercado cerca de 200 produtos de controladores biológicos registrados, os chamados bioinseticidas, com faturamento anual de 300 milhões de dólares, o que corresponde apenas a 1% do faturamento conseguido pelos compostos químicos empregados com a mesma finalidade. Tudo leva a crer, portanto, que, por razões ecológicas, econômicas e desenvolvimento de produtos microbianos mais eficientes, melhorados por técnicas tradicionais ou modernas, ocorra um aumento considerável no interesse de aprimorar cada vez mais linhagens e produtos microbianos para o controle biológico.

Embora recentes revisões já existam sobre o assunto (Alves, 1998; Melo & Azevedo, 1998; Azevedo, 1998 a, 1998b, Pacolla-Meirelles, 1998; Valadares -Inglis et al, 1998), a maioria trata de técnicas empregadas no melhoramento de fungos e bactérias no controle biológico de insetos. No presente capítulo vão ser mencionadas apenas linhagens e produtos que, preferencialmente, vêm sendo obtidos por tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética.

Neste particular, os fungos vêm sendo menos utilizados enquanto que trabalhos com bactérias e, principalmente, os vírus são mais numerosos. Uma vez que as revisões acima citadas cobrem grande parte dos dados referentes a bactérias e fungos disponíveis na literatura, esses grupos serão menos enfatizados no presente capítulo, dando-se maior relevância aos vírus geneticamente modificados.

Melhoramento de fungos usados no controle biológico por engenharia genética

Infelizmente, em relação aos fungos, os progressos alcançados graças as novas tecnologias são reduzidos e bem menores que os conseguidos em bactérias e virus. Sendo eucariontes e bem mais complexos que os procariontes, isto é bastante compreensível. Também deve ser considerado o fato de que, no controle biológico, a

linhagem melhorada tem que ser lançada no meio ambiente em competição com outros microrganismos lá existentes e em condições bastante distintas de temperatura, umidade, insolação e outras que normalmente não ocorrem em bioensaios realizados em condições de laboratório. De fato, o grande sucesso conseguido com linhagens microbianas melhoradas por tecnologia do DNA recombinante tem ocorrido na área de fermentações industriais, onde a linhagem manipulada geneticamente trabalha em condições controladas e, na grande maioria dos casos, o mais longe possível de contaminações. Em geral, linhagens de fungos e bactérias engenheiradas, empregadas na produção de fármacos tais como a insulina, hormônios de crescimento, antibióticos e outros compostos, trabalham em condições rigorosamente controladas, caso contrário não teriam meios de competir com outros microrganismos da natureza, muito mais adaptados às condições de alta competitividade. Já com fungos controladores de insetos ou doenças, a situação é bem diferente. Eles têm que ser liberados no meio ambiente e aí as condições muitas vezes lhes são adversas, explicando os tímidos resultados obtidos até o momento com fungos controladores biológicos de pestes. Se é bem verdade que técnicas de transformação e clonagem de genes além de outras, já estão bem definidas em espécies de fungos entomopatogênicos como *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, esta é apenas uma etapa inicial necessária, mas não suficiente para que resultados aplicados, de valor biotecnológico, sejam obtidos. Alguns exemplos da tecnologia do DNA recombinante em fungos entomopatogênicos podem ser mencionados.

Em *M. anisopliae*, o gene que codifica uma proteína, designada de PR1, tem sido empregado em estudos de regulação gênica e, para verificação de seu efeito na cutícula de insetos (St, Leger et al., 1992), genes de quitinase foram também clonados no mesmo fungo (Barreto et al., 1995: Valadares & Peberdy, 1995: Bogo et al., 1996). Um incremento na velocidade de mortalidade de insetos foi também tentado, aumentando-se a expressão do gene que codifica a proteína PR1, uma protease que degrada a cutícula dos insetos alvo (St. Leger et al., 1996, Screen & St. Leger, 1999a). Como vários são os genes envolvidos no processo, o caráter é, portanto, poligênico e, embora tenha ocorrido uma redução no tempo de mortalidade do inseto, surgiram também efeitos colaterais, como a redução de esporulação do fungo; ocorreu

também uma redução da disseminação do agente do controle biológico no campo, propriedade das mais importantes dos fungos entomopatogênicos. Tudo isto está a demonstrar que o emprego das técnicas de Engenharia Genética em fungos utilizados no controle biológico pode ser ineficaz, quando aplicado em campo aberto, onde os produtos da Engenharia Genética têm que competir com linhagens selvagens adaptadas há milhões de anos àquelas condições. No caso mencionado, o ganho da redução do tempo de mortalidade foi inócuo, pois perdeu-se a melhor qualidade do controle biológico, qual seja a disseminação natural do controlador, sem necessidade de, como nos agroquímicos, sucessivas aplicações do produto.

São raros os casos em que a Engenharia Genética tem sido aplicada efetivamente em fungos entomopatogênicos. Em *B. bassiana*, por exemplo, os resultados referem-se mais à produção de transformantes (Pfeifer & Khachaturian, 1992) e clonagem de genes, com o objetivo de obtenção de marcadores em linhagens de potencial econômico. Neste particular, têm-se empregado, por exemplo, genes mitocondriais (Hegedus et al, 1991). Mais recentemente, Screen & St. Leger (1999b) iniciaram a catalogação de regiões do DNA de *M. anisopliae*, que codificam as diversas proteínas formadas pelo fungo. Um projeto piloto de seqüenciamento nesta espécie, tem identificado genes para enzimas intra e extracelulares, para fatores de transcrição e genes de proteínas estruturais, entre outros.

Como salientado na revisão de Valadares-Inglis et al. (1998), também fungos controladores de doenças de plantas, como espécies do gênero *Trichoderma*, estão sendo empregados em estudos com tecnologia do DNA recombinante. Até 1995, cerca de 50 genes já haviam sido clonados neste gênero de fungo, dentre eles os que digerem parede celular de fungos fitopatogênicos. Por exemplo, Chet et al. (1993) relataram a transferência do gene de quitinase *(chi* A) de *Serratia marcenscens* para *Trichoderma harzianum*, o que resultou em aumento na secreção de quitinase pelos transformantes.

Bactérias utilizadas no controle biológico, melhoradas por engenharia genética

Sem dúvida, o "carro-chefe" dos produtos comercializados utilizados

no controle microbiológico, provém de uma bactéria : *Bacillus thuringiensis*. Toxinas produzidas por esta bactéria vêm sendo usadas no controle biológico de insetos-praga da agricultura há cerca de 50 anos. Uma grande fatia, ou seja, 90% do mercado mundial de produtos microbianos utilizados no controle de insetos, particularmente os lepidópteros, coleópteros e dípteros, é representada por produtos oriundos dessa bactéria, designada abreviadamente por B.T. As linhagens de *B. thuringiensis* possuem genes que codificam proteínas conhecidas como delta-endotoxinas, produzindo formações cristalinas nos esporos da bactéria. Esses cristais possuem as toxinas conhecidas também como proteína-cristal ou CRY. Tais proteínas são tóxicas para insetos, mas não causam qualquer problema em mamíferos. Já foram descritos mais de 50 genes responsáveis pela formação das delta-toxinas, proteínas-cristal ou proteínas CRY. Eles localizam-se preferencialmente em plasmídios, que são elementos extracromossômicos da bactéria, circulares e compostos por DNA com tamanhos que variam de 40 a 150MDa. Estes genes estão relativamente bem estudados, podem existir em múltiplas cópias dentro do genoma da bactéria, além de possuírem elementos transponíveis, os transposons, em sua composição. Sua atuação é mais acentuada na fase estacionária de crescimento da bactéria, quando, então, enviam sua mensagem para a síntese da proteína-cristal. A revisão de Valladares-Inglis et al. (1998) apresenta detalhes sobre a genética desta bactéria e sobre a expressão dos genes *cry;* apresenta também os tipos principais desses genes, seus produtos e sua estabilidade.

Além dos genes *cry*, outro gene foi mais recentemente descrito em *B. thuringiensis*, produzindo uma toxina vegetativa, isto é, não no interior dos esporos da bactéria. Este gene, designado de *VipA3* produz toxina ativa de 791 aminoácidos contra larvas de lepidópteros (Estruch et al., 1996).

Limitações em relação ao uso desses produtos ocorrem devido a uma série de fatores tais como: alta especificidade, dificuldade de atingir certas pragas como as que habitam o solo e atacam raízes, ou aquelas que entram rapidamente em tecidos e órgãos da planta, além do alto custo de produção e baixa eficiência em ambientes aquáticos. Desta forma, as novas tecnologias como as de Engenharia Genética são importantes para que se obtenham linhagens que possam suplantar

essas dificuldades.

Uma das estratégias para que as toxinas possam também exercer efeitos sobre insetos que se alimentam de raízes e vivem no solo, foi a transferência de genes *cry* para bactérias do solo, como *Pseudomonas fluorescens.* Esta bactéria tem a toxina estabilizada e sua permanência no ambiente é aumentada (Gelerntel & Schwab, 1993). A bactéria, não sendo esporulada, é eliminada pela produção da toxina. Esse é, na realidade, um sistema de encapsulamento das toxinas e o produto está patenteado com o nome de CellCap-Mycogen.

Outras técnicas de Engenharia Genética aplicadas ao *B. thuringiensis* envolvem a transferência de vários genes *cry* distintos para uma mesma bactéria hospedeira. Em alguns casos, formaram-se novas toxinas ou ainda ocorreu um efeito sinergístico pela combinação de duas ou mais toxinas. Por exemplo, Sanchis et al. (1999) construíram uma linhagem de *B. thuringiensis* recombinante com expressão de um gene *cry1* adicional sob controle de outro sistema envolvendo o gene *cryA3.* Essa linhagem produz maior quantidade de proteína-cristal do que a selvagem. Foi também colocado na linhagem um gene que impede a formação de esporos. Desta forma, a proteína-cristal produzida foi encapsulada dentro da própria bactéria, o que confere uma maior resistência da mesma à luz ultravioleta solar. Duas linhagens com interesse para o controle biológico foram assim produzidas e designadas de AGRO1 (proteína-cristal encapsulada) e AGRO2(proteína-cristal liberada).

Uma elegante maneira de se contornar o problema da baixa persistência das toxinas na água, que ocorre devido à decantação da toxina, é transferir os genes *cry* para bactérias cianofíceas. As cianobactérias habitantes das superfícies das águas transformadas dessa maneira, produzem as toxinas que eliminam larvas de insetos (Gelerntel & Schwab, 1993).

Os resultados mais interessantes do ponto de vista biotecnológico conseguidos com o *B. thuringiensis* têm sido a transferência dos genes envolvidos na produção da toxina ativa para plantas, produzindo-se assim linhagens, variedades e cultivares vegetais resistentes a certos insetos. Uma grande vantagem do processo é que a toxina vai ser distribuída por toda a planta que agora é designada de planta transgênica. Dessa forma ela vai ser também resistente aos insetos do solo suscetíveis

à toxina e a insetos que habitam o interior da planta, como as brocas do colmo, por exemplo. Esses insetos dificilmente seriam atingidos por pulverizações do produto no campo, mas são eficientemente controlados pela própria planta transgênica produtora de toxina. Além disso, não se aplicando o produto, há diminuição para o agricultor dos custos de produção, tanto pela redução de mão-de-obra, quanto pela não necessidade de aquisição do produto que, como mencionado, é dispendioso. Ao lado dessas vantagens, há questionamentos quanto a biossegurança do processo. Alega-se que a introdução de genes produtores de toxinas contra insetos em uma planta pode causar em pouco tempo a emergência de raças de insetos resistentes à toxinas. De fato, o emprego da bactéria no campo para combate aos insetos é uma verdadeira luta biológica, na qual a bactéria, com população muito mais numerosa que a de insetos, sai vencedora. Embora insetos mutantes resistentes apareçam, bactérias também mutantes, produtoras de toxinas modificadas, vão ser capazes de atacar os insetos resistentes à toxina inicial e é por isso que o produto vem sendo usado com sucesso há tanto tempo. No caso de plantas transgênicas com gene para produção de toxina, os insetos são favorecidos, pois existe um número muito superior de insetos-praga em comparação ao de plantas atacadas. Dessa maneira, a probabilidade de um inseto mutante resistente ocorrer é maior do que o de uma planta que possua o gene introduzido ter o mesmo modificado por mutação. Essa mutação, que é rara se ocorrer, tem que ser capaz de novamente produzir planta resistente à população de insetos resistentes a toxina anterior. Há relatos de que a resistência de insetos a toxinas de *B. thuringiensis* não seria tão rara como relatado (Tabashnik et al., 1997). Entretanto, isto não é novidade dentro do melhoramento genético de plantas. Variedades resistentes a pragas e moléstias têm sido criadas pelos melhoristas e, em pouco tempo, elas têm que sair do mercado, pois novas raças fisiológicas de patógenos e pragas ocupam o lugar das anteriormente incapazes de atacar a planta. Como salienta o melhorista vegetal Ernesto Paterniani (comunicação pessoal), quem trabalha com melhoramento genético para resistência a pragas e moléstias pode ganhar uma batalha, mas, no final, sempre perde a guerra. Aliás, isso ocorre também pelo uso em larga escala dos antibióticos no controle de doenças bacterianas ou fúngicas. Após o aparecimento de um novo antibiótico, linhagens microbianas resistentes a ele vão surgir e tornar o

tratamento ineficaz. Da mesma maneira, inseticidas e fungicidas lançados no mercado vão aos poucos perdendo sua eficácia devido ao aparecimento de formas resistentes. Até que, no caso de plantas transgênicas que receberam o gene da proteína-cristal, há soluções muito interessantes para que seja evitada a rápida emergência de insetos resistentes. Uma delas é a adição de diferentes genes *cry* ao genoma da planta, produzindo-se, assim, diferentes toxinas em uma mesma planta. Nesse caso, o aparecimento de um inseto resistente a duas toxinas concomitantemente é igual ao produto da freqüência de mutação para cada gene, o que reduz em termos de probabilidade o aparecimento deste inseto duplo mutante na população. Esta, aliás, é uma das estratégias usadas na terapêutica médica para evitar o aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos; associações de duas ou mais drogas inibidoras reduzem a emergência de resistentes em populações de bactérias patogênicas. Outra forma de redução do aparecimento de insetos resistentes a toxinas é o emprego de plantas da mesma espécie, porém não transgênicas, cultivadas junto às transgênicas. Os insetos vão preferir essas plantas que funcionam então como refúgios, mantendo a população de insetos suscetível à toxina e reduzindo os riscos do aparecimento de formas resistentes.

Uma outra fonte de preocupação é que o pólen liberado pelas plantas transgênicas, e que possuem toxinas, pode ser disseminado sobre vegetais, crescendo próximos da plantação transgênica e causar a morte de insetos úteis, que se alimentam de folhas ou outros órgãos e tecidos do vegetal, como polinizadores de plantas ou mesmo controladores biológicos de outros insetos. Neste particular, um trabalho muito mal conduzido, publicado pela revista Nature em 1999, relata um experimento onde larvas de borboletas Monarca, que não são pragas agrícolas, foram alimentadas com folhas de plantas normalmente escolhidas por elas e que vivem próximas à plantações, nas quais se colocou uma grande quantidade de pólen de planta transgênica, a recebeu gene de *B. thuringiensis*. Os resultados mostraram que cerca de 50% das larvas morreram mesmo nessas condições adversas, em que a única alimentação era constituída por folhas com pólen transgênico, não tendo sido feito um controle, no caso, com folhas sem o pólen transgênico. Trabalhos como esse, que são publicados por revista de alto índice de impacto, infelizmente são os que recebem maior atenção

da mídia e dificultam a aceitação de transgênicos pelo público leigo. Entretanto, do ponto de vista técnico, vários exemplos de plantas transgênicas com genes de *B. thuringiensis* já foram ensaiadas em campo com resultados muito positivos. É o caso do algodão transgênico com genes de delta-toxina que se mostrou resistente ao inseto-praga *Helicoverpa zea*; embora, a princípio, as taxas de toxinas não fossem muito altas, o que propiciava apenas um controle parcial, há processos para aumentar essa quantidade, resultando desta forma um controle mais efetivo da praga. Em arroz, no Japão, foi conseguida uma variedade transgênica resistente aos insetos das espécies *Chilo supressalis* e *Cnaphelocroses medinalis,* com redução de perdas na cultura e maior taxa de mortalidade dos insetos. Com a batata, plantas transgênicas resistentes ao inseto *Manduca sexta* mostraram redução no consumo foliar pelos insetos. Tanto em tabaco, a introdução de gene de *B. thuringiensis*, tendo como vetor *Agrobacterium tumefasciens*, como em milho, introduzindo-se genes *cry* pela técnica da biolística, obtiveram-se transgênicos resistentes a insetos-praga dessas culturas como a *Ostrinia nubilalis* do milho. Um milho transgênico produzido pela empresa Mycogen e pela Ciba Seeds, obteve permissão para ser liberado nos Estados Unidos, em 1996. Atualmente, plantas transgênicas de milho, contendo genes de *B. thuringiensis* que conferem resistência a insetos, estão plantadas em milhões de hectares nos Estados Unidos e outros países.Os níveis mais altos de resistência em plantas de milho, com relação a larvas dos insetos-praga *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea grandiosella,* foram conseguidos pela introdução do gene de toxina de *B. thuringiensis* em plantas híbridas (Williams et al., 1997). Em tomate, plantas transgênicas contendo genes de *B. thuringiensis,* são resistentes ao ataque do inseto *Hellicoverpa armigera.* Detalhes sobre os processos de produção dessas plantas transgênicas podem ser encontrados na revisão de Azevedo (1998a). Plantas transgênicas resistentes a insetos-praga da agricultura têm tido sucesso no campo, demonstrando que a técnica é eficiente e não-poluidora, quando comparada com técnicas químicas de controle de insetos. Portanto, a tendência é de que elas deverão ser cada vez mais utilizadas na agricultura moderna.

Finalmente, ainda considerando bactérias como controladores biológicos, vale a pena citar uma outra estratégia no controle biológico de pragas

agrícolas e doenças de plantas. Trata-se da utilização de microrganismos endofíticos, ou seja, aqueles que habitam o interior de plantas e aparentemente não causam qualquer dano ao seu hospedeiro. Em muitos casos, inclusive, protegem as plantas contra doenças, pragas e até contra mamíferos herbívoros. Para uma revisão sobre microrganismos endofíticos, pode ser consultada a revisão de Azevedo (1998c). Os microrganismos endofíticos também podem ser manipulados geneticamente por técnicas modernas. O primeiro caso relatado ocorreu na bactéria endofítica de milho, a *Clavibacter xyli* subespécie *cynodontis*, que vive no xilema de milho e não causa qualquer dano ao seu hospedeiro. Gene de toxina de *B. thuringiensis* foi introduzido nessa bactéria e a mesma foi agregada a sementes de milho. Depois de germinarem, as plantas de milho possuíam a bactéria endofítica modificada em seu interior, produzindo a toxina contra a broca do milho. O produto conhecido como "Incide", desenvolvido pela Crop Genetics International Coorporation, ainda não apresentava resultados muito favoráveis devido à baixa concentração da bactéria e, conseqüentemente, pequena distribuição da toxina por toda a planta. Entretanto, o uso de promotores mais apropriados e o aumento da produção de toxinas têm resultado em controle parcial ou total de pragas. Outras culturas, como as de arroz, algodão, soja, sorgo e trigo têm empregado microrganismos transgênicos com genes apropriados para controle de pragas e doenças de plantas, com bastante eficiência. No Brasil, um processo de controle da doença "clorose variegada dos citrus" (CVC) causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, por meio de genes de xantanases em microrganismos endofíticos, está sendo pesquisado graças a projeto financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) envolvendo várias instituições, como a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) e Instituto Agronômico de Campinas(IAC).

Baculovírus geneticamente modificados e seu uso no controle biológico

Assim como os fungos e as bactérias, os vírus também podem ser utilzados no controle biológico, principalmente de insetos-praga. Do ponto de vista de

modificações genéticas pela tecnologia do DNA recombinante, sua utilização fica facilitada pela simplicidade de seu genoma em comparação com as bactérias e fungos. Desta maneira, vários exemplos de manipulação genética em vírus têm sido relatados, como será visto a seguir. Dentre os vírus, destacam-se os baculovírus como agentes do controle biológico de insetos. São eles, então, que vão merecer destaque nos próximos itens.

Características gerais dos baculovírus

Os baculovírus formam um importante grupo de vírus que infectam artrópodes, principalmente insetos da Ordem Lepidoptera (Granados & Federici, 1986; Blissard & Rohrmann, 1990). Os vírus desse grupo possuem nucleocapsídeos envelopados em forma de bastonete, medindo geralmente entre 30 a 35 nanômetros de largura por 250 a 300 nanômetros de comprimento (Volkman et al., 1995). Seu genoma é constituído de uma molécula de DNA circular, fita dupla, cujo tamanho varia de 90 a 160Kbp (Volkman et al., 1995). A característica morfológica mais marcante desses vírus é o corpo de oclusão, um cristal protéico que envolve os vírions, protegendo-os no meio ambiente. Os baculovírus despertam grande interesse pelo seu uso como agente de controle biológico e pela sua aplicação como vetor de expressão de proteínas heterólogas.

A família *Baculoviridae* abrange dois gêneros, o *Nucleopolyhedrovirus* (NPV ou Vírus da Poliedrose Nuclear) e o *Granulovirus* (GV ou Vírus da Granulose) (Volkman et al., 1995). Os corpos de oclusão dos NPVs se desenvolvem no núcleo da célula infectada, medem entre 0.15 e 15 micrômetros de diâmetro e contêm vários vírions (Blissard & Rohrmann, 1990; Volkman et al., 1995). Os nucleocapsídeos dos NPVs podem ser envelopados individualmente ou em grupos de dois ou mais nucleocapsídeos por envelope. Os corpos de oclusão dos GVs são, geralmente, menores que aqueles dos NPVs, medindo entre 0.3 e 0.5 micrômetros e contêm apenas um vírion (Blissard & Rohrmann, 1990; Volkman et al., 1995). Os baculovírus levam o nome da espécie da qual foram isolados, seguido do gênero ao qual o vírus pertence. Por exemplo, o NPV identificado em larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae) é denominado *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfNPV).

Baculovírus já foram isolados de mais de 600 espécies de artrópodes, sendo que a maioria dessas espécies pertence à Ordem Lepidóptera (Volkman et al., 1995).

O baculovírus mais intensamente investigado é *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV), a espécie-tipo dos baculovírus. O genoma deste vírus é constituído de uma molécula de DNA de aproximadamente 134Kbp, cuja seqüência de nucleotídeos já foi totalmente determinada (Ayres et al., 1994). Estudos com AcNPV demonstraram que a expressão dos genes virais ocorre em duas fases: a fase precoce, que antecede a replicação viral, e a fase tardia, que se inicia com a replicação viral. A fase precoce é subdividida em fase precoce imediata (immediate early phase) e fase precoce tardia (delayed early phase) (Blissard e Rohrmann, 1990; O'Reilly et al., 1994; Vialard et al., 1995). Na fase tardia, distinguem-se dois tipos de genes, os genes tardios *(late genes)* e os genes tardios hiperexpressos (hyperexpressed late genes). Os genes tardios hiperexpressos são fortemente expressos na fase final da infecção, quando ocorre o declínio na expressão deles e inicia-se a produção dos corpos de oclusão (Blissard & Rohrmann, 1990; O´Reilly et al., 1994). Nesta etapa da infecção, ocorre a síntese das proteínas poliedrina e p10. A proteína p10, de aproximadamente 10KDa, está associada a estruturas fibrosas encontradas no núcleo e no citoplasma de células infectadas (Rohrmann, 1992). Estudos sugerem que esta proteína está envolvida no processo de lise nuclear que resulta na liberação dos poliedros (Oers et al., 1993). A poliedrina é o principal componente do cristal protéico que forma o corpo de oclusão (Rohrmann, 1992). O gene da poliedrina já foi identificado e caracterizado em muitos baculovírus apresentando alto grau de conservação. O grau de homologia observado entre as poliedrinas que já foram caracterizadas tem sido utilizado para se deduzir a possível relação filogenética entre os baculovírus (Zanotto et al., 1993).

Ciclo da infeção *in vivo*

Uma característica notável dos baculovírus é exibir dois tipos de vírions durante seu ciclo infectivo. Embora esses dois tipos de vírions tenham o genoma idêntico, eles apresentam características distintas e têm funções específicas durante a infecção *in vivo*. O vírion que está envolvido pela matriz protéica que constitui o

corpo de oclusão é chamado de vírus ocluso (Ocluded Virus - OV) ou de vírus derivado do poliedro (Polyhedra Derived Virus - PDV). O outro fenótipo do vírion é chamado "budded virus" (BV), por ser formado pelo brotamento de nucleocapsídeos através da membrana plasmática da célula hospedeira. BVs e PDVs diferem em vários aspectos, tais como morfologia, estrutura, antigenicidade, infectividade e no mecanismo de entrada em células (Blissard & Rohrmann, 1990; Volkman & Keddie, 1990). De grande relevância ao processo infectivo é a diferença em infectividade apresentada pelos dois tipos de vírions. Estudos demonstraram que os PDVs são muito mais infectivos que os BVs quando administrados a lagartas por via oral (Keddie & Volkman, 1985). Por outro lado, BVs são mais infectivos que PDVs quando injetados na hemocele de lagartas e quando utilizados para infectar células em cultura (Volkman & Summers, 1977; Keddie & Volkman, 1985).

Na natureza, a infecção por baculovírus geralmente inicia-se quando uma lagarta susceptível ingere poliedros junto ao seu alimento. A condição alcalina do intestino médio da lagarta causa a dissolução dos poliedros e, conseqüentemente, a liberação das partículas virais do tipo PDV. Essas partículas atravessam a membrana peritrófica e entram em contato com as células epiteliais que revestem o intestino da lagarta. A entrada do vírus nestas células ocorre pelo processo de fusão mediada por receptor (Horton & Burand, 1993). Uma vez no citoplasma, os nucleocapsídeos desprovidos de membrana são levados até o núcleo da célula onde se inicia a expressão dos genes virais e onde ocorrerá a replicação do seu genoma. Após a replicação, as novas cópias do genoma viral são encapsuladas no núcleo, dando origem aos novos nucleocapsídeos. Estes migram para o citoplasma e deixam a célula por brotamento. Neste processo, os nucleocapsídeos são envelopados ao adquirirem a membrana plasmática da célula hospedeira. Esta membrana está revestida de uma glicoproteína de origem viral denominada gp67 (Whitford et al., 1989). Os vírions resultantes são do tipo BV e constituem o principal produto da primeira etapa do processo de infecção da lagarta, a infecção primária. Os BVs são levados até outros tecidos da larva pelo sistema traqueal (Engelhard et al., 1994) penetram nas células por endocitose (Volkman & Goldsmith, 1985). Dessa forma inicia-se a infecção secundária durante a qual os dois tipos de vírions, BVs e PDVs, são produzidos. Os nucleocapsídeos que formam os

PDVs são envelopados *de novo* no núcleo e envolvidos pelo cristal protéico do corpo de oclusão. Os PDVs servirão para promover uma nova infecção quando os poliedros forem ingeridos por uma lagarta susceptível.

O período de sobrevida e a quantidade de alimento ingerido após a infecção por baculovírus variam bastante e dependem de vários fatores, tais como a virulência do vírus, a quantidade de poliedros ingeridos e a fase de desenvolvimento da larva. Na fase final da infecção, verificam-se mudanças na coloração das larvas, que tornam-se cor de creme, e na consistência do tegumento, que se torna frágil. A ruptura do tegumento causa a liberação dos poliedros que, desta forma, estarão disponíveis para infectarem outras larvas. Em geral, bilhões de poliedros são produzidos por lagarta infectada.

Uso de baculovírus como bioinseticida

A capacidade dos baculovírus de controlar populações de insetos propiciou seu emprego como bioinseticida para pragas agrícolas, florestais e de pastagens (Huber, 1986; Moscardi, 1989; Moscardi, 1999). Devido à alta especificidade de hospedeiros apresentada pelos baculovírus, esse método de controle de pragas oferece o benefício de ser seguro para o meio ambiente e para o trabalhador rural. Durante a década de 70, os primeiros bioinseticidas a base de baculovírus foram registrados (Huber, 1986), dentre os quais destacou-se o Elcar™, registrado em 1975 nos Estados Unidos pela empresa Sandoz. Esse produto foi utilizado no controle de várias pragas do gênero *Helicoverpa* e *Heliotis*, que atacam soja, milho, tomate e outras culturas. Apesar dos bons resultados alcançados entre 1975 e 1981, a introdução de inseticidas a base de piretróides provocou grande queda na demanda do Elcar™, resultando na desativação de sua produção em 1982. Atualmente, produtos a base de baculovírus continuam sendo utilizados e desenvolvidos em vários países do mundo (Cunningham, 1995; Moscardi, 1999).

No Brasil, temos um dos mais importantes programas mundiais de controle de pragas com baculovírus. Trata-se da utilização do baculovírus *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgNPV) no controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Moscardi, 1989; Moscardi, 1999). Formulações à base de AgNPV são comercializadas

por várias empresas e aplicadas em mais de 1,2 milhões de hectares de soja (Moscardi, 1999). O vírus da granulose de *Erinnyis ello* (ErGV) é utilizado no controle do mandarová da mandioca em cerca de 8 mil hectares na região Sul e em plantações comerciais de mandioca no Nordeste (Schimitt, 1985; Moscardi, 1999). O baculovírus que infecta a lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, também apresenta potencial de ser utilizado como método de controle desta importante praga agrícola (Valicente & Cruz, 1991). Vários outros insetos-praga existentes no Brasil são susceptíveis a viroses causadas por baculovírus (Alves, 1986; Kitajima, 1989).

Uma importante limitação à maior aplicação dos baculovírus no controle de pragas é seu modo de ação lento. Larvas infectadas por baculovírus continuam vivas e alimentando-se por pelo menos 2 a 4 dias após a ingestão dos poliedros (Moscardi, 1999). Desta forma, danos acentuados podem ocorrer após a aplicação do bioinseticida. Por essa razão, diversas estratégias estão sendo investigadas a fim de se aumentar a eficiência do baculovírus no controle de pragas. Entre essas, a modificação do genoma viral pela técnica do DNA recombinante é uma possibilidade que apresenta grande potencial.

A construção de baculovírus geneticamente modificados

Os avanços nas técnicas de biotecnologia molecular e o maior conhecimento a respeito dos baculovírus permitiu a modificação genética desses vírus. Inicialmente, as técnicas de engenharia genética foram aplicadas na construção de baculovírus recombinantes que atuassem como vetores de expressão de proteínas heterólogas. Durante a última década, entretanto, alterações genéticas foram realizadas em baculovírus, visando a melhorar sua eficiência como bioinseticida, de modo a permitir a redução nos danos causados pela praga-alvo após a ingestão do vírus.

Trabalhos de engenharia genética de baculovírus envolvem duas etapas: a primeira é a construção de um vetor de transferência, um plasmídeo bacteriano que contém seqüências de DNA do baculovírus, flanqueando o gene que será transferido para o genoma viral. Este gene deverá estar sob o controle transcricional de um promotor que seja efetivo em células de insetos, e a região de origem viral que flanqueia

o gene de interesse não pode ser essencial para o crescimento do vírus em cultura de células. O vetor de transferência é amplificado em células de bactérias e seu DNA é extraído e purificado para a próxima etapa do trabalho; a segunda etapa consiste na transferência do DNA do vetor e do DNA de origem viral para o interior de células de inseto em cultura, um processo denominado cotransfecção. Após a introdução deste material nas células, o processo de recombinação homóloga ocorre entre as seqüências de origem viral que flanqueiam o gene exógeno no vetor de transferência e a mesma seqüência presente no genoma do vírus. Em conseqüência desta recombinação, uma pequena proporção das moléculas de DNA viral adquirem o gene exógeno, que, nestas moléculas, é inserido no locus das seqüências flanqueadoras. Desta forma, o local onde o gene inserido estará localizado no genoma do baculovírus é previamente determinado pela escolha das seqüência do vírus que serão utilizadas no vetor.

Os trabalhos iniciais de engenharia genética de baculovírus utilizaram o gene da poliedrina para promover a recombinação homóloga, resultando na sua inativação (Smith et al., 1983a e 1983b; Summers & Smith, 1987). Quando seqüências do gene da poliedrina flanqueiam o gene heterólogo no vetor de transferência, o vírus recombinante pode ser identificado em ensaios de placa pela ausência do corpo de oclusão. Como os poliedros não são necessários à replicação do vírus em cultura de células, a substituição do gene da poliedrina por seqüências heterólogas não interfere na multiplicação do vírus *in vitro*. Por outro lado, a oclusão dos vírus em poliedros é fundamental no processo de infecção *in vivo*. Por esse motivo, estratégias que conservem o gene da poliedrina devem ser utilizadas na construção de BGMs para o controle de pragas. A seguir, algumas estratégias utilizadas na construção de BGMs serão descritas.

Construção de baculovírus geneticamente modificados (BGM) através da remoção do gene *egt*

Os baculovírus possuem uma enzima, chamada ecdisteroide UDP-glicosil transferase (*egt*), que catalisa a transferência de um resíduo de glicose de UDP-glicosil para o hormônio ecdisônio, inibindo a sua ação e fazendo com que a larva não mude de estágio de desenvolvimento (O'Reilly & Miller, 1989; Park et al., 1996).

Como durante a muda o inseto pára de se alimentar, a inativação do ecdisônio faz com que a larva infectada pelo baculovírus permaneça em fase de alimentação e, conseqüentemente, continue causando danos à planta hospedeira por um período prolongado.

Como o gene *egt* prolonga a fase de alimentação da larva, a sua remoção do genoma viral pode resultar em um vírus recombinante mais efetivo no controle de pragas. De fato, este aumento de efetividade tem sido observado em ensaios com o vírus vEGTDEL, um AcNPV recombinante que teve o gene *egt* removido. Ensaios com larvas de *Spodoptera frugiperda* mostraram que estas consomem 40% mais alimento quando infectadas com vírus selvagem do que quando infectadas com vEGTDEL (O'Reilly & Miller, 1991). Da mesma forma, ensaios realizados com larvas de *Heliothis virescens* demonstraram que a aplicação foliar de vEGTDEL promoveu maior proteção aos botões de flor de algodão que a aplicação de AcNPV (Treacy & Ghidiu, 1997). Entretanto, nem sempre vEGTDEL tem se mostrado mais eficiente no controle de pragas que o vírus selvagem. No caso de *Tricoplusia ni*, por exemplo, não foram observadas diferenças nos danos causados por lagartas infectadas por AcNPV ou por vEGTDEL (Treacy & Ghidiu, 1997).

No Brasil, estudos com vEGTDEL foram realizados visando a avaliar o efeito da adição de adjuvantes, do período de armazenamento e outros fatores sobre a atividade do vírus (José, 1998). Entre os vários resultados obtidos pelo pesquisador, foi demonstrado que a adição do adjuvante Coax (CCT Corporation), um produto fagoestimulante que também atua como protetor solar, aumentou a efetividade deste baculovírus no controle de *Heliothis virescens* (José, 1998).

Genes homólogos ao *egt* de AcNPV foram identificados no genoma de outros baculovírus do gênero *Nucleopolyhedrovirus* e do gênero *Granulovirus* (Barret et al., 1995; Faktor et al., 1995; Clarke et al., 1996; Hu et al., 1997). A remoção do *egt* de alguns desses vírus está sendo realizada em vários laboratórios de baculovirologia. No Brasil, por exemplo, o gene *egt* de *Anticarsia gemmatalis* NPV foi identificado e um recombinante no qual esse gene será removido está sendo construído (Ribeiro, 1998).

A remoção do gene *egt* é um procedimento que causa poucas preocupações quanto aos riscos ambientais. Além de não envolver a inserção de genes heterólogos, a inativação de um gene viral pode ocorrer na natureza como resultado de mutações. Outro fator positivo em termos de segurança resulta da improbabilidade de que baculovírus com o gene *egt* removido apresentem mudanças na sua especificidade de hospedeiros. Finalmente, o fato de AcNPV selvagens produzirem até 30% mais poliedros em lagartas infectadas que o vEGTDEL (O´Reilly & Miller, 1991) sugere que este último seria menos competitivo no meio ambiente.

Expressão de toxinas de artrópodes

Genes de toxinas de artrópodes, cuja ação é específica para insetos, têm sido utilizados na construção de BGMs com a finalidade de torná-los mais eficazes no controle de pragas. O primeiro utilizado para este fim foi o gene da toxina do escorpião *Buthus eupeu* (Bonning e Hammock, 1996). Entretanto, a expressão dessa toxina não contribuiu para o aumento da virulência do vírus recombinante. Por outro lado, resultados positivos foram obtidos com o gene da toxina AalT, uma toxina isolada do escorpião Norte Africano *Androctus australis* (Stewart et al., 1991; Bonning & Hammock, 1996).

Vários baculovírus recombinantes já foram construídos com o gene que codifica AalT. O recombinante AcST-3, por exemplo, é um AcNPV modificado que expressa AalT sob o controle transcricional do promotor do gene viral p10. Como neste recombinante o gene da poliedrina não é removido, os poliedros são produzidos nas lagartas infectadas ou em cultura de células. Ensaios biológicos utilizando o vírus recombinante e o vírus selvagem foram realizados com larvas de *Tricoplusia ni* (Stewart et al., 1991). Os resultados deste estudo mostraram que larvas infectadas com o vírus AcST-3 consumiram até 50% menos alimento que larvas infectadas com o vírus selvagem (Stewart et al., 1991).

Testes de campo foram realizados para se avaliar a efetividade do vírus selvagem e de AcST-3 em cultura de repolho infectadas com alta concentração de larvas de *Tricoplusia ni* no terceiro instar (Cory et al., 1994). Nestes ensaios foi observada uma redução de até 29% nos danos causados por larvas tratadas com

AcST-3, comparado-se aos danos causados por larvas tratadas com o vírus selvagem (Cory et al., 1994). Esta redução em danos decorreu da paralisia e morte precoce induzida pelo vírus recombinante (Cory et al., 1994). Outros trabalhos mostraram que a expressão de AalT em AcNPV resulta em aumento da eficácia do baculovírus no controle de lagartas de *Heliothes virescens* em soja e em algodão (McCutchen et al., 1996).

Várias outras modificações no genoma viral foram realizadas visando à construção de BGMs que apresentem maior eficácia no controle de pragas. Dentre elas, destacamos a expressão de componentes do sistema endócrino do inseto (Maeda, 1989; Bonning et al., 1999), a expressão de proteínas de plantas (Korthie & Levings, 1993) e a expressão de genes no sentido anti-senso (Lee et al., 1997). Um sumário dos resultados de bioensaios realizados com BGMs foi apresentado recentemente por Beek & Hughes (1998).

Riscos ambientais

Estudos exaustivos realizados com o baculovírus selvagem demonstram a ausência de danos a espécies não-alvo (ver revisão de Groner, 1986). Além disso, o uso prolongado de alguns baculovírus no controle de pragas sem a ocorrência de efeitos adversos ao ambiente ou à saúde pública, atesta que este é um método seguro de controle de pragas. Por outro lado, modificações genéticas, principalmente a inserção de genes exógenos, oferecem novos riscos que deverão ser cuidadosamente avaliados. Desta forma, além da eficácia no controle da praga, os possíveis efeitos ambientais decorrentes da utilização de BGMs são fatores fundamentais que determinarão a aceitação desses produtos.

Duas importantes áreas para a avaliação do impacto ambiental dos BGMs são a identificação de espécies e populações expostas direta ou indiretamente ao BGM e a avaliação da susceptibilidade dessas populações (Richards et al., 1998). No caso do recombinante AcST-3, estudos já foram realizados pare se avaliar a possibilidade de que este BGM cause danos a duas espécies benéficas, *Chysoperla carnea* e *Orius insidiosus* (Heinz et al., 1995). Neste trabalho, larvas de *Chysoperla carnea* e *Orius insidiosus*, duas espécies predadoras, foram submetidas a três

tratamentos: 1) alimentadas com lagartas de *Heliothis virescens* não infectadas com baculovírus; 2) alimentadas com lagartas de *H. virescens* infectadas com o AcNPV selvagem; 3) alimentadas com lagartas de *H. virescens* infectadas com AcST-3. Os resultados desse estudo mostraram que o tempo de desenvolvimento das larvas de *C. carnea* foi menor quando alimentadas com *H. virescens* infectada com o vírus. Contudo, o tempo de desenvolvimento observado nos dois tratamentos com vírus, com o tipo selvagem e com o vírus recombinante, foi semelhante (Heinz et al., 1995). Além disso, a porcentagem de sobrevivência das larvas adultas não foi diferente nos três tratamentos. Essas observações levaram os autores a concluir que o vírus recombinante não causou efeitos adversos nestas espécies (Heinz et al., 1995).

Em outro estudo, o efeito de um baculovírus recombinante foi avaliado em *Microplitis croceipes*, um endoparasitóide de *Heliothis virescens* (McCutchen et al., 1996). Neste trabalho, foi observado que as larvas do parasitóide emergiram precocemente e com menor tamanho em lagartas de *H. virescens* infectadas com o vírus recombinante. Os resultados sugerem que, neste caso, o BGM interferiu negativamente no desenvolvimento do endoparasitóide. Um modelo para a avaliação do impacto ambiental dos BGMs foi recentemente apresentado por Richards et al. (1998).

Marcadores moleculares de DNA

Finalizando o presente capítulo, embora não se tratando de uma manipulação genética propriamente dita, é importante destacar o papel dos marcadores moleculares, envolvendo o DNA, no controle biológico. Possivelmente este seja um dos mais importantes avanços ocorridos no século que ora se finda, para caracterização de seres vivos, pois tal conjunto de técnicas moleculares permite essa caracterização pela análise direta do seu material genético. Este procedimento supera com vantagens a utilização de marcadores do tipo isozimas, cujos resultados são alterados pela idade, condições do ambiente ou tipo de estrutura do indivíduo do qual as isozimas foram extraídas. Como mencionado, técnicas envolvendo marcadores moleculares não alteram o DNA, mas utilizam este DNA diretamente extraído de indivíduos, amostras, linhagens, variedades ou espécies para caracterizá-lo e distingui-lo de outros. Prevê-

se até que, na própria espécie humana, o sistema de impressões digitais venha a ser substituído por uma análise direta do DNA de tal forma que cada indivíduo terá sua caracterização do tipo "código de barras".

A revisão de Fungaro & Carneiro-Vieira (1998) sobre os fundamentos e usos de marcadores moleculares em microrganismos pode ser consultada para maiores detalhes sobre o assunto. Técnicas como as de RFLP (Restriction Fragments Lenght Polymorphism) ou as baseadas em amplificação do DNA por DNA polimerases termoresistentes ou PCR (Polymerase Chain Reaction), com variantes designadas por siglas como RAPD, AFLP e outras, podem ser usadas no controle biológico de diferentes formas, como por exemplo:

A) Mapeamento genético de microrganismos utilizados em controle biológico - Neste caso, a técnica se presta bem para fornecer mapas genéticos que podem ser mais rapidamente obtidos e mais completos que os mapas clássicos baseados em mutações do tipo auxotrofia, alterações morfológicas ou resistência a agentes inibidores;

B) Detecção de regiões cromossômicas contendo agrupamentos de genes para características quantitativas - São os chamados QTL (Quantitative Trait Loci), em geral os mais importantes para o melhoramento genético;

C) Distinção entre indivíduos, amostras, linhagens, espécies, gêneros etc. - Neste particular, as técnicas envolvendo marcadores moleculares são extremamente poderosas e permitem, dentro de uma população, avaliar a variabilidade genética existente, ou então aquilatar diferenças entre raças, variedades ou espécies;

D) Monitoramento de cruzamentos em programas de melhoramento genético - Uma vez que essas técnicas permitem aquilatar o grau de diversidade entre linhagens de uma mesma espécie, elas permitem também a escolha dos indivíduos mais ou menos divergentes, conforme o caso, para cruzamentos dirigidos a determinadas finalidades. Então, em lugar de cruzarem-se indivíduos de linhagens de fungos ou de bactérias aleatoriamente, a técnica torna um programa de melhoramento muito mais racional e, portanto, menos empírico;

E) Os marcadores moleculares podem ser utilizados para reconhecimento de linhagens de microrganismos usados no controle biológico, quando aplicados no campo - Nesses caso a distinção entre o que foi aplicado e as linhagens selvagens lá existentes, pode

ser feita. O processo é muito importante para a avaliação de novas linhagens modificadas aplicadas em determinada área e verificação de sua eficiência em controle biológico, comparada com linhagens previamente existentes nesta área de aplicação; F) Em pendências de propriedade industrial ou questões forenses, marcadores moleculares bem estabelecidos podem permitir distinção entre linhagens, o que auxilia o patenteamento e a verificação de fraudes em produtos utilizados no controle biológico.

Essas são apenas umas poucas indicações de uso de marcadores moleculares. A área está bastante ativa e é de se esperar que avanços venham a ocorrer seguidamente. Finalmente, resta mencionar aqui outra técnica extremamente importante na Biotecnologia em geral e no controle biológico em particular. Trata-se da eletroforese em campo pulsado, que permite a separação de cromossomos, principalmente fungos filamentosos e leveduras. Essa técnica, muito bem descrita na revisão de Pizzirani-Kleiner & Muhlen (1998) pode ser utilizada para distinção de espécies, variedades ou linhagens por meio de seu número e tamanho dos cromossomos. Por exemplo, no fungo entomopatogênico *M. anisopliae* foi verificado que há distinções bastante acentuadas em relação aos cromossomos de diferentes linhagens classificadas como de mesma espécie e largamente usada no controle biológico. Possivelmente essa análise poderia ser a base de uma classificação taxonômica mais apropriada dentro da espécie. Como no caso dos marcadores moleculares, a técnica também permite os mesmos procedimentos indicados de A até F, acima citados.

Considerações finais

Estamos apenas no início da era dos seres transgênicos. Em plantas cultivadas, o impacto já se faz sentir e milhões de hectares já são plantados em todo o mundo com transgênicos. Em microrganismos utilizados no controle biológico, há ainda um enorme caminho a ser percorrido. Aspectos como melhoria do sistema de produção em laboratório, resistência a determinados inibidores, adição de marcadores apropriados e outros são simples, quando comparados à aplicação efetiva de um microrganismo geneticamente modificado aplicado em grandes áreas e convivendo com outros fatores bióticos e abióticos. Estes problemas deverão aos poucos ser

solucionados e no próximo milênio é de se esperar que produtos derivados da moderna biotecnologia de uso no controle microbiológico venham a se tornar mais freqüentes, contribuindo para a redução da utilização de agroquímicos e, conseqüentemente, para o bem estar da humanidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.B. Vírus entomopatogênicos. Em: ALVES, S.B., ed. **Controle microbiano de insetos**. Editora Manole, São Paulo, Brasil, p. 171-187, 1986

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos.** Piracicaba, Editora da Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2ª Edição, 1998

AYREES, M.D.; HOWARD, S.C.; KUZIO, J.; LOPEZ-FERBER, R.M.; POSSEE, R.D. The complete DNA sequence of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v. 202, p. 586-605, 1994.

AZEVEDO, J.L. Controle microbiano de insetos-praga e seu melhoramento genetico. In : MELO, I.S. AZEVEDO, J.L. (Coords.) **Controle Biológico** I. Jaguariuna, Editora EMBRAPA, 1998a p.69-96.

AZEVEDO, J.L. Engenharia genética aplicada ao controle microbiano de insetos.In: ALVES, S.B.(Coord.) **Controle microbiano de insetos** Piracicaba, Editora da Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998b, p.239-267.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S. AZEVEDO, J.L. (Coords.) Ecologia microbiana. Jaguariuna, Editora EMBRAPA, 1998c, p.117-138.

BARRET, J.W., KRELLI, P.J.; ARIF, B.M. Characterization, sequencing and phylogeny of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene from two distinct nuclear polyhedrosis viruses from *Choristoneura fumiferana*. **Journal of General Virology**., v. 76, p. 2447-2456, 1995

BARRETO, C.C.;PINTO JR., H., PINTO, A.S., AUGUSTIN, C., VARGAS, E.V., ULHOA, C., VAINSTEIN, M.H., SCHRANK, A. Clonagem do gene da quitinase em *Metarhizium anisopliae*. IN: ANAIS DA XX REUNIAO ANUAL DE GENETICA DE MICRORGANISMOS, Piracicaba, Resumos v.20, p131, 1995.

BEEK, N.M. and Hughes, P.R. The response time of insect larvae infected with recombinant baculoviruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 338-347, 1998.

BLISSARD, G.W. & ROHRMANN G.F., Baculovirus diversity and molecular biology. **Annual Review of Entomology**, v. 5, p. 127-155, 1990.

BOGO, M.R.; VAINSTEIN, M.H.; ARAGÃO, F.J.L.; RECH, E.; SCHRANK, A. High frequency of gene conversion and benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v.142, p.123-127, 1996.

BONNING, B.C.& HAMMOCK, B.D. Development of recombinant baculoviruses for insect control. **Annual Review of Entomology**, v. 41, p. 191-210, 1996

BONNING, B.C.; POSSEE, R.D.; HAMMOCK, B.D. Insecticidal efficacy of a recombinant baculovirus expressing JHE-KK, a modified juvenile hormone esterase. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, p. 234-236, 1999.

CLARKE, E.E.; TRISTEM, M.; CORY, J.S.; O'REILLY, D. Characterization of the ecdysteroid UDP- glucosyltransferase gene from Mamestra brassicae nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 2865-2871, 1996

CHET, I.; BARAK, Z.; OPPENHEIM, A. Genetic engineering of microorganisms for improved biocontrol activity. Biotechnology and plant disease control p.211-235, 1993.

CORY, J.S.; HIRST, M.L.; WILLIAMS, T.; HAILS, RS; et al., Field trials of a genetically improved baculovirus insecticide. **Nature**, v. 370, p. 138-140, 1994.

CUNNINGHAM, J.C. Baculoviruses as microbial pesticides. In: REUVENI,R. ed., **Novel Approaches to Integrated Pest Management**, Boca Raton, Florida, p. 261-292. 1995.

ENGELHAARD, E.K.; HAM-MORGAN, L.N.W.; WASHBUM, J.; VOLKMAN, L.E. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 91, p. 3224-3227, 1994.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A. NYE, G. J.; CRAIG, J. A. *VipA3*, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proccedings of the National Academy of Sciences**, USA. V.93, p.5389-5394, 1996.

FAKTOR, O.; TOISTER-ACHITUY, M.; KAMENSKY, B.; Identification and nucleotide sequence of an ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of *Spodoptera littoralis* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. **Virus Genes**, v. 11, p. 47-52, 1995.

FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO VIEIRA, M.L. Aplicação da PCR em Ecologia Microbiana. In MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. (Coords.) **Ecologia microbiana**, Jaguariuna, Editora EMBRAPA, 1998, p.205-226.

GELERNTEL, W.; SCHWAB, G.E. Transgenic bacteria, virus, algae and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* to delivery systems. In ENWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S. (Edts.) *Bacillus thuringiensis* an environmental

biopesticide: Theory and practice. West Sussex, John Wiley & Sons, 1993, p.89-104.

GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A.; **The Biology of Baculovirus**. CRC Press. Boca Raton, Florida, 1986.

GRONER, A. Specificity and Safety of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R. & FREDERICI, R.R., ed. **The Biology of Baculoviruses**, CRC Press, Boca Raton, Florida, vol. I p. 117-202, 1986.

HEGEDUS, D.D.,;PFEIFER,T.A.; MAC PHERSON, J.M; KHACHATOURIANS, G.G. Cloning and analysis of five mithocondrial tRNA encoding genes from the fungus *Beauveria bassiana*, **Gene** v.109, p.149-154, 1991.

HEINZ, K.M.;, KM, McCutchen, MC, HERRMANN, R.; R, Parrella MP and Hammock BD Direct effects of nuclear polyhedrosis virus on selected nontarget organisms. **Journal of Economic Entomology**, v. 88, n. 2, p. 259-264, 1995.

HORTON, H.M. & BURAND, J.P. Saturable attachment sites for polyhedron derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **Journal of Virology**. 67, 1860-1868, 1993.

HU, Z.H.; BROER, R.; VLAK, J.M. et al., Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of a single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus of *Buzura suppressaria*. **Virus Research**, v. 47, p. 91-97, 1997.

HUBER, J. Use of baculoviruses in pest management. In: GRANADOS, R.R. & FREDERICI, R.R., ed., **The Biology of Baculoviruses**, CRC Press, Boca Raton, Florida, vol. II, p. 181-202, 1986

JOSÉ, L. A. Atividade do baculovirus de *Autographa californica* (Speyer) - vEGTDEL sobre *Heliothis virescens* (F.) tese (doutorado) ESALQ, USP, Piracicaba, SP, 1998

KEDDIE, B.A. & VOLKMAN, L.E., Infectivity difference between the two phenotypes of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: importance of the 64K envelope glycoprotein. **Journal of General Virology**, v. 66, p. 1195-2000, 1985

KITAJIMA, E.W. Classification, identification and characterization of insect viruses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p.9-15, 1989.

KORTH, K.L. & LEVINGS, C.S. Baculovirus expression of the maize mitochondrial protein URF 13 confers insecticidal activity in cell cultures and larvae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 90, p. 3388-3392, 1993

LEE, S.Y.; QU, X.; CHEN, W.; KRAUSSE, M. Insecticidal activity of a recombinant baculovirus containing n a antisense c-myc fragment. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 273-281, 1997.

MAEDA, S.; Increased insecticidal effect of a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v. 165, p. 1177-1183, 1989

MCCLUTCHEN, B.F.; HERRMANN, R.; HEINZ, K.M.; PARRELLA, M.P. & HAMMOCK, B.D. Effects of recombinant baculoviruses on a nontarget endoparasitoid of *Heliothis virescens*. **BioControl**, v. 6 n. 1, p. 45-50, 1996. MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico I**. Jaguariuna, Editora EMBRAPA, 1998.

MOSCARDI, F.; Use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, Supl. III, p. 51-56, 1989

MOSCARDI, F.; Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v.44, p. 257-289, 1999

OERS, M.M.; FLIPSEN, J.T.M.; REUSKEN, C.B.E.; SLIVINSKY, E.L.; GOLDBACH, R.W. & VLAK, J.M. Functional domains of the p10 protein of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 563-574, 1993

O'REILLY, D.R.;, DR and MILLER, L.K.;, LK Baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. **Science**, v. 245(8). p. 1110-1112, 1989

O'REILLY, D.R.;, DR and MILLER, L.K.;, LK. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the *egt* gene. **Biotechnology**, v. 9, p. 1086-1089, 1991

O'REILLY, D.R.;, DR, MILLER, L.K.;, LK; LUCKNOW, V.A. **Baculovirus Expression Vectors: a Laboratory Manual**. Oxford University Press, Oxford, UK, 1994

PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Genética e Melhoramento de fungos agentes de controle biológico. In MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Coords.) **Controle Biológico I**. Jaguariuna, editora EMBRAPA, 1998, p.172-199.

PARK, E.J.; CHIH-MING, Y. & BURAND, J.P. Baculovirus replication alters hormone-regulated host development. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 547-554, 1996

PFEIFER, T.A.; KHATCHATOURIAN, G.G. *Beauveria bassiana* protoplast regeneration and transformation using electroporation. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.38, p.376-381, 1992.

PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; MUHLEN, G.S. Aplicação da técnica de eletroforese em campo pulsado para separação de cromossomos de microrganismos. In : MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Coords.) **Ecologia Microbiana**, Jaguariuna, Editora EMBRAPA, p.229-252, 1998.

RIBEIRO, B.M. Estudos in vitro e in vivo do processo de infecção de baculovírus anticarsia. **Anais do VI SICONBIOL**, p. 415-429, 1998

RICHARDS, A.; MATTHEWS, M., & CHRISTIAN, P. Ecological considerations for the environmental impact evaluation or recombinant baculovirus insecticides. **Annual Review of Entomology** Entomol., v. 43, p. 493-517, 1998.

ROHRMANN, G.F. Baculovirus structural proteins. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 749-761, 1992.

SANCHIS, V; GOHAR, M.; CHAUFAUX, J.; ARANTES, O.; MEIER, A.; AGAISSE, H.; CAYLEY, J.; LERECLUS, D. Development and field performance of a broad-spectrum nonviable asporogenic recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* with a greater potency and UV resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4032-4039, 1999.

SCHIMITT, A.T. Eficiência da aplicação de baculovírus erinnyis no controle do mandarová da mandioca. **Comunicção Técnica 88, Empasc**, Itajaí, SC, p. 7, 1985.

SCREEN, S.S.; ST. LEGER, R.J. Factors affecting pathogenicity of *Metarhizium anisopliae*. **Fungal Genetics Newsletter**, v.46 (suppl,) p.116, 1999a.

SCREEN, S.S.; ST. LEGER, R. J. EST analysis of the enthomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Fungal Genetics Newsletter**, v. 46 (suppl.) p.143, 1999b

SMITH, G.E., FRASER, M.J. & SUMMERS, M.D. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. **Journal of Virology** 46; p. 584-593, 1983a

SMITH, G.E.; SUMMERS, M.D. & FRASER, M.J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. **Molecular and Celular Biology**, v.3, p. 2156-2165, 1983b

ST. LEGER, R.J.; FRANK, D.C.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. Molecular cloning and regulation analysis of the cuticle-degrading protease structural gene for the enthomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **European Journal of Biochemistry**, v.204, p.991-1001, 1992.

ST. LEGER, R.J.; JOSH, L. BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proceedings of the National Acadamy of Sciernces USA** v.93, p. 6349-6354, 1996.

STEWART, L.M ; HIRST, M.; FERVER, M.L.; MERRYWEATHER, A.T.; CA7YLEY, P.J.; POSSEE, R.D. Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. **Nature**, v. 352, p. 85-88, 1991

SUMMERS, M.D. & SMITH, G.E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. **Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555**, 1987.

TABASHNIK, B. E.; LIU, Y. B.; FINSON, N.; MASSON, L.; HECKEL, D. G. One gene in diamondblack moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**., v.94, p. 1640-1644, 1997.

TREACY, M.F. & GHIDIU, G.M. Effect of ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene deletion on efficacy of a baculovirus against *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 90(5), p. 1207-1214, 1997.

VALADARES, M.C.C.; PEBERDY, J.F. Clonagem do gene da quitinaseem *Metarhizium anisopliae*. Piracicaba. **ANAIS** DA XX REUNIÀO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS (Resumos) v.20, p.207, 1995.

VALADARES-INGLIS, M.C.C.; SHILER, W.; DE SOUZA, M.M. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. (Coords.) **Controle Biológico I**. Jaguariuna, Editora EMBRAPA, p.202-230, 1998.

VALICENTE, F.H. & CRUZ, I. Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus. **Circular Técnica** Número 15, EMBRAPA/CNPMS, 1991.

VIALARD, J.E., ARIF, B.M., RICHARDSON, C.D. Introduction to the Molecular Biology of Baculoviruses In: RICHARDSON, C.D., ed. **Baculovirus Expression Protocols**, Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, 1995.

WILLIAMS, W.P.; SAGERS, J. B.; HANTEN, J. A.; DAVIS, F. M.; BUCKLEY, P. M. Transgenic corn evaluated for resistance to fall armyworm and southwestern corn borer. **Crop Science** v. 37, p. 957-962, 1997.

VOLKMAN, L.E.; BLISSARD, G.W.; FRIENSEN, P.D.; POSSEE, R.D.; THEILMANN, D.A. *Baculoviridae*. In: MURPHY, F.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; JARVIS, A.W.; MARTELLY, G.: MAYO, E.; & SUMMERS, M.D., eds Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. **Archives of Virology Suppl**. 10, p. 104-113, 1995

VOLKMAN, L.E.; and GOLDSMITH, P.A. Mechanism of neutralization of budded Autographa californica nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: inhibition of entry by a absorptive endocytosis. **Virology**, v. 143, p. 185-195, 1985

VOLKMAN, L.E., and KEDDIE, B.A. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. **Seminars in Virology**, v.1, p 249-256, 1990

VOLKMAN, L.E. & SUMMERS, M.D. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: comparative infectrivity of the occluded, alkali-liberated and nonoccluded forms. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 30, p. 102-103, 1997

ZANOTTO, P.M.A.; KESSING, B.D.; MARUNIAK, J.E. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, p. 147-164, 1993.

WHITFORD, M.; STEWARD, S.; KUZIO, J.; FAUKNER, P. Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, na abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, v. 63, 1393-1399, 1989

11

ANÁLISE DE RISCO E IMPACTO AMBIENTAL DO USO DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

Deise M. F. Capalbo
Elizabeth A. B. De Nardo

INTRODUÇÃO

Os agentes microbianos para o controle de pragas são organismos que estão presentes no ambiente e que, geralmente, são muito mais seletivos que os pesticidas químicos. Entretanto, apesar da segurança esperada, eles também apresentam propriedades que podem causar danos ambientais e à saúde humana. Por serem organismos vivos, apresentam o potencial de persistir, multiplicar e disseminar no ambiente e de infectar e causar doenças em outros organismos. Esta habilidade do agente microbiano de controle (AMC) de infectar outros hospedeiros além da praga-alvo é o assunto mais importante relacionado à segurança de uso de microrganismos como agentes de controle biológico.

A adoção de um AMC implica a possibilidade de sua ampla distribuição ambiental e, conseqüentemente, a exposição de outros organismos não-alvo, além da própria praga que se deseja controlar. Mesmo que o AMC seja de ocorrência natural na região de utilização do produto, ele possivelmente estará disponível durante a aplicação de forma numérica, espacial e temporal diferente da usual, surgindo daí a necessidade de uma avaliação do risco do uso desses agentes. A análise dos riscos envolvidos no uso de AMC é também necessária nos casos de organismos geneticamente modificados (OGMs) para uso em campo.

Para se estimar o risco da liberação de qualquer AMC no ambiente, é importante conhecer a forma como ele interage com o meio ao seu redor, incluindo outros organismos presentes (Meadows, 1993). Já se conhecem muitas das características de segurança de grande parte dos agentes microbianos de controle (AMCs), no que se refere às suas possíveis interferências na saúde humana. Existem, entretanto, poucas informações sobre suas interferências com outros componentes do ambiente.

A avaliação de risco do uso de AMCs é um assunto novo para o Brasil, uma vez que só recentemente a primeira regulamentação específica para o registro desses produtos foi aprovada no país (Brasil 1997), havendo carência de pesquisas e necessidade de capacitação de recursos humanos nessa área. Aos órgãos de regulamentação cabe avaliar o risco do AMC, anteriormente ao seu uso comercial, como também regulamentar critérios e testes necessários para a avaliação desses organismos (Nardo et al.,1998)

Esse capítulo discute o processo de avaliação e análise de risco ambiental, os testes ecotoxicológicos, o sistema de avaliação em fases e, finalmente, apresenta algumas considerações sobre organismos indicadores.

AGENTES MICROBIANOS E O AMBIENTE

A evolução dos estudos de controle biológico no Brasil tem permitido o uso de vários agentes de controle (parasitóides, predadores, patógenos e antagonistas) em laboratório e na propriedade agrícola, conforme apresentado em Nardo & Capalbo (1998). A necessidade de realizar a adequada avaliação de possíveis efeitos colaterais decorrentes do uso desses agentes tem sido discutida em fóruns nacionais e internacionais (Entwistle, 1993; Houghton, 1994; Lisansky, 1994; Capalbo et al., 1994, 1995; Capalbo & Moraes, 1996; Nardo et al., 1995, 1999). Em nível mundial, existem várias indicações de que introduções de organismos em novos ecossistemas, feitas sem se considerar os possíveis efeitos negativos, podem conduzir a problemas significativos para a agricultura e para o meio ambiente (Meadows, 1993).

Especialistas de controle biológico clássico ocasionalmente avaliaram a eficiência de agentes de controle candidatos a serem introduzidos em um novo

ambiente, utilizando diferentes técnicas em laboratório ou campo. Entretanto, pouca ou nenhuma atenção tem sido dada a outros organismos que podem também ser afetados pelos agentes de controle liberados. Muitos dos AMCs podem sobreviver às custas de mais de um hospedeiro ou presa, podendo estar, entre estes, espécies consideradas benéficas. Seus efeitos podem, também, passar despercebidos quando aumentam de intensidade lentamente ou quando mais de um organismo, atuando diferentemente, é introduzido no mesmo ambiente ao mesmo tempo. Em todo o mundo, as avaliações de impactos ambientais positivos e negativos decorrentes do uso de AMCs são escassas (Fuxa, 1992; Meadows, 1993; Nascimento et al., 1998; Sá et al., 1998; Sosa-Gómez et al., 1998).

A literatura internacional registra casos de resistência de pragas a patógenos (Cooley, 1993; Sosa-Gómez & Moscardi, 1994) não devendo ser descartada a possibilidade de haver mutações de microrganismos e mesmo mudança de hospedeiros. Fuxa (1992) resumiu as três maiores preocupações relacionadas à liberação de microrganismos geneticamente manipulados ou não. São elas: **a)** um organismo bem caracterizado no laboratório pode ter propriedades não esperadas no campo, tanto danosas quanto benéficas; **b)** existe a possibilidade de distúrbio do balanço de um ecossistema pela liberação intencional de um organismo, em particular pela mudança de seu "*status*" de organismo benéfico para "praga"; **c)** existe a possibilidade da transferência não intencional de informações genéticas entre organismos, de forma que aqueles originalmente não-patogênicos poderiam se tornar patogênicos, ou organismos já patogênicos poderiam ter sua amplitude de hospedeiros aumentada. Algumas destas preocupações podem ser também aplicadas a qualquer introdução de espécies em ambientes novos ou em ambientes onde estas já ocorrem em níveis reduzidos (Meadows, 1993).

Fatores ambientais

Os fatores ambientais têm sido considerados, desde longo tempo, no planejamento do uso da terra. A evolução dos conhecimentos científicos e a integração destes, na forma multidisciplinar, veio permitir a análise das conseqüências sobre o ambiente, principalmente em grandes obras públicas. Assim, a Avaliação de Impacto

Ambiental (AIA), na sua forma moderna, é uma criação do final dos anos 60.

A AIA é um exame sistemático das conseqüências de projetos, políticas ou planos, com o principal objetivo de fornecer a quem decide a soma de implicações de ações alternativas, antes que a decisão se faça (Foloni, 1995). A AIA abrange quatro análises bastante definidas: uma avaliação econômica, uma social, uma sobre a saúde pública e uma ecológica ou ambiental propriamente dita; a junção destas quatro avaliações fornece as implicações que posteriormente serão avaliadas pelos elementos de decisão. Para projetos industriais (barragens, hidroelétricas, fábricas, etc.), a AIA já está bem estabelecida.

De alguma forma, o uso de produtos fitossanitários também é um assunto de interesse público, que não difere de outros projetos industriais. Entretanto, para realizar a AIA do uso de AMCs na agricultura ainda não existe uma forma perfeitamente definida. Isso provavelmente se deve à variedade de princípios ativos, formas de aplicação, épocas de uso, tipos de formulação, quantidade e número de aplicações, variedade de culturas e diferentes condições edafoclimáticas.

Neste particular, há que se explorar a complexa relação entre a ciência e as ações regulamentadoras (política), em um campo sujeito a muitos debates: a avaliação de risco à saúde pública e ao meio ambiente, resultante do uso de agroquímicos.

Segurança

Comparados com os inseticidas químicos, os AMCs apresentam características interessantes, como uma ação mais específica, ação de controle prolongada pelo estabelecimento da população microbiana no hospedeiro e biodegradação. Uma variedade de bactérias, fungos, protozoários e vírus constituem um pequeno, porém crescente, grupo de produtos em uso no Brasil e no mundo.

Há mais de três décadas, iniciou-se o desenvolvimento de produtos à base de AMCs, especialmente a bactéria *Bacillus thuringiensis*. A segurança destes produtos era anunciada como provável, baseada na ausência de danos em ensaios de laboratório. Os estudos sobre a segurança destes produtos para a saúde humana e ambiental se expandiram quando se chamou a atenção para possíveis efeitos adversos

à indústria de sericicultura no Japão (Aizawa, 1989) e com a observação de alguns eventos adversos em vertebrados revistos por Drobniewski(1994), destacando-se assim a necessidade de requisitos para sua comercialização (Laird et al., 1989).

Devem ser avaliados, também, os riscos a alguns invertebrados (Siegel & Shadduck, 1989; Saik et al., 1989; Goettel et al., 1990). Destaquem-se as abelhas (*Apis melifera*) e o bicho da seda (*Bombix mori*) pela cadeia produtiva a que estão atrelados, bem como o efeito sobre predadores e parasitóides, devido à importância destes últimos no controle de pragas (Laird et al., 1989).

De qualquer forma, o consenso geral é que, uma vez que possa haver risco inerente, eles devem ser regulamentados.

Impactos

O impacto ambiental dos AMCs depende de dois fatores: o destino do patógeno após sua aplicação e o efeito do patógeno sobre os vários componentes do ambiente. Três fatores afetam o primeiro: persistência, crescimento populacional e dispersão (Fuxa, 1992).

Muito pouco é conhecido a respeito do efeito de AMCs sobre outros organismos não-alvo em campo. Este efeito pode ser observado diretamente sobre os organismos passíveis de serem infectados pelo AMC, através de modificações em outros agentes patogênicos ou de competições com outros agentes de controle (Fuxa, 1989).

Resistência de insetos a AMCs tem sido observada em laboratório e condições de campo (Fuxa et al., 1993). Tem sido também demonstrado em laboratório que a ingestão de um baculovírus pode ativar uma infecção latente de outro em um inseto (Fuxa, 1992). Liberações periódicas de vírus entomopatogênicos podem indiretamente causar danos em organismos não-alvo, parasitas e predadores, por deslocamento de competição ou por redução do recurso comum, que é a população do inseto hospedeiro (Shiga et al., 1973; Fuxa, 1992; Moscardi & Corso, 1981; Moscardi et al., 1981; Richter & Fuxa, 1984; Teakle et al., 1985). Uma revisão sobre o assunto bastante atual e voltada ao uso de AMCs para controle de pragas é apresentada em Sosa-Gómez et al. (1998).

DEFINIÇÕES

Avaliação de risco

Risco é definido como a magnitude e probabilidade de um efeito adverso ocorrer (Levin & Strauss, 1993). Ele é uma função de **dano** (expresso em termos de efeito adverso sobre algum organismo não-alvo, por exemplo morte ou patogenicidade) e de **exposição** direta ou indireta (i.e., que população estará exposta ao agente, a que concentração e a duração da exposição). Para produtos de uso na agricultura, as preocupações ambientais são de primária consideração, embora a segurança para a saúde humana também seja considerada.

Muitas vezes, separadamente, nem o dano nem a exposição causariam preocupação com respeito à saúde humana ou ao ambiente. O problema potencial, entretanto, surge quando um organismo suscetível é exposto ao AMC (Betz et al.,1989).

Do ponto de vista científico, a parte mais importante do processo de decisão sobre o uso de um produto é o processo de **avaliação de risco**, cujo objetivo é analisar a resultante dos dados sobre *magnitude* e *probabilidade* de um efeito adverso decorrente do uso daquele produto.

Assim, a **avaliação do dano** irá requerer informações que demonstrem se o AMC apresenta patogenicidade, toxicidade ou outro efeito indesejável em mamíferos ou outra espécie não-alvo de importância no ambiente, para o qual se aplicará o AMC. A quantidade de dados exigidos depende do conhecimento prévio da relação entre o AMC e o hospedeiro, bem como o parentesco do AMC com patógenos indesejáveis (Betz et al., 1989).

As informações requeridas para **avaliação do potencial de exposição** incluem dados de sobrevivência, crescimento, reprodução e dispersão do AMC no ambiente. Neste item, um fator limitante é a disponibilidade de técnicas que permitam detectar e quantificar o AMC no ambiente. Esta limitação reforça a necessidade de se dispor da identificação bastante detalhada do AMC (Betz et al., 1989).

A avaliação de risco foi originalmente realizada para proteção da saúde humana e teve por objetivo proteger o indivíduo na sociedade e, conseqüentemente,

esta como um todo. No caso da avaliação de risco **ambiental** do AMC, ou seja, de riscos ecológicos sobre organismos benéficos não-alvo, a avaliação é feita levando em consideração a população do organismo não-alvo ou a comunidade das populações e não o indivíduo "*per se*". Dessa maneira, alguns organismos do ambiente podem ser afetados por um pesticida, por exemplo, desde que a sua população como um todo sobreviva, ou que a sua função na comunidade seja preservada (Solomon, 1996).

Análise de risco

A análise de risco pode ser definida como a avaliação científica sistemática dos dados sobre o dano e a exposição, seguida da formulação de conclusões sobre o potencial de risco do uso do pesticida (químico ou biológico) sobre a saúde humana ou ambiental .

Ela é o processo final quando se faz um balanço entre os riscos e benefícios e é realizada pelos órgãos oficiais de registro ou aprovação de uso. Devem ser considerados os riscos de outros produtos alternativos e de outros métodos de controle disponíveis e até mesmo o de não se utilizar nenhum tipo de controle para a praga em questão. Os benefícios e riscos devem também ser analisados em termos de valores econômicos, sociais e ecológicos (Solomon, 1996).

Há que se considerar, ainda, a possibilidade de falsa percepção de risco, pois muitas vezes a falta de conhecimento cria preocupações infundadas sobre ele. O fato de alguns riscos ambientais serem aceitos se deve ao custo muito alto, necessário para eliminar os associados a atividades humanas, incluindo o de não proteger a cultura contra as pragas (Solomon, 1996).

Um esquema simplificado do processo total da análise de risco para AMC, com todos os seus componentes, é ilustrado na Figura 1. Inicialmente, testes são conduzidos onde o organismo não-alvo é exposto ao AMC a ser avaliado, observando se efeitos adversos significativos são produzidos. Paralelamente, testes com o próprio AMC, isoladamente, são desenvolvidos para se conhecer seu potencial de persistir e multiplicar-se no ambiente e, conseqüentemente, saber se ocorrerá exposição do organismo não-alvo ao AMC. Como resultado desses testes, é feita uma avaliação de risco do uso do AMC, na qual o dano, a exposição e o organismo afetado são conhecidos.

A análise feita em seguida leva em consideração os riscos detectados e os benefícios do uso daquele AMC e de outros métodos de controle. Medidas mitigadoras são propostas, no sentido de gerenciar e reduzir os riscos.

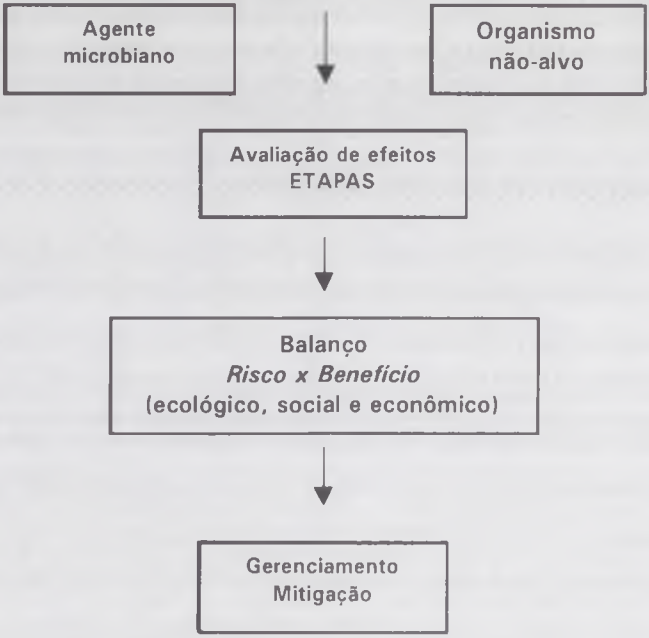


FIGURA 1. Processo de avaliação de risco e análise de risco/benefício do uso de um AMC.

Mitigação do risco

Se o resultado da avaliação indicar um risco inaceitável, os órgãos de regulamentação podem propor alguma medida mitigadora do risco, envolvendo procedimentos técnicos ou legislativos para restringir o uso do produto, de maneira que a exposição seja reduzida.

No caso de procedimentos técnicos, existem várias opções que podem incluir modificação da forma de aplicação ou da formulação, época de aplicação, uso de protetores individuais, entre outros. Os procedimentos regulatórios podem incluir desde a restrição de uso e de aplicação do produto até a proibição total de seu uso e produção, também considerado um procedimento de mitigação. Dessa maneira, o risco de se utilizar um AMC com algum dano conhecido pode ser reduzido, limitando-se sua exposição.

Infelizmente, os danos associados aos AMCs freqüentemente não são adequadamente identificados ou avaliados e o resultado da análise risco/benefício nem sempre é preciso (Maddox, 1992).

AVALIAÇÃO AMBIENTAL

O objetivo desta avaliação é identificar os efeitos adversos potenciais do AMC sobre organismos-teste que representem os principais grupos de organismos não-alvo do ambiente aquático e terrestre, com potencial de estarem expostos ao AMC.

Quatro riscos ou danos são associados ao uso dos AMCs:

(1) patogenicidade;

(2) toxicidade;

(3) alergenicidade;

(4) deslocamento competitivo.

Com exceção da alergenicidade, todos os outros riscos são atributos que também contribuem para a eficiência do microrganismo em controlar a praga-alvo (Cook et al., 1996).

A probabilidade da ocorrência de um efeito adverso pode variar dependendo de:

(a) origem geográfica do AMC - se nativo ou exótico;

(b) seu tipo - se é selvagem (natural) ou se foi modificado por técnicas de melhoramento genético clássico ou DNA recombinante;

(c) área de aplicação - se é em pequena ou grande escala;

(d) estratégia de uso - se é inoculativa, inundativa ou conservativa.

Mesmo com estas variáveis possíveis, os tipos de riscos associados continuam sendo os mesmos (Cook et al., 1996; Goettel et al., 1990).

Modelos de avaliação

Embora existam modelos de avaliação de risco de AMC sendo utilizados em vários países (OECD 1995), o modelo adotado inicialmente pelos Estados Unidos, através da Agência de Proteção Ambiental (Pesticide, 1989), denominado "Sistema

de Fases" *(Tier System)* (Betz et al., 1989; Pesticide, 1989), é o que será discutido nesse capítulo. A escolha justifica-se porque esse modelo foi aprovado para utilização no Brasil e nos demais países da região do Cone Sul, incluindo Argentina, Chile, Paraguai e Uruguai (Comitê, 1997; Nardo & Capalbo, 1997).

Nesse modelo, o processo de avaliação de riscos ecológicos é feito em fases hierárquicas (de I a IV), visando a reduzir o número de testes e evitar demora e custos desnecessários no processo de registro. No geral, patogenicidade e toxicidade são os aspectos avaliados prioritariamente nos testes propostos. A Figura 2 ilustra os testes exigidos e o modelo de Fases.

Testes da Fase I: Patogenicidade/Toxicidade
Aves: oral e inalação
Peixes de água doce: dieta
Invertebrados de água doce: dieta
Animais de estuários e marinhos
Plantas não-alvo
Artrópodes não-alvo (predadores/parasitóides)
Abelhas

Testes da Fase II: Sobrevivência e Multiplicação *
Comportamento do AMC no ambiente terrestre
Comportamento do AMC em água doce ou de estuário/mar

Testes da Fase III: Efeito dose-resposta e Crônico
Somente exigidos se forem detectados efeitos adversos importantes na Fase anterior

Testes da Fase IV: Específicos *
Condições reais ou simuladas de campo

* testes estabelecidos caso-a-caso

FIGURA 2. Modelo de fases hierárquicas, mostrando os principais testes toxicopatológicos sobre organismos benéficos não-alvo e de comportamento do AMC.

Na Fase I, o organismo não-alvo é exposto à máxima chance de ocorrência de danos. A duração dos testes deve ser suficiente para permitir a observação de manifestação patogênica retardada. A ausência de danos aos organismos indicadores nessa Fase implica um alto grau de confiança de que nenhum efeito adverso ocorrerá

pelo uso do AMC. Se efeitos adversos significativos forem observados, os testes da Fase II deverão ser realizados.

Na Fase II, é estimada a exposição potencial dos organismos não-alvo ao AMC. Os testes contemplam estudos de sobrevivência, persistência, multiplicação e dispersão do agente de controle em diferentes ambientes, avaliando dinâmicas de população para quantificar os resultados dos estudos realizados.

Se os testes da Fase II mostrarem que pode haver exposição significativa dos organismos não-alvo ao AMC, a Fase III torna-se necessária. Nela, os testes irão determinar efeitos dose-resposta e alguns efeitos crônicos. Estes testes da Fase III devem ainda determinar a existência de uma dose mínima para efeitos adversos identificados na Fase I.

Testes da Fase IV, se ainda necessários, considerarão tanto a exposição quanto o risco, em condições reais ou simuladas de campo. Eles avaliam qualquer problema específico que não possa ser resolvido nas Fases anteriores. Os detalhes são definidos caso-a-caso, em concordância com os órgãos de regulamentação.

De uma maneira geral, a maioria dos AMCs que estão no mercado, registrados como biopesticidas, nos Estados Unidos, foi analisada pelo modelo de Fases e não exigiu testes além da Fase I (EPA, comunicação pessoal).

Entre as medidas essenciais na análise de risco estão as estimativas da intensidade, freqüência e duração da exposição ambiental ou humana aos agentes de risco que são produzidos por uma fonte de risco. O destino ambiental do organismo liberado, incluindo o transporte fora do alvo ou do sítio de liberação, é um dos elementos que mais interesse apresenta do ponto de vista ambiental (Alexander, 1986; Davis, 1987; Fuxa, 1989).

Entre os exemplos de estudos sobre destino ambiental, que podem ser encontrados na literatura, sugerimos alguns para leitura: Fuxa (1989), que mostra que a população viral geralmente diminui vagarosamente em ecossistemas agrícolas e aumenta após a liberação em ecossistemas florestais, talvez devido à grande estabilidade destes últimos; Jaques (1975, 1976), que mostram que a persistência de muitos vírus por longo tempo se dá principalmente no solo e secundariamente em hospedeiros alternativos; e Ritcher & Fuxa (1984), que estudaram taxas de dispersão

em campo.

Para se ter uma idéia da complexidade que os trabalhos para avaliação ambiental podem enfrentar, pode ser lembrado o estudo de transporte de vírus a curtas distâncias por meios bióticos ou abióticos. O transporte por agentes abióticos é pouco documentado, podendo ocorrer por correntes de ar em partículas de pó ou nos próprios hospedeiros infectados carregados por correntes de ar, ou por águas naturais, chuvas ou irrigação. Como os vírus permanecem aderidos a partículas na superfície do solo, não se espera que eles contaminem águas subterrâneas (Jaques, 1975). Os agentes bióticos conhecidos no transporte de vírus entomopatogênicos incluem: insetos hospedeiros, artrópodos predadores ou parasitos (Fuxa, 1992), saprófitas e mamíferos (Entwistle et al., 1978, 1983; Fuxa, 1992).

Já a dispersão dos fungos pode se dar, ainda, através de mecanismos de autodispersão pela presença de estruturas que permitem o movimento ativo em água ou ejeção forçada de conídeos, tanto nos agentes abióticos como nos bióticos. Entre os fatores bióticos, os insetos hospedeiros podem transportar fungos de duas formas: 1) quando o inseto morre sobre a planta hospedeira, disseminando os esporos em correntes de ar; 2) quando o inseto hospedeiro transporta os fungos horizontalmente. Além destas, o transporte ainda pode se dar através do homem, devido às operações de cultivo, mas poucas são as informações a respeito desse transporte.

Para o caso de bactérias entomopatogênicas, os esporos permanecem viáveis no solo até mais de dois anos sem reciclar, isto é , causar doença e reproduzir outra geração de bactérias. A persistência na água é variável. A quantidade de luz solar, poluição, dose e presença ou ausência de uma população de hospedeiro podem influenciar, se esta bactéria persistir por menos de três horas ou mais de sessenta dias (Dulmage & Aizawa, 1982; Fuxa, 1989).

A escolha de organismos indicadores

Os organismos utilizados como indicadores de efeitos adversos para AMCs são geralmente os mesmos utilizados para os testes com pesticidas químicos. Quando possível, devem ser espécies representativas da região geográfica ou ecossistema em que o AMC será aplicado, principalmente espécies que mais

provavelmente irão estar expostas ou se alimentar dos organismos-alvo quando estes estiverem infectados ou mortos (Nardo & Capalbo, 1997).

Para fins práticos, entretanto, a escolha de indicadores biológicos é baseada principalmente na facilidade de criação, reprodução artificial, manutenção e manipulação, devendo incluir representantes do ambiente terrestre (artrópodos benéficos, plantas e aves) e do ambiente aquático (peixes, invertebrados e algas).

Ambiente terrestre

A necessidade de realizar testes com os diferentes organismos pode variar com o tipo de AMC em estudo, forma de uso e modo de ação. Geralmente, a definição sobre os testes necessários é feita caso-a-caso pelos órgãos de registro (Nardo et al., 1999).

Aves

A codorna japonesa (*Coturnix coturnex japonica*) tem sido utilizada como espécie-teste em protocolos internacionais, demonstrando sensibilidade a efeitos produzidos por produtos químicos, além de ser uma boa espécie para laboratório, com a qual já se tem reunido um grande número de dados básicos (Lynch, 1995). Também a galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) tem sido utilizada, apresentando as mesmas propriedades descritas para a codorna. Pintos jovens têm apresentado sensibilidade aos efeitos produzidos por produtos químicos e AMCs, demonstrando serem boas espécies de laboratório, das quais grande quantidade de dados para protocolos tem sido obtida.

Toda ave usada nos testes deverá ser considerada, seguindo alguns critérios de padronização sugeridos em protocolos específicos, como os apresentados para produtos químicos (Manual, 1992), ou os sugeridos especificamente para produtos biológicos (Pesticide, 1989; Nardo et al., 1999)

Como exemplo das características de padronização exigidas, podemos citar a aclimatação das aves em gaiolas, alimentação abundante por, no mínimo, 15 dias antes do início dos testes, a identificação das aves por anilha colorida colocada no tarso, idade entre 14 e 24 dias no início dos testes, número mínimo de aves a ser

considerado por grupo-teste, de forma a garantir a representatividade dos resultados obtidos (Nardo et al., 1999).

Como os testes são realizados com AMCs, alguns cuidados com relação aos grupos de estudo devem ser considerados. Por exemplo, há um grupo-testemunha que se alimenta (no caso de testes por ingestão) apenas com a ração, sem o AMC – chamado geralmente de "testemunha negativa". Há um segundo grupo-testemunha que se alimenta com a ração contendo o AMC inativado, ou seja, é mantida a integridade das células do AMC, porém ele não está ativo (é o caso da autoclavagem de algumas bactérias e fungos) – chamado geralmente de "testemunha inativada". E, finalmente, um terceiro tipo de testemunha em que o animal-teste se alimenta da ração contendo o filtrado esterilizado obtido da cultura do AMC, com a intenção de verificar se está presente no filtrado algum metabólito microbiano capaz de causar danos a organismos não-alvo. Esses grupos de testemunha aqui indicados são válidos também para os demais testes realizados em outros ambientes e sob as diferentes formas de administração do AMC aos organismos-teste.

Artrópodos

No geral, devem ser testadas três espécies de artrópodos benéficos, representando pelo menos dois dos seguintes grupos: dípteros parasitas, hemípteros predadores, coleópteros predadores, ácaros predadores da família Phytoseidae, neurópteros predadores e himenópteros parasitas. Também deverão ser conduzidos testes com abelhas (*Apis mellifera*) e, se possível, com as nativas do país (Nardo et al., 1999).

Quando o AMC for vírus e bactéria, os testes devem ser conduzidos em três espécies de insetos representativas dos parasitóides e predadores conhecidos ou suspeitos de atacarem o organismo visado, ou que ocupem o mesmo habitat ecológico. Se o AMC for um protozoário, pelo menos uma das espécies de artrópodos não-alvo deve ser um parasito importante do organismo-alvo. Muitos protozoários têm uma ampla gama de hospedeiros; por esta razão, recomenda-se que mais de três espécies de organismos não-alvo sejam testadas. Se o AMC for fungo, então é sugerido que as espécies de artrópodos a serem testadas sejam importantes agentes de controle no

ecossistema em que o AMC será utilizado. Além disto, os testes podem incluir parasitóides e/ou predadores do organismo-alvo.

A escolha de predadores e parasitos é feita, geralmente, pelo laboratório que estuda o AMC, mantidas algumas premissas gerais de sugestão. Entre estas, podemos citar a que estabelece que as espécies selecionadas devem representar os grupos que estarão expostos sob as condições de uso propostas e que apresentam algum importante relacionamento ao organismo a ser controlado. A razão da escolha das espécies deve estar justificada no relato dos resultados dos testes (Pesticide, 1989).

A principal razão dos testes da Fase I é determinar a presença de efeitos tóxicos ou patogênicos sobre representantes de poucas ordens de insetos benéficos. Como indicado acima, as espécies selecionadas, além das abelhas, devem ter alguma importância no ecossistema em que o AMC será utilizado. Os dados obtidos na Fase I serão utilizados em conjunto com informações disponíveis sobre o padrão de uso, especificidade, destino do produto e outros.

Como citado para aves, os grupos-testemunha e vários itens de padronização dos ensaios de laboratório deverão ser considerados para que os resultados obtidos sejam representativos dos efeitos reais e possam ser utilizados para a avaliação ambiental.

Plantas

No caso de plantas não-alvo, a realização dos testes dependerá principalmente da relação que o AMC tenha com fitopatógenos. Aqueles que são semelhantes ou têm relação com patógenos de plantas com uma gama de hospedeiros restritos deverão ser testados apenas com plantas desse mesmo grupo de hospedeiras. No caso do AMC ter uma ampla gama de hospedeiros, pode haver necessidade de testes com um número maior de plantas. Outros fatores que contribuem na escolha das plantas testadas são: forma de ação do AMC, disseminação e persistência no ambiente. No caso de AMCs para uso como herbicidas, os testes exigidos envolvem um grande número de espécies de plantas de importância econômica, ecológica e social (Nardo et al., 1995, 1999).

Uma descrição taxonômica completa do AMC deve possibilitar a determinação de sua semelhança com os patógenos de plantas conhecidos. Também o conhecimento da sua forma de ação pode ajudar na determinação da diversidade de testes a serem conduzidos. Finalmente, AMCs que não têm qualquer semelhança com patógenos de plantas podem requerer poucos ou nenhum teste nelas.

Para os AMCs que não têm qualquer semelhança taxonômica com fitopatógenos, o agente deve ser testado para a(s) cultura(s) em que ele for utilizado, para aquelas que normalmente são cultivadas em rotação ou em áreas adjacentes e para plantas de importância ecológica ou social, que se encontram na área de atuação e nos ambientes em que é possível a presença, sobrevivência e reprodução do AMC.

Pelo exposto, pode-se concluir que a relação de plantas a serem incluídas nos testes dependerá de algumas particularidades relacionadas ao AMC, em termos de fitopatogenicidade, disseminação e persistência no ambiente. No entanto, na elaboração da relação, algumas peculiaridades relacionadas às plantas-teste deverão ser consideradas, como a inclusão preferencial de espécies normalmente muito suscetíveis a agentes fitopatogênicos e a clones de elevado valor econômico.

Nos protocolos propostos por Nardo et al. (1999), apresenta-se ainda que, no caso de AMCs utilizados para controle de animais (incluindo insetos), as plantas a serem testadas devem incluir seis espécies de dicotiledôneas de, pelo menos, quatro famílias, e quatro espécies de monocotiledôneas de, pelo menos, duas famílias. Estas espécies serão selecionadas dentre as plantas de maior valor comercial, social ou ecológico.

Para os AMCs com a finalidade de uso aquático ou que muito provavelmente irão se disseminar ou sobreviver em ecossistemas aquáticos, espécies adicionais de plantas aquáticas e algas devem ser testadas, incluindo *Lemna sp.* (lentilha d'agua), *Selenastrum capricornutum* (algas verdes clorofícias), *Anabaena sp.* (alga azul esverdeada), *Scenedesmus sp.*, algumas diatomáceas de água doce como *Navicola sp.*, *Symbela sp.* e *Diatoma sp*. Para água salgada, recomenda-se a diatomácea *Skeletonema costatum*.

Para os estudos com plantas devem ser respeitados alguns cuidados adicionais. As testemunhas negativas devem estar ao máximo possível livres de ataque

de pragas. Além disto, no caso de AMCs que são prontamente disseminados pode ser necessário conduzir testes em que controles negativos e plantas tratadas sejam mantidos em locais diferentes ou em casas-de-vegetação separadas, sob condições ambientais idênticas, para que não haja infecção cruzada. Alternativamente, os controles negativos podem ser tratados com um pesticida químico não fitotóxico que propicie o controle eficiente do pesticida microbiano. Como às vezes é difícil detectarem-se efeitos adversos, como maturação atrasada ou perda de vigor, crescimento, qualidade, produção ou estande, é importante analisar controles não tratados, usando um método analítico sensível e específico para determinar se a infecção pelo AMC realmente ocorreu.

A avaliação em grupos de testemunhas positivas é requerida para AMCs semelhantes a patógenos de plantas, para se assegurar de que as condições ambientais são propícias para a penetração, infecção e desenvolvimento da doença em um hospedeiro suscetível. O controle ou testemunha positiva deve ser selecionada de forma a representar adequadamente o AMC em termos de taxonomia e as condições para infecção e desenvolvimento da doença devem ser ótimas, caso isso seja conhecido. No caso de um AMC que não se destina ao uso como herbicida, a testemunha positiva deve consistir em um patógeno de planta conhecido, com características taxonômicas semelhantes ao AMC e seu hospedeiro suscetível. No caso de herbicidas microbianos, entretanto, a testemunha positiva deve consistir na espécie de planta a ser controlada e no herbicida microbiano.

Ambiente aquático

Para AMCs de uso terrestre, para os quais a exposição aquática direta não é prevista, uma espécie de peixe e uma de invertebrado, ambas de água doce, devem ser testadas para avaliar a toxicidade e a patogenicidade. Para aqueles produtos aplicados diretamente em água doce, marinha ou de estuário, uma espécie adicional de peixe e outra de invertebrado devem ser testadas na Fase I (Jonsson & Maia, 1999).

No Brasil, os órgãos de regulamentação têm recomendado, para avaliação toxicológica de produtos químicos, as espécies de peixes autóctones pertencentes à

família Characidae. Opcionalmente, podem ser utilizadas *Pimephales promelas* ou *Brachydanio perio* (família Cyprimidae) e *Poecilia reticulata* (família Poecilidae).

No caso de invertebrados aquáticos, deve-se selecionar para teste um organismo que seja filogeneticamente mais relacionado à praga-alvo. Portanto, quando se avaliar um AMC cuja praga-alvo seja um inseto, será mais apropriada a escolha de um inseto aquático como invertebrado aquático a ser testado.O uso de *Daphnia*, um Cladocera, tem como vantagem o grande volume de informação já disponível, facilitando a análise dos resultados.

Os testes com plantas aquáticas foram discutidos resumidamente no subitem "Plantas" para o ambiente terrestre, pois são aplicáveis aos dois tipos de ambiente.

Condições gerais para a realização dos testes

Informações sobre a especificidade e círculo de hospedeiros do AMC são básicas para se estimar a segurança do mesmo. O maior problema na avaliação é diferenciar entre hospedeiros de laboratório (círculo de hospedeiros fisiológicos) e hospedeiros de campo (hospedeiros ecológicos).

Determinação da especificidade do agente de controle

Círculo de hospedeiros de laboratório

A determinação do círculo de hospedeiros começa com testes de laboratório. Os organismos não-alvo são expostos ao AMC de uma maneira que normalmente produza infecções generalizadas no organismo suscetível. Estes testes não são tão simples porque diferentes grupos de microrganismos exigem diferentes métodos de exposição. A maioria dos fungos penetra diretamente pela cutícula, enquanto vírus, bactérias e microsporídeos são transmitidos oralmente. Também é essencial que a forma do AMC usada nos testes de laboratório seja aquela responsável pela transmissão de um hospedeiro infectado para um organismo sadio. A determinação da especificidade de um AMC exige conhecimentos de seu ciclo de vida e das exigências para transmissão horizontal (Congress, 1995).

Métodos não convencionais de exposição do hospedeiro ao AMC podem também aumentar o círculo de hospedeiros. Por exemplo, Undeen & Maddox (1973) foram capazes de infectar somente um organismo não-alvo fora da ordem do hospedeiro natural do microsporídeo *Nosema algera*, quando os organismos não-alvo se alimentaram de esporos. Entretanto, quando os mesmos esporos foram injetados diretamente na hemolinfa, todos os organismos não-alvo tornaram-se infectados.

Dentro do contexto de regulamentação, no qual o círculo de hospedeiros analisado é absolutamente de laboratório, os resultados apresentados como o exposto acima poderiam eliminar alguns microrganismos como agentes de controle biológico (Maddox, 1992).

A dose do AMC e a idade do hospedeiro, quando se dá a exposição, também podem mudar radicalmente a suscetibilidade do hospedeiro. Organismos não-alvo podem ser infectados somente quando recebem doses muito mais altas do que as exigidas para produzir 100% de infecção no hospedeiro natural, ou quando são expostos no estágio de larvas ou ninfas.

Controles adequados de cada tratamento devem ser incluídos, para garantir que o hospedeiro não foi infectado com o microrganismo antes do bioensaio e que o AMC testado esteja viável. Estes dois tipos de erro são bastante possíveis nos testes de laboratório. O conhecimento da biologia do AMC é importante para garantir-se contra sérios erros experimentais (Maddox, 1992; Congress, 1995).

Testes de especificidade de hospedeiros e de círculo de hospedeiros não são garantia de segurança ambiental. Outros efeitos indiretos de interações entre os AMCs e os organismos não-alvo podem ocorrer no ambiente, porém não são fáceis de serem monitorados ou detectados.

Círculo de hospedeiros de campo

O círculo de hospedeiros ecológicos de um AMC é usualmente considerado como aquele observado sob condições normais de campo, quando tanto o hospedeiro-alvo como o não- alvo ocorrem na mesma localidade. Geralmente, o círculo de hospedeiros ecológicos é proposto no caso de introdução de AMCs exóticos para controle biológico clássico. Na maioria dos casos, quando um AMC está sendo

considerado para uso como agente de controle, a principal questão deve ser: *"pode o AMC estabelecer-se na população do hospedeiro não-alvo e causar epizootias naquela população?"*. Infecções casuais em hospedeiros não-alvo, que não se disseminam horizontalmente dentro da população, podem ter pouca importância ecológica (Maddox, 1992).

É muito difícil prever o círculo de hospedeiros ecológicos de um AMC antes de sua introdução no ambiente. A dinâmica espacial e temporal do AMC e os hospedeiros infectados e sadios influenciam a transmissão e a sobrevivência de patógenos dentro de um hospedeiro específico. Estudos no local de origem do AMC, onde o hospedeiro natural e o hospedeiro não-alvo ocorrem na mesma localidade, são de grande utilidade, mas raramente são conduzidos. Espécies não-alvo deveriam ser coletadas nestas localidades e examinadas quanto à infecção, tanto durante epizootias como enzootias.

Potencial de risco

A análise do impacto ambiental do uso de pesticidas químicos, ou AMCs, se soma aos conceitos de risco ou ainda do balanço entre risco e benefício. Para se decidir se um risco é aceitável, é de fundamental importância considerar os benefícios advindos do uso do produto em questão, e não somente dos aspectos tóxico-ambientais. Deve-se também decidir, no ambiente específico de cada país ou processo, qual aspecto pode ser afetado, pesando-os à luz das necessidades próprias da circunstância agrícola e socioeconômica em foco. Risco ecológico de um composto deve ser comparado com os riscos provenientes de outros produtos alternativos para aquele problema (Foloni, 1995).

Os estudos de potencial de risco, em qualquer nível que ele seja analisado, sempre estão relacionados a regulamentações, protocolos ou normas, ou mesmo uma combinação entre eles, dependendo das estratégias, dos mecanismos reguladores e do consenso das comunidades científicas e regulamentadoras do país .

Alguma preocupação com os AMCs e seus impactos ambientais, conforme já apresentado anteriormente neste capítulo, advém do fato de que uma vez que o agente se estabeleça no ambiente, é normalmente impossível eliminá-lo.

Isto justifica o fato de os programas de controle biológico serem avaliados por órgãos governamentais, por serem de interesse público (Harris, 1990).

A Figura 3, baseada em dados de Congress (1995), apresenta alguns exemplos de riscos potenciais dos AMCs.

O exemplo de requisitos para registro de agentes fúngicos é interessante para ilustrar a importância dos estudos de impacto ambiental, especialmente a tomada de decisão dos órgãos regulamentadores. Em geral, são requeridos testes de laboratório quanto à infectividade em organismos não-alvo, incluindo mamíferos (Aizawa, 1989; Betz et al., 1989; Kandybin & Smirnov, 1989; Quinlan, 1989) e avaliação da exposição direta de animais superiores (que por extrapolação indicará a exposição de seres humanos) a elevadas doses do inóculo. Os danos a serem avaliados neste último caso incluem toxicidade, alergenicidade e infecção e estão geralmente associados com manuseio impróprio e aplicação do produto. Esses problemas (manuseio e aplicação inadequados), entretanto, não são problemas novos, uma vez que os mesmos danos estão presentes e dizem respeito ao uso de produtos químicos (Harris, 1990). Há aqui uma situação delicada de análise: se ambos apresentarem um potencial de risco semelhante, e levando em consideração a necessidade de se agir de alguma forma contra a praga-alvo, a decisão de uso ou aprovação deve ser pelo produto com a menor alteração ecológica possível.

Produtos microbianos contendo	Impactos potenciais no ambiente	Impactos potenciais na saúde humana
Bactérias	1. alguns impactos adversos sobre lepidópteros não-alvo e suas aves predadoras; 2. declínio de curta duração de certos insetos não-alvo; 3. resistência ao *Bacillus thuringiensis* documentado no campo em populações de pragas.	mínimos riscos à população em geral; alguns dados sugerem possíveis infecções de indivíduos imunodeprimidos.
Fungos	1. possíveis efeitos sobre organismos não-alvo; 2. algumas evidências de resistência	algumas alergias a seres humanos estabelecidas e alguns metabólitos tóxicos
Vírus	1. mínimos efeitos a organismos não-alvo; 2. possibilidade de persistência no campo no futuro, se o uso expandir.	nenhum risco conhecido #1.
Protozoários	possíveis efeitos sobre espécies não-alvo.	nenhum risco conhecido # 1.
Nematóides	possíveis efeitos sobre organismos não-alvo, particularmente os de solo.	nenhum risco conhecido # 1.

#1- nenhum risco - indica que os riscos não foram documentados até 1995. Em alguns casos, a falta de efeitos documentados pode ser devido à falta de monitoramento ou observação.

FIGURA 3. Exemplos de riscos potenciais dos agentes microbianos de controle de pragas (adaptado de Congress, 1995)

Critérios ambientais

Quando se aplica um produto no campo, ele atingirá um determinado alvo, mas também chegará ao solo e outros compartimentos por deriva ou dispersão. Interessa-nos, então, conhecer quanto tempo ele irá permanecer nesses compartimentos até sua total degradação.

Há três conseqüências prováveis, se o controle biológico exceder o controle necessário (ultrapassar o nível de controle desejado ou esperado):

(1) o nicho ocupado anteriormente pela peste permanecerá parcialmente vazio;

(2) a praga pode ser substituída por uma outra espécie;

(3) a praga será substituída por uma mistura de outras espécies (Harris, 1990).

Se a praga não tiver competidores na área sendo controlada pelo AMC, ocorrerá o primeiro caso (p.ex., o controle da lagarta da maçã resultará em maçãs sem lagarta). Este fato seria visto por muitos como ecologicamente incorreto, porém economicamente ele é bastante interessante. A situação mais comum, entretanto, para o caso do AMC é quando a praga é substituída por outra(s) espécie(s). Fletcher & Bateman (1983, citado por Harris, 1990) observaram que um dos problemas para o controle seletivo da mosca de frutas *Dacus tryoni* Froggatt (Diptera : Tephritidae) é a sua substituição por praga secundária. Um controle biológico, neste caso, deve envolver um agente oligófago ou um número grande de agentes especialistas. No primeiro caso, sua ação seria indesejável, visto que afetaria espécies nativas economicamente inócuas; a segunda opção seria cara e com muitas chances de insucesso, devido ao grande número de agentes e espécies-alvo a serem monitorados.

Muitas vezes um microrganismo natural de uma região, quando reintroduzido na mesma ou em outra região, ou mesmo em um habitat totalmente diferente, poderá se estabelecer e afetar os organismos não-alvo. Porém esquece-se que o simples ato de monocultivar ou mesmo fazer a rotação de culturas também afeta os inimigos naturais e não-alvo. O potencial de afetar os inimigos naturais e organismos não-alvo não deve ser esquecido nem relegado a segundo plano. Entretanto, baseado na literatura científica, a possibilidade de tais efeitos acontecerem é remota ou insignificante (Cook, 1992).

De qualquer forma, observa-se que alguma alteração ambiental ocorrerá pelo fato de utilizar-se algum controle (seja ele químico ou biológico), o que leva à conclusão de que os critérios ambientais devem ser cuidadosamente analisados caso-a-caso, para que o desequilíbrio causado seja o menor possível, uma vez que o "não-uso" de controle trará conseqüências econômicas indesejáveis.

Registro comercial

A possibilidade de amplo uso comercial e exposição ambiental de um AMC implica a sua avaliação ambiental e, conseqüentemente, exige seu **registro**. Desta forma, as autoridades que regulamentam o registro devem considerar os impactos potenciais que a exposição ao AMC pode acarretar à saúde humana e ao

ambiente. A exposição dos seres humanos pode ser direta (mistura, aplicação, manipulação) ou indireta (através do consumo de produtos tratados com o AMC). Os organismos não-alvo coexistem no ambiente e devem ser alvo de análise, pois apresentam distribuição numérica, espacial e temporal diferenciada (Betz et al., 1989).

O conhecimento científico disponível sobre determinado assunto afeta diretamente o estabelecimento e a implementação de qualquer regulamentação sobre registro para uso comercial de um AMC; e a sua flexibilidade é dependente do tipo de generalização que os dados disponíveis podem permitir (Moraes et al., 1997).

Protocolos e registros

Os órgãos registrantes em todo o mundo analisaram por muitos anos os AMCs, segundo parâmetros criados para os pesticidas sintéticos. Entretanto, mais recentemente observou-se a necessidade de avaliá-los com base em suas características biológicas, bastante distintas em muitos aspectos, conforme já discutido anteriormente neste capítulo, daquelas apresentadas pelos produtos químicos (Betz et al., 1989; Nardo et al., 1995).

No Brasil, a avaliação de risco ou do impacto ambiental para produtos fitossanitários foi estudada pela antiga SEMA (Secretaria do Meio Ambiente), mas só foi oficialmente formalizada pela Lei 7802, sancionada em julho de 1979 (Brasil, 1995), conhecida como a "Lei dos Agrotóxicos". Entretanto, esta lei trata de forma igual os produtos biológicos e químicos, sem considerar a natureza biológica dos primeiros. Tal distorção foi corrigida pela Portaria IBAMA 131 (Brasil, 1997), na qual as avaliações ambientais consideram as características inerentes aos AMCs no seu processo de registro para uso experimental e comercial.

Muitas das normas para registro e análise de AMCs ditadas pela Portaria 131 do IBAMA se basearam nas normas da agência americana de proteção ambiental -EPA, nas quais o conceito de avaliação em fases foi utilizado (Figura 1). Quaisquer que sejam, as normas propostas (internacionais ou nacionais) visam a assegurar ao público que o produto é seguro, mas os processos de registro atuais têm sido vistos como indicativos do que não é seguro.

Segundo Cook (1992), as regulamentações devem estar na proporção

dos riscos, facilitar a transferência de tecnologia e rever itens menores, porém muito comuns e carentes de solução.

Nardo et al. (1995) sugeriram que quaisquer que sejam as normas ou protocolos para o um AMC eles devem ser dinâmicos, sujeitos a alterações, em resposta ao crescente conhecimento ou mudanças de condições. O maior desafio, certamente, será reconhecer os riscos envolvidos na introdução de um novo agente e prontamente desenvolver medidas racionais para seu aproveitamento rápido, sem retenção ou avaliações desnecessárias.

Referendando todas as observações de segurança, não há evidências, para os AMCs até hoje registrados, de que a premissa de que eles sejam inerentemente mais seguros do que os sintéticos possa não ser válida (Lisansky, 1994).

Análise tóxico-patológica

Como já visto, é de competência do Governo Federal aprovar, registrar ou banir a comercialização e o uso de defensivos agrícolas (químicos ou biológicos) no Brasil. O registro, segundo a "Lei dos Agrotóxicos" pode ser dado pelo Ministério da Agricultura, Ministério do Meio Ambiente (através do IBAMA) ou Ministério da Saúde, dependendo da finalidade a que se destina, requerendo, todos eles, uma análise toxicológica. Essa avaliação se destina a fornecer informações sobre a forma correta do emprego do produto e também sobre medidas preventivas e curativas para casos de uso indevido. Os dados toxicológicos informam sobre as características tóxicas de uma substância ou composto, obtidas através de experimentação em animais de laboratório.

A toxicidade deve ser entendida como característica do componente químico que se manifesta em determinadas condições. Devido à grande variação nas respostas dos sistemas biológicos, esses efeitos raramente são uniformes e usualmente não há uma função definida entre dose e presença ou ausência de efeito tóxico (Foloni, 1995).

A filosofia dos testes de avaliação de dano (toxicológico), conhecida como "desafio máximo", se baseia no uso de condições extremas para os testes - como intra-ocular e intracerebral - de forma a obter efeitos biológicos passíveis de

detecção. Também o conceito de dose letal média (DL_{50}) é aplicado, porém a rota de exposição para AMCs normalmente é diferente e os valores de DL_{50} perdem sua importância, uma vez que quantidades absurdamente altas poderão ser necessárias, o que acarretaria asfixia ou sufocamento do animal, segundo os testes convencionais para químicos.

Segundo Siegel & Shadduck (1989), os inseticidas químicos e microbianos apresentam preocupações em comum com respeito a toxicidade, irritabilidade e características alergênicas, porém apenas para os AMCs devem-se considerar aspectos que não são considerados para os produtos químicos, como infectividade e multiplicação nos tecidos.

Desta forma, para os AMCs, a "dose desafio" é a maior possível (dependente da natureza física do produto), administrada pela rota que mais severamente compromete as defesas naturais do animal. Nesta escolha, dois parâmetros são importantes: (*) em primeiro lugar, uma busca na literatura detecta em quais órgãos ou circunstâncias foram isolados os agentes em seres humanos ou animais, ou onde foram produzidas lesões em animais ou outros organismos relacionados; os testes são então estabelecidos de forma a favorecer uma infeção similar à já observada; (*) em segundo lugar, deve-se lembrar que o cérebro e os olhos são os órgãos considerados mais vulneráveis a infeções, devido ao grande efeito que surge mesmo em lesões moderadas.

A maior dificuldade destes testes está em interpretar os resultados de mortalidade e estendê-los aos seres humanos (Waage, 1995).

Avaliação sobre predadores e parasitóides

O possível efeito que os AMCs podem exercer sobre a comunidade de insetos benéficos é complexo e tem recebido atenção moderada. Os AMCs não apenas causam uma redução do hospedeiro e, portanto, reduzem a disponibilidade de presas para os predadores, como também podem afetar diretamente insetos benéficos, resultando na sua morte. Além disso, a doença provocada pode reduzir o vigor do hospedeiro-alvo e também do não-alvo. Alguns parasitóides e predadores podem ainda disseminar mecanicamente o AMC entre sua população de hospedeiros ou presas, ou

mesmo transmiti-los transovarianamente. Desta forma, eles exercem importante papel de disseminadores de AMCs a populações espacial e temporalmente distantes.

Os primeiros estudos dos riscos dos AMCs sobre os insetos benéficos foram realizados em pesquisas de produção massal de insetos benéficos para uso em controle biológico (Vinson 1989). Ainda hoje, os estudos desses efeitos têm sido realizados com Hymenoptera, provavelmente devido à sua fácil produção em laboratório, para controle biológico e também à sua suscetibilidade.

Do ponto de vista do AMC, a interação deste com os organismos benéficos (não-alvo) costuma ser benéfica. Ela não apenas leva a um aumento no número de hospedeiros, como também aumenta a suscetibilidade do hospedeiro, a disseminação do AMC e, portanto, aumenta suas chances de sucesso. Do ponto de vista do hospedeiro (alvo), a interação apresenta-se totalmente negativa. O alvo morre em conseqüência do AMC ou do predador ou parasitóide. Do ponto de vista do parasitóide/predador o efeito é muito mais complexo:

- ele pode ser deletério para o predador/parasitóide;
- pode ser indiretamente prejudicial se afetar seu vigor, reprodução, capacidade de parasitismo, etc.;
- pode ainda ser benéfico quando não afeta o predador/parasitóide, mas favorece a disponibilidade da presa;
- ou pode ainda não alterar em nada a sua atuação (Vinson, 1989).

Apesar dos resultados de laboratório com relação a invertebrados não-alvo serem de extensão duvidosa para estabelecer a segurança no campo, muitos requisitos para registro ou mesmo experimentos limitados em campo requerem testes de laboratório sobre alguns invertebrados não-alvo. Esses testes, conforme discutido anteriormente, costumam incluir também organismos-teste representativos dos insetos sociais (Vandemberg, 1990).

Avaliação sobre organismos aquáticos

O ambiente aquático (rios, lagos, estuários) apresenta sítios potenciais para acumulação, e às vezes concentração, de muitos subprodutos das atividades humanas. Exemplos comuns de estudos e constatações deste tipo são o acúmulo de

fertilizantes em lagos, devido ao arraste desses químicos que ocorre nos solos que o rodeiam; o acúmulo de detritos industriais em rios; e o acúmulo de pesticidas usados diretamente nas águas para o controle de vetores, cujos estágios iniciais de desenvolvimento se encontram em ambientes aquáticos (Dejoux & Elouard, 1989; Couch & Foss, 1989).

Como por muito tempo os AMCs foram aplicados apenas em áreas agrícolas ou em reflorestamento, pouca atenção foi dada aos efeitos tóxicos que poderiam ocorrer nas águas ou na sua fauna. Com a preocupação com respeito aos riscos de transporte ou arraste dos pesticidas para as águas (tanto por arraste no solo como pela deriva durante aplicações), e observando as aplicações diretas em águas, uma melhor compreensão dos impactos nos ambientes aquáticos se faz necessária.

A natureza particular dos testes para avaliar a segurança de uso dependerá da maneira como o AMC será utilizado na prática. A avaliação de um AMC a ser usado no controle de mosca doméstica (ambiente essencialmente doméstico) será muito diferente daquela em que se estuda o efeito de um AMC para controle de culicídios ou simulídeos, na qual o microrganismo será aplicado diretamente na água.

A proposta apresentada por Jonsson & Maia (1999), para implementação da avaliação de risco de AMCs sobre organismos aquáticos não-alvo, sugere estudos com organismos representativos de ecossistemas brasileiros pertencentes a diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, tais como organismos fitoplanctônicos, zooplanctônicos, macrófitas aquáticas e vertebrados aquáticos. A escolha das espécies, já discutida neste capítulo, considera a ampla distribuição no território nacional, a facilidade de criação e manipulação em condições laboratoriais ou em outra forma de cativeiro. É recomendável, na medida do possível, a utilização de espécies que sendo predadoras ou não do organismo-alvo, se alimentem deste no seu habitat natural. Um outro critério é a escolha do organismo-teste de espécies que no seu habitat natural sejam hospedeiras de microrganismos patogênicos que estejam filogeneticamente relacionados ao AMC em estudo.

Controle de qualidade

Em muitos países da Comunidade Européia dados ou informações complementares são exigidos além dos padrões das análises ecotoxicopatológicas já descritos, de forma a demonstrar a pureza dos lotes gerados na produção do AMC. A natureza precisa desses testes não costuma ser preestabelecida, porém uma proposta aprovada pela IUPAC (International Union of Physics and Chemistry) para inseticidas bacterianos apresenta um padrão microbiológico de contaminação aceitável, semelhante ao estabelecido para ração animal (Quinlan, 1989):

Mesófilos viáveis	$< 1 \times 10^5$ /g
Leveduras e bolores viáveis	< 100/g
Coliformes	< 10 /g
Staphylococcus aureus	< 1/g
Salmonella	< 1/10g
Estreptococo Lancefield grupo D	$< 1 \times 10^4$ g

Devido às limitações do conhecimento atual sobre especificidade e relações bióticas e abióticas dos AMCs com o ambiente, a melhor forma de garantir segurança a longo prazo para os não-alvo é efetivar o monitoramento durante e após aplicação, uma vez concluídos os testes preliminares de laboratório.

Na avaliação do potencial de risco e de todas as análises aí consideradas, deve-se ter em mente a realidade do dia-a-dia, e não se estabelecer parâmetros mais rígidos do que aqueles que norteiam a segurança da saúde humana. Por exemplo, existem fungos naturalmente presentes no ar que respiramos e que são notoriamente causadores de alergias em algumas pessoas. O mesmo tipo de problema deve ser esperado com AMCs à base de esporos fúngicos, como por exemplo, *Penicillium bilaiai*, aplicados no tratamento de sementes para aumentar o aproveitamento do fósforo pelo trigo (Cook, 1992).

Interpretação de dados

Para tomada de decisões, após ter em mãos os dados discutidos anteriormente, é necessário interpretar os resultados dos testes fundamentados em dados científicos. Entretanto, conflitos de interesse que digam respeito ao uso do

controle biológico precisam ser resolvidos politicamente, uma vez que não se pode aceitar que cientistas, individualmente, tomem este tipo de decisão pela sociedade como um todo. A legislação em vigência na Austrália (Biological Control Act, 1984) pode servir de exemplo. Ela prevê um período de debate, seguido de decisão política sobre o interesse ou não de se utilizar o controle biológico (Harris, 1990).

Análises qualitativas e quantitativas da forma como o AMC se apresenta no ambiente, antes e depois da aplicação, são essenciais para a avaliação dos resultados obtidos e muito mais importantes ainda, pois estarão diretamente ligadas à implementação e sucesso de novos projetos. Métodos diferentes podem ser usados para monitorar a densidade populacional do hospedeiro e do agente de controle. Atualmente, podem-se aliar a estas avaliações tabelas de vida, modelos de simulação matemática e análises fotográficas que permitirão uma avaliação mais apurada dos resultados obtidos.

Harmonização

Apesar de parecer lógico que países que dividem fronteiras devam participar na decisão sobre introduções e uso de AMCs, especialmente porque esses agentes poderão atravessar suas fronteiras, a implementação desta proposta deve ser cautelosamente discutida (Moraes et al., 1997). Acredita-se que países no mesmo ecossistema devem avaliar, conjuntamente, os padrões mínimos necessários a serem adotados por cada um deles, em termos de introduções, controle de qualidade, qualificação de pessoal e procedimentos operacionais exigidos. Os estudos de casos de introduções e usos de AMCs pelo mundo, devem sempre estar em mente nestas compatibilizações.

A harmonização é o objetivo dos órgãos fiscalizadores de muitos países. A aplicação de princípios e métodos científicos deve dar suporte a padrões harmonizados e universais de registro e legislação de AMCs (Grandy & Richards, 1994; Lisansky, 1994). A relação entre mercados mundiais pela globalização da economia enfatiza sua necessidade e atualidade. Segundo Houghton (1994), a harmonização pode ocorrer de três formas:

- por cooperação cientifica;

- por equivalência;
- por unificação.

A primeira pode ser exemplificada pelos grupos científicos que dão suporte à FAO e OECD, nas quais os pontos de vista de especialistas reunidos em comitês são discutidos e ponderados. Normalmente, os trabalhos são limitados à metodologia científica para pesquisa e de suporte para registro (FAO, 1996; OECD, 1995).

A equivalência é o conceito subentendido no recente tratado NAFTA, no qual um país reconhece medidas dos outros membros do Tratado, mesmo que elas difiram das suas próprias, desde que elas atinjam um mínimo de segurança ou outro parâmetro que esteja sendo alvo do comércio. Na unificação, todos os processos e medidas existentes são substituídos por uma única válida para todos os participantes do tratado.

Também na região Cone Sul, frente ao tratado do Mercosul, os países têm se reunido para harmonizar suas legislações, de forma que as mesmas garantam um mínimo de segurança para os países membros, baseadas em discussões de grupos com capacidade científica reconhecida.

Análise econômica e de mercado

A atividade agrícola busca a produção de alimentos de qualidade em quantidade e, preferencialmente, a baixo custo. Esta produção tende a acompanhar a evolução da população e, conseqüentemente, faz-se necessária a incorporação de novas áreas ou o aumento da produtividade das áreas tradicionais.

O aumento da produtividade se vê ameaçado pela presença de pragas, doenças e plantas invasoras, que provocam cerca de 35% de redução na produção. Essas perdas se devem muito provavelmente à quebra do ecossistema natural, porém ninguém quer se privar de alimento. Tal fato, em função do modelo de desenvolvimento escolhido, obriga à prática de monocultura, provocando ainda maior desequilíbrio. Objetivando diminuir as perdas, o agricultor lança mão do uso dos pesticidas químicos (Foloni, 1995).

Para evitar surpresas, que são sempre indesejáveis, um projeto de controle biológico (seja ele sobre produção ou comercialização do produto, ou um

programa extenso, englobando o manejo de pragas) deve ser examinado quanto aos custos e benefícios esperados, tanto em base monetária como em termos ecológicos. Geralmente, o controle biológico é mais interessante quando os custos ecológicos são menores do que os de outros métodos alternativos, incluindo o custo de não se fazer nada; entretanto, sempre há algum custo envolvido (Harris, 1990).

Devido ao crescente número de produtores e ao relativamente pequeno mercado para biopesticidas, uma grande e crescente competição vem se mostrando nos últimos anos, resultando num decréscimo do preço dos produtos no mercado. Entretanto, o apoio técnico dado costuma ser incluído no preço do produto e este custo vem sendo mais difícil de se justificar, uma vez que os preços dos produtos caíram e as margens de lucro também. E o efeito desta pressão pode desequilibrar o sucesso do controle biológico, uma vez que o apoio técnico no campo é indispensável para o seu sucesso (Ravensberg, 1994).

Em 1994, os produtores de *Bacillus thuringiensis* (Bt) eram os principais participantes no setor de pesticidas, como se pode observar na Figura 4.

Entre as décadas de 60 e 70, o mercado de biopesticidas se baseou exclusivamente em Bt para controle de insetos da ordem Lepidoptera. Como o produto parecia ser simples e barato de obter, muitas indústrias viram nesse mercado um lucro fácil. Entretanto, a potência das linhagens determinadas em laboratório não reflete diretamente sua ação em condições de campo.

Ao redor dos anos 80, muitas variedades de Bt foram descobertas e determinou-se sua atividade contra Diptera (mosquitos e moscas) e Coleoptera. Além da ampliação do espectro de atuação do Bt, investiu-se em abertura de novos mercados, tecnologia de produção, inovação dos produtos (novas formulações) e preços competitivos.

Após mais de 25 anos de aplicação comercial dos agentes de biocontrole, mais e mais autoridades têm sentido a necessidade de regulamentar o uso desses agentes de forma semelhante aos outros agentes de controle. Isso tem resultados positivos e negativos sobre o controle biológico. A grande variação entre as normas nos diferentes países exige que se tenha um número muito grande de dados e informações, encarecendo o processo e limitando o mercado de certa forma às grandes indústrias, como retratado na figura 4 (Ravensberg, 1994).

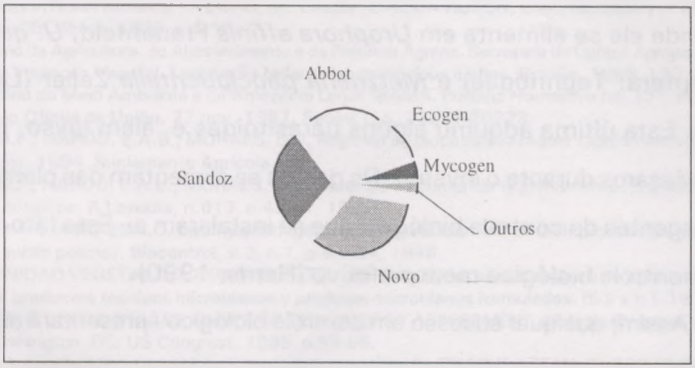


FIGURA 4. Divisão do mercado por indústrias (adaptado de Lisansky & Coombs, 1994)

O declínio no uso de agroquímicos gerará um número crescente de nichos de mercado para os quais os AMCs se mostram apropriados. Os fatores de mercado que favorecem os biopesticidas incluem: preferência crescente do consumidor por produtos sem agrotóxicos; aumento de mercado para os produtos de cultivo orgânico; desenvolvimento de um sistema agrícola mais sustentável, usando programas de manejo integrado; estabilização e harmonização de regulamentação governamental para registro de AMCs contendo microrganismos de ocorrência natural ou engenheirados; presença de muitas companhias de grande porte no mercado de biopesticidas.

Considerações finais

Poderíamos concluir que com a evolução das ciências agronômicas, os ganhos recentes da biotecnologia e da engenharia genética, a utilização dos conceitos do manejo de pragas utilizado, mais a implementação do conceito de agricultura sustentável, a tendência futura é a de reduzir cada vez mais a dependência exagerada

de produtos fitossanitários prejudiciais ao meio ambiente, no qual o homem é considerado.

Entretanto, a complexidade das relações entre os diferentes componentes ambientais nos indica claramente que ainda estamos longe da concretização da agricultura "perfeita". Um exemplo interessante, no qual a complexidade dos resultados que poderia levar ao impedimento de uso de um AMC mostrou que ele é mantido "naturalmente" dentro dos limites aceitáveis, é o do uso de um ácaro. O ácaro predador *Pyemotes tritici* Lagreze-Fossat & Montane (Acarina) se tornou numeroso em British Columbia, onde ele se alimenta em *Urophora affinis* Frauenfeld, *U. quadrifasciata* (Meigen) (Diptera: Tephritidae) e *Metzneria paucipucntella* Zeller (Lepidopetera: Gelechiidae). Esta última adquiriu alguns parasitóides e, além disso, passou a ser atacada por pássaros durante o inverno. Os gamos se alimentam das plantas daninhas, ingerindo os agentes de controle biológico que se instalaram aí. Este fato foi suficiente para fazer o controle biológico menos efetivo (Harris, 1990).

Assim, qualquer sucesso em controle biológico apresentará algum impacto ecológico. Para melhorar ou promover a imagem do controle biológico, é interessante que se conheçam os "porquês" da sua ação e esses sejam bem explicados. A grande preocupação geralmente está centrada na possibilidade do aumento populacional do AMC. Entretanto, quando isso acontece, a população hospedeira entra em colapso muito mais rapidamente do que o desenvolvimento do AMC, o que faz com que o problema não persista.

As análises de risco ambiental regulamentadas para o uso de AMCs são necessárias e imprescindíveis. Legisladores e cientistas devem trabalhar em conjunto com o objetivo de desenvolver testes que consigam avaliar o risco e garantir a segurança ambiental de um AMC. A relativa especificidade dos agentes microbianos exige que eles sejam estudados caso-a-caso e que cada situação reflita um conjunto único de interações entre o AMC, o organismo-alvo e os organismos não-alvo potenciais. Nenhum conjunto padrão de espécies não-alvo é aplicável para todos os AMCs. Também, quando o dano ao ecossistema é avaliado, não existe um ponto final para ser analisado e esse é um fator que limita o desenvolvimento de protocolos gerais.

Aos órgãos de regulamentação, cabe a tarefa de facilitar o desenvolvimento e registro de AMCs, ao mesmo tempo em que minimizam o risco de danos ao ambiente e à saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZAWA, K. Registration requirements and safety considerations for microbial pest control agents in Japan. In: LAIRD, M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W., ed. **Safety of microbial insecticides.** Boca Raton: CRC Press, 1989. p.31-39.

ALEXANDER, M. Fate and movement of microorganisms in the environment. Part 1: survival and growth of bacteria. **Environmental Management**, v.10, n.4, p. 463-493, 1986.

BETZ, F.S.; FORSYTH, S.F.; STEWART, W.E. Registration requirements and safety considerations for microbial pest control agents in North America. In: LAIRD, M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W., ed. **Safety of microbial insecticides.** Boca Raton: CRC Press, 1989. p.3-10.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal. **Legislação federal de agrotóxicos e afins.** Brasília, 1995. 120 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente e da Amazônia Legal. IBAMA. Portaria Normativa no. 131, de 03 de novembro de 1997. **Diário Oficial da União**, 22 nov. 1997. Seção 1, p. 20271-20273.

CAPALBO, D.M.F.; NARDO, E.A.B.; MORAES, G.J. Registro de biopesticida requer regulamentação. **O Estado de São Paulo**, 21 dez. 1994. Suplemento Agrícola.

CAPALBO, D.M.F.; NARDO, E.A.B.; MORAES, G.J. É preciso implementar urgentemente no Brasil uma legislação para produtos biológicos. **A Lavoura**, n.613, p.40-41, 1995.

CAPALBO, D.M.F.; MORAES, I.O. Entomopathogens: impact assessment of their production and utilization, and its effects on public policies. **Biocontrol**, v.2, n.1, p.57-64, 1996.

COMITE DE SANIDAD VEGETAL DEL CONO SUR. GTP. CB. **Requisitos para el registro de agentes de control biologico microbiano, productos tecnicos microbianos y produtos microbianos formulados.** [S.l: s.n.], 1997.

CONGRESS OF THE UNITED STATES. OFFICE OF TECHNOLOGY ASSESSMENT. **Biologically based technologies for pest control.** Washington, DC: US Congress, 1995. p.55-56.

COOK, R.J. Reflections of a regulated biological control researcher. In: CHARUDATTAN, R.; BROWNING, H.W. **Regulations and guidelines**: critical issues in biological control. Gainsville: University of Florida, 1992. p.9-24

COOK, R.J.; BRUCKART, W.L.; COULSON, J.R.; GOETTEL, M.S.; HUMBER, R.A.; LUMSDEN, R.D.; MADDOX, J.V.; McMANUS, M.L.; MOORE, L. Safety of microrganisms intended for the pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. **Biological Control**, v.7, p. 333-351, 1996.

COOLEY, R.J. Resistance of diammondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. **Journal of Economic Entomology**, v.86, p.697-705, 1993.

COUCH, J.A.; FOSS, S.S. Potential impact of microbial insecticides on the estuarine and marine environments. In: LAIRD, M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W., ed. **Safety of microbial insecticides.** Boca Raton: CRC Press, 1989. p.85-97.

DAVIS, B.D. Bacterial domestication: underlying assumptions. **Science**, v.235, p.1329-1332, 1987.

DEJOUX, C.; ELOUARD, J.-M. Potential impact of microbial insecticides on the freshwater environment, with special reference to the WHO/UNDP/World Bank, onchocerciasis control programme. In: LAIRD M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W., ed. **Safety of microbial insecticides.** Boca Raton: CRC Press, 1989. p.65-83.

DROBNIEWSKI, F.A. The safety of *Bacillus* species as insect vector control agents. **Journal of Applied Bacteriology**, v.76, p.101-109, 1994.

DULMAGE, H.T.; AIZAWA, K. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. In: KURSTAKI, E., ed. **Microbial and viral pesticides.** New York: Marcel Dekker, 1982. p.209-237.

ENTWISTLE, P.F.; ADAMS, P.H.W.; EVANS, H.F. Epizootiology of a nuclear polyhedrosis virus in European spruce sawfly (*Gilpinia hercyniae*): the rate of passage of infective wirus through the gut of birds during cage tests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 31, p. 307-312, 1978.

ENTWISTLE, P.F.; ADAMS, P.H.W.; EVANS, H.F.; RIVERS, C.F. Epizootiology of a nuclear polyhedrosis virus (Baculoviridae) in European spruce sawfly (*Gilpinia hercyniae*): spread of disease from small epicentres in comparison with spread of baculovírus diseases in other hosts. **Journal of Applied Ecology**, v.20, p.473-487, 1983.

ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S., ed. ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide:** theory and practice. Chichester: John Willey & Sons, 1993.

EVANS, H.F. Factors in the success and failure of microbial insecticides in forestry. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 6., 1998, Sapporo, Japão. **Proceedings**. Sapporo, 1998. p.58-63.

FAO. **Code of conduct for the import and release of exotic biological control agents.** Rome: FAO, 1996. 12p.

FAULKNER, P.; BOUCIAS, D.G. Genetic improvement of insect pathogens: emphasis on the use of baculoviruses. In: HOY, M.A.; HERZOG, D.C., ed. **Biological control in agricultural IPM systems.** Orlando: Academic Press, 1985. p.263-280.

FOLONI, L.L. Avaliação de risco ambiental decorrente do uso de pesticidas. In: PUIGNAU, J.P., ed. **Avances en siembra directa.** Montevideo: IICA-PROCISUR, 1995. p.125-160.

FUXA, J.R. Fate of released entomopathogens with reference to risk assessment of genetically engineered microorganisms. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v.35, p.12-24, 1989.

FUXA, J.R. Impact of the release of entomopathogens in the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p.349-369, 1992.

FUXA, J.R.; RICHTER, A.R.; STROTHER, M.S. Detection of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus after viral release in Louisiana Soybean. **Journal of Entomological Science**, v.28, n.1, p. 51-60, 1993.

GILLET, J.W. Fate and movement of microorganisms in the environment. Part 3: genetic stability of engineered microorganisms. **Environmental Management**, v. 10, n.4, p.488-493, 1986.

GOETTEL, M.S.; POPRAWSKI, T.J.; VANDENBERG J.D.; LI, Z.; ROBERTS, D.W. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: LAIRD, M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W., ed. **Safety of microbial insecticides.** Boca Raton: CRC Press, 1990. p.209-231.

GRANDY, N.J.; RICHARDS, J. International harmonisation of pesticide control procedures – the OECD pesticides programmes. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE. Pests and diseases, 1994, Brighton, UK. **Proceedings.** Farnham: BCPC, 1994. p.1409-1418.

HARRIS, P. Environmental impact of introduced biological control agents. In: MACKAUER, M.; EHLER, L.E.; ROLAND J., ed. **Critical issues in biological control.** Andover: Intercept, 1990. p.289-300.

HOUGHTON, A.M. Should we reduce the politics of registration: by harmonisation or by better science? In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE. Pests and diseases, 1994, Brighton, UK. **Proceedings.** Farnham: BCPC, 1994. p.1389-1396.

JAQUES, R.P. Persistance, accumulation and destruction of nuclear polyhedrosis and granulosis viruses. In: SUMMERS, M.; ENGLER, R.; FALCONI, L.A.; VAIL, P.B., ed. **Baculovíruses for insect pest control:** safety considerations. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1975. p.90-99.

JAQUES, R.P. The persistence of a nuclear polyhedrosis virus in the habitat of the host insect, *Trichoplusia ni*. I. Polyhedra deposited on foliage. **Canadian Entomologist**, v.99, p.785-794, 1976.

JONSSON, C.M.; MAIA, A.H.N. **Protocolos de avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para fins de registro:** uma proposta para os órgãos federais registrantes. v. 3. Testes toxicopatológicos em organismos não-alvo do ambiente aquático. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1999. No prelo.

KANDYBIN, N.V.; SMIRNOV, O.V. Registration requirements and safety considerations for microbial pest control agents in the U.S.S.R. and adjacent Eastern European countries. In: LAIRD M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W., ed. **Safety of microbial insecticides.** Boca Raton: CRC Press, 1989. p.19-30.

LAIRD, M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W. Preface. In: LAIRD M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W., ed. **Safety of microbial insecticides.** Boca Raton: CRC Press, 1989. não paginado.

LEVIN, M.A.; STRAUSS, H. Overview of risk assessment. In: LEVIN, M.A.; STRAUSS, H., ed. **Risk assessment in genetic engineering.** New York: McGraw-Hill, 1993. p.1-17.

LISANSKY, S.G. International harmonization in biopesticide registration and legislation. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE. Pests and diseases, 1994, Brighton, UK. **Proceedings.** Farnham: BCPC, 1994. p.1397-1402.

LISANSKY, S.G.; COOMBS, J. Developments in the market for biopesticides. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE. Pests and diseases, 1994, Brighton, UK. **Proceedings.** Farnham: BCPC, 1994. p.1049-1054.

LYNCH, M.R. **Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicology of pesticides.** Brussels: Society of Environmental Toxicology and Chemistry, 1995. 54p.

MADDOX, J. V. The effects of regulations on the use of insect pathogens as biological control agents. In: CHARUDATTAN, R.; BROWNINE, H.W., ed. **Regulations and guidelines**: critical issues in biological control. Gainesville: University of Florida – Institute of Food and Agricultural Sciences, 1992. p.73-81.

MANUAL de avaliação de impactos ambientais: MAIA. Curitiba: SUREHMA/GTZ, 1992. 1 v.

MEADOWS, M.P. *Bacillus thuringiensis* in the environment - ecology and risk assessment. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S., ed. ***Bacillus thuringiensis*:** an environmental biopesticide - theory and practice. Chichester: John Wiley, 1993. p.193-220.

MORAES, G.J. de; SÁ, L.A.N. de; TAMBASCO, F.J. International exchange of microorganisms for biological control of pest species: a research point of view. In: MARTINS, M.T.; SAITO, M.I.Z.; TIEDJE, J.M.; HAGLER, L.C.N.; DÖBEREINER, J.; SANCHEZ, P.S., ed. **Progress in microbial ecology.** São Paulo: SBM/ICOME, 1997. p.413-418.

MOSCARDI, F.; CORSO, I.C. Ação de *Baculovírus anticarsia* sobre a lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*, Hübner, 1818) e outros lepidopteros. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2., 1981, Londrina, PR. **Anais.** Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1981. p.51-57.

MOSCARDI, F.; ALLEN, G.E.; GREENE, G.L. Control of the welvetbean caterpillar by nuclear polyhedrosis virus and insecticides and impact of treatments on the natural incidence of the entomopathogenic fungus *Nomurea rileyi*. **Journal of Economic Entomology**, v.74, p.480-485, 1981.

NARDO, E.A.B.; CAPALBO, D.M.F. Avaliação ecotoxicológica de agentes microbianos de controle de pragas. **O Biológico**, São Paulo, v.59, n.2, p. 63-68, jul./dez., 1997.

NARDO, E.A.B. De; CAPALBO, D.M.F. Utilização de agentes microbianos de controle de pragas: mercado, riscos e regulamentação. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L., ed. **Controle biológico.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. v.1, p.231-262. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos,11).

NARDO, E.A.B. De; CAPALBO, D.M.F.; MORAES, G.J.; OLIVEIRA, M.C.B., coord. **Requisitos para a análise de risco de produtos contendo agentes microbianos de controle de organismos nocivos:** uma proposta para os órgãos federais registrantes. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1995. 42p. (EMBRAPA/CNPMA. Documentos, 2).

NARDO, E.A.B. De; MORAES, G.J. de; SÁ, L.A.N.de. Regulamentação de uso de agentes microbianos de controle. In: ALVES, S.B., ed. **Controle microbiano de insetos.** 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.1119-1142.

NARDO, E.A.B. De; MORAES, G.J. de; OLIVEIRA, M.C.B. de; CAPALBO, D.M.F.; SÁ, L.A.N. de; LENCIONE, F.; MAIA, A.H.N.; WATANABE, M.A.; JONSSON, C.M. **Protocolo de avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro:** uma proposta para os órgãos federais registrantes. v. 4. Testes toxicopatológicos em organismos não-alvo do ambiente terrestres: aves, artrópodos benéficos, organismos de solo e plantas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. No prelo.

OECD Environment Monograph - data requirements for registration of biopesticides in OECD member countries, survey results. Paris: OECD, 1995.

PESTICIDE ASSESSMENT GUIDELINES - Subdivision M. Microbial pest control agents and biochemical pest control agents. Washington, D.C.: US. Enviromental Protection Agency-Office of Pesticides and Toxic Substances, 1989. 192p.

QUINLAN, R.J. Registration requirements and safety considerations for microbial pest control agents in the European Economic Community. In: LAIRD, M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W., ed. **Safety of microbial insecticides.** Boca Raton: CRC Press, 1989. p.11-18.

RAVENSBERG, W.J. Biological control of pests: current trends and future prospects. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE. Pests and diseases, 1994, Brighton, UK. **Proceedings.** Farnham: BCPC, 1994. p.591 600.

RICHTER, A.R.; FUXA, J.R. Timing, formulation, and persistence of a nuclear polyhedrosis virus and microsporidium for control of the velvetbean caterpillar (Lepidoptera:Noctuidae) in soybeans. **Journal of Economic Entomology,** v.77, p. 1299-1306, 1984.

SAIK, J.E.; LACEY, L.A.; LACEY, C.M. Safety of microbial insecticides to vertebrates - domestic animals and wildlife. In: LAIRD M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W., ed. **Safety of microbial insecticides.** Boca Raton: CRC Press, 1989. p.115-132.

SHIGA, M.; YANADA, H.; OHO, N.; NAKAZAWA, H.; ITO, Y.A. A granulosis virus, possible biological control agent for control of *Adoxophyes orana* (Lepidoptera: Tortrocidae) in apple orchards. II. Semipersistent effect of artificial dissemination into an apple orchardd. **Journal of Invertebrate Pathology,** v.21, p.149-157, 1973.

SIEGEL, J.P.; SHADDUCK, J.A. Safety of microbial insecticides to vertebrates – humans. In: LAIRD M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W., ed. **Safety of microbial insecticides.** Boca Raton: CRC Press, 1989. p.101-113.

SOLOMON, K.R. **Ecotoxicological risk assessment of pesticides.** Guelph: University of Guelph – Centre for Toxicology, 1996. 42p.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; MOSCARDI, F. Desenvolvimento de resistência a Baculoviroses. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4., 1994, Gramado, RS. **Anais.** Pelotas: EMBRAPA-CPACT, 1994. p. 85-90.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; PEREIRA, R.M.; ALVES, S.B. Impacto ambiental de entomopatógenos. In: ALVES, S.B., ed. **Controle microbiano de insetos.** 2.ed. Piracicaba: FEALQ 1998. p.1075-1096.

TEAKLE, R.E.; JENSSEN, J.M.; MULDER, J.C. Susceptibility of *Heliothis armiger* (Lepidoptera: Noctuidae) on sorghum to nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Economic Entomology,** v.78, p.1373-1378, 1985.

UNDEEN, A. H.; MADDOX, J. V. The infection of nonmosquito hosts by injection with spores of the microsporidian *Nosema algerae*. **Journal of Invertebrate Pathology,** v.22, p.258-265, 1973.

VINSON, S.B. Potential impact of microbial insecticides on beneficial arthropods in the terrestrial environment. In: LAIRD M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W., ed. **Safety of microbial insecticides.** Boca Raton: CRC Press, 1989. p.43-64.

WAAGE, J. The use of exotic organisms as biopesticides: some issues. In: HOKKANEM, H.M.T.; LYNCH, J.M., ed. **Biological control:** benefits and risks. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p.93-100. (Plant Microbial Biotechnology Research Series, 4)

Itamar Soares de Melo é engenheiro agrônomo, com mestrado e doutorado ela Esalq/USP e pós doutorado pela Universidade de Londres. É pesquisador da Embrapa Meio Ambiente e professos de pós-graduação na USP (Biotecnologia), UNESP (Botucatu e Rio Claro) e UFSCar.

João Lúcio de Azevedo é engenheiro agrônomo, com doutorado na USP e Ph.D pela Universidade de Shefield, Grã-Bretanha. Tem pós-doutorado pela Universidade de Manchester. É professor de cursos de graduação e pós-graduação na USP, Unicamp, UFG, UFPr, Unesp, UFRJ, UFPe, UCS e UMC

Embrapa

CONTROLE BIOLÓGICO




Ministério da Agricultura e do Abastecimento

ISBN 85-85771-09-7
9 788585 771096

CONTROLE BIOLÓGICO