

Controle biológico.

2000

LV-PP-1998.00189



CNPMA-3536-1



# CONTROLE BIOLÓGICO



Editores

ITAMAR SOARES DE MELO

JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO



**brapa**

8.00189

VOLUME

1

**Itamar Soares de Melo** é engenheiro agrônomo, formado pela UFAL. Fez seu mestrado e doutorado na Universidade de São Paulo/ESALQ, na área de Genética da Resistência de Plantas a Doenças. Tem pós-doutorados pela Universidade de Londres/Birkbeck College e King's College na área de Biologia Molecular. É pesquisador científico da EMBRAPA-CNPMA e professor de cursos de pós-graduação na USP, UNESP (campi de Botucatu, Jaboticabal e Rio Claro) e UFSCar, nas áreas de Controle Biológico e Biodegradação de Pesticidas.

**João Lúcio de Azevedo** é engenheiro agrônomo, formado pela Universidade de São Paulo/ESALQ. Fez seu doutorado na USP, na área de Genética de Fungos e Ph.D. pela Universidade de Sheffield, Grã-Bretanha. Tem pós-doutorado pela Universidade de Manchester na área de Biologia Molecular. É professor de cursos de graduação ou pós-graduação na USP, UNICAMP, UFG, UFPR, UNESP, UFRJ, UFPE, UCS e UMC nas áreas de Genética de Microrganismos e Biotecnologia.

# CONTROLE BIOLÓGICO



CONTROLE  
BIOLÓGICO

**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**

Presidente: Fernando Henrique Cardoso

Ministro da Agricultura e do Abastecimento: Francisco Sergio Turra

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

Presidente: Alberto Duque Portugal

Diretores: Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Elza Angela Battaglia Brito da Cunha

**Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação  
de Impacto Ambiental**

Chefe Geral: Bernardo von Rajj

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento: Deise M. Fontana Capalbo

Chefe Adjunto Administrativo: Rosângela Blotta Abakerli

AUTORES

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação  
de Impacto Ambiental**

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

# CONTROLE BIOLÓGICO

---

Editores

Itamar Soares de Melo

João Lúcio de Azevedo

1

Embrapa Meio Ambiente

Exemplares dessa publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP 340 – km 127,5 – Bairro Tanquinho Velho

Caixa Postal 69

13820-000 – Jaguariúna, SP

Fone: (019) 867-8700

Fax: (019) 867-8740

e.mail: adi@cnpma.embrapa.br

Produção gráfica: Regina Lucia Siewert Rodrigues

Franco Ferreira de Moraes

Normatização: Maria Amélia de Toledo Leme

Tiragem: 1.000 exemplares

Projeto gráfico e editoração eletrônica: Estúdio Graal

#### CATÁLOGO NA FONTE DO DEPARTAMENTO NACIONAL DO LIVRO

C764

Controle biológico, volume 1/editores Itamar Soares de Melo, João Lucio de Azevedo – Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998.

ISBN 85-85771-02-X

Inclui bibliografia

1. Pragas – Controle biológico. 2. Pragas agrícolas – Controle biológico. I. Melo, Itamar Soares de. II. Azevedo, João Lucio de. III. EMBRAPA. IV. Série.

CDD-632.96

# AUTORES

## **Alcides Moino Jr.**

Departamento de Entomologia, ESALQ/USP  
Av. Pádua Dias, 11, CEP 13418-900, Piracicaba, SP

## **Antenor Nascimento Ferraz Filho**

Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo  
– SUCEN, Mogi-Guaçu, SP

## **Aquiles Eugênio Piedrabuena**

Departamento de Genética e Evolução, IB/Unicamp  
CEP 13081-970, Campinas, SP

## **Claudio Luiz Messias**

Departamento de Genética e Evolução, IB/Unicamp  
CEP 13081-970, Campinas, SP

## **Deise M. F. Capalbo**

EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa e Monitoramento  
de Avaliação de Impacto Ambiental  
Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000  
Caixa Postal 69, Jaguariúna, SP

## **Elizabeth A. B. De Nardo**

EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa e Monitoramento  
de Avaliação de Impacto Ambiental  
Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000  
Caixa Postal 69, Jaguariúna, SP

## **Itamar Soares de Melo**

EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa e Monitoramento  
de Avaliação de Impacto Ambiental  
Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000  
Caixa Postal 69, Jaguariúna, SP

## **João Lúcio de Azevedo**

Departamento de Genética, ESALQ/USP  
Caixa Postal 9, CEP 13418-900, Piracicaba, SP

## **João Roberto Spotti Lopes**

Departamento de Entomologia, ESALQ/USP  
Av. Pádua Dias, 11, CEP 13418-900, Piracicaba, SP

**Luiz Francisco Angeli Alves**

Departamento de Entomologia, ESALQ/USP  
Av. Pádua Dias, 11, CEP 13418-900, Piracicaba, SP

**Luzia Doretto Paccola-Meirelles**

Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário  
Rodovia Celso Garcia, Cid. km 380  
Caixa Postal 6001, CEP 86051-970, Londrina, PR

**Maria Cléria C. Valadares-Inglis**

EMBRAPA – Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia  
SAIN Parque Rural, Caixa Postal 02372, CEP 70770-900, Brasília, DF

**Marlene T. De-Souza**

Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília  
Campus Universitário, CEP 70910-900, Brasília, DF

**Ricardo Henri Rodrigues Destefano**

Departamento de Genética e Evolução, IB/Unicamp  
CEP 13081-970, Campinas, SP

**Sergio Batista Alves**

Departamento de Entomologia ESALQ/USP  
Av. Pádua Dias, 11, CEP 13418-900, Piracicaba, SP

**Sueli Corrêa Marques de Mello**

EMBRAPA – Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia SAIN  
Parque Rural, Caixa Postal 02372, CEP 70770-900, Brasília, DF

**Vera Lúcia Correa C. Rodrigues**

Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo  
– SUCEN, Mogi-Guaçu, SP

**William Shiler**

EMBRAPA – Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia  
SAIN Parque Rural, Caixa Postal 02372, CEP 70770-900, Brasília, DF

**Zilda Maria de Araujo Ribeiro**

EMBRAPA – Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia  
SAIN Parque Rural, Caixa Postal 02372, CEP 70770-900, Brasília, DF

# PREFÁCIO

Embora os pesticidas químicos sejam usados com relativo sucesso na agricultura, seus efeitos sobre organismos não-alvo, os problemas de contaminação de águas superficiais e subterrâneas, resíduos em alimentos e o surgimento de populações de pragas resistentes têm incentivado o desenvolvimento de métodos alternativos de controle.

Institutos de pesquisa, universidades e empresas privadas têm, ultimamente, envidado esforços para desenvolver novos biopesticidas, incluindo bactérias, vírus, fungos e nematóides.

Historicamente, o Brasil tem mantido a tradição em práticas de controle biológico com um significativo quadro de pesquisadores dedicados exclusivamente às diversas áreas do conhecimento do biocontrole.

O treinamento de estudantes em cursos de pós-graduação, disseminados em algumas universidades brasileiras, com certeza despertará interesse e maior divulgação dessa modalidade de controle de pragas junto aos agricultores e à sociedade em geral. Este livro vem, pois, preencher uma lacuna com textos científicos escritos em língua portuguesa por profissionais ativamente envolvidos em pesquisas sobre controle biológico.

Há, hoje, um grande interesse na exploração da variabilidade natural, visando o aproveitamento de novas linhagens microbianas para proteger as culturas agrícolas contra insetos, fitopatógenos, ervas daninhas e vetores. As interações negativas (predação, amensalismo e parasitismo) formaram a base para o controle biológico. Ademais, a biotecnologia tem avançado na busca de tornar algumas linhagens microbianas mais eficientes e adaptadas, bem como em uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos no biocontrole. O capítulo 7 discute o potencial da engenharia genética aplicada ao controle biológico, e o capítulo 6, o melhoramento de microrganismos.

Uma lacuna que ainda permanece deficiente em pesquisas na área de controle biológico diz respeito à ecologia dos próprios agentes microbianos, principalmente em microhabitats extremamente heterogêneos. Outra área que tem recebido pouca atenção inclui problemas de doenças transmitidas por vetores. O capítulo 4 é devotado ao controle de vetores transmissores da doença de Chagas, e o capítulo 5, ao controle de vetores de doenças de plantas.

Desde que vários biopesticidas estão comercialmente disponíveis, o capítulo 8 discute o uso e comercialização desses produtos. O capítulo 1 discorre sobre o potencial de alguns agentes microbianos para controle de doenças de plantas; o capítulo 2 discorre sobre o controle microbiano de insetos e o capítulo 3, sobre o controle microbiano de ervas-daninhas.

Os editores desejam expressar seus sinceros agradecimentos aos autores que, com entusiasmo e esmero, se esforçaram para preparar seus capítulos, às colegas da Embrapa Maria Amélia de Toledo, Maria Cristina Tordin, Regina S. Rodrigues e Ivanilde Dispatto pelo inestimável apoio e à chefia da Embrapa Meio Ambiente, que empenhou todos os esforços para a publicação desta obra.

*Itamar Soares de Melo*  
*João Lucio de Azevedo*

# SUMÁRIO

## Capítulo 1

---

### AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Itamar Soares de Melo

Introdução 17

Microrganismos utilizados no controle de fungos fitopatogênicos 20

*Ampelomyces quisqualis*

*Bacillus* spp.

*Coniothyrium minitans*

*Gliocladium roseum* e *Gliocladium virens*

*Peniophora gigantea*

*Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens*

*Pythium oligandrum* e *Pythium nunn*

*Sporideonium sclerotivorum*

*Streptomyces*

*Talaromyces flavus*

*Trichoderma* spp.

*Verticillium lecanii*

Conclusões 58

Agradecimentos 60

Referências bibliográficas 60

## Capítulo 2

---

### **CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS-PRAGAS E SEU MELHORAMENTO GENÉTICO**

João Lúcio de Azevedo

Introdução **69**

Principais microrganismos empregados no controle biológico  
de insetos-pragas da agricultura **71**

Vírus

Bactérias

Fungos

Exemplos de emprego de microrganismos no controle biológico de insetos  
principalmente no Brasil **74**

Melhoramento genético no controle biológico de insetos **79**

Seleção

Mutação

Recombinação: ciclo sexual e parassexualidade **84**

Recombinação sexual

Processos parassexuais

Fusão de protoplastos **86**

A tecnologia do DNA recombinante (TDR) **86**

Exemplos da TRD no melhoramento de bactérias entomopatogênicas

Exemplos da TRD no melhoramento de vírus entomopatogênicos

Exemplos da TRD no melhoramento de fungos entomopatogênicos

Outras aplicações da TRD e técnicas dela derivadas no controle biológico

Perspectivas do melhoramento genético no controle biológico **91**

Considerações finais **92**

Referências bibliográficas **93**

## Capítulo 3

---

### **FITOPATÓGENOS COMO AGENTES DE CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS**

Sueli Correa Marques de Mello

Zilda Maria de Araujo Ribeiro

Introdução **97**

Estratégias de controle biológico de plantas daninhas com fitopatógenos **98**

Estratégia clássica

Estratégia inundativa

Estratégia aumentativa

Considerações básicas para o desenvolvimento de um programa de controle biológico com fitopatógenos **101**

Definição da espécie daninha alvo

Levantamento de agentes de controle biológico

Seleção dos agentes efetivos de controle

Determinação da especificidade de hospedeiro

Liberação e estabelecimento de agentes selecionados

Avaliação do efeito do agente introduzido na população da planta-alvo

Exemplos de aplicação de patógenos em controle biológico clássico **107**

Controle de *C. juncea* por *P. chondrillina*

Controle de *Rubus constrictus* e *R. ulmifolius* por *Phragmidium violaceum*

Controle de *Ageratina riparia* por *Entyloma compositarum*

Exemplos de aplicação de fungos como micoherbicidas **109**

Epidemiologia do controle biológico de plantas daninhas **111**

Variação genética e seus efeitos no controle biológico de plantas daninhas **115**

Variação genética em plantas invasoras

Variação genética em fungos utilizados como agentes de biocontrole

Benefícios e prejuízos da variação genética

Integração com outros métodos de controle **119**

Conflitos no uso de fitopatógenos para controle de plantas daninhas **121**

Considerações gerais **123**

Agradecimentos **124**

Referências bibliográficas **125**

## Capítulo 4

---

### CONTROLE MICROBIANO DE VETORES TRANSMISSORES DE DOENÇA DE CHAGAS

Cláudio Luiz Messias  
V.L.C.C. Rodrigues  
A.N. Ferraz Filho  
R.H.R. Destefano  
A.E. Piedrabuena

Introdução **129**

Ecologia e distribuição **131**

Controle do vetor **134**

Formas de utilização do controle microbiano

Obtenção do inseticida microbiológico

Seleção em bioensaios de matrizes

Aplicação em área rural

Conclusão **140**

Referências bibliográficas **141**

## Capítulo 5

---

### CONTROLE MICROBIANO DE ARTRÓPODOS ASSOCIADOS A DOENÇAS DE PLANTAS

S.B. Alves  
J.R.S. Lopes  
L.F.A. Alves  
A. Moino Júnior

Introdução **143**

Ártrópodos associados a doenças de plantas **145**

Entomopatógenos associados a artrópodos vetores ou toxicogêncios **147**

*Hemiptera: Homoptera*

*Hemiptera: Heteroptera*

*Thysanoptera*

*Hymenoptera*

*Acari*

Utilização prática de entomopatógenos no controle de insetos **160**

Cigarrinhas-da-cana-de-açúcar

Epizootiologia e desenvolvimento da doença

Cigarrinhas-das-pastagens

Dosagem e modo de aplicação de *M. anisopliae*

Resultados de controle

Controle da cigarrinha-verde-do-feijão

Controle da vespa-da-madeira

Referências bibliográficas **168**

## **Capítulo 6**

---

### **GENÉTICA E MELHORAMENTO DE FUNGOS AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO**

Luzia Doretto Paccola-Meirelles

Introdução **171**

Condição nuclear do fungo **172**

Avaliação da variabilidade natural em fungos entomopatogênicos **175**

Mutação **178**

Recombinação em fungos **185**

Recombinação sexual

Recombinação parassexual

Melhoramento genético de linhagens de fungos com ênfase no controle biológico de pragas **194**

Referências bibliográficas **197**

## Capítulo 7

---

### ENGENHARIA GENÉTICA DE MICRORGANISMOS AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

Maria Cléria Valadares-Ingles

Marlene T. De-Souza

William Shiler

Introdução **201**

Baculovírus **202**

Importância

Regulação de expressão gênica

Sistemas de expressão

Construção de vetores de expressão

*Bacillus thuringiensis* **208**

Considerações gerais

Localização e organização molecular dos genes *cry*

Regulação da expressão dos genes do cristal

Controle temporal e espacial na expressão dos genes *cry*

Estabilidade dos mRNA

Número de cópias dos genes *cry* e diferenciação na expressão

Organismos transgênicos

Fungos **218**

Estudos genéticos de fungos usados em controle biológico

Clonagem de genes de fungos

Transferência de genes em fungos

Referências bibliográficas **225**

## Capítulo 8

---

### **UTILIZAÇÃO DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE DE PRAGAS: MERCADO, RISCOS E REGULAMENTAÇÕES**

Elizabeth A.B. De Nardo

Deise M.F. Capalbo

Introdução **231**

Comercialização de agentes microbianos de controle **233**

Mercado global

Bactérias

Vírus

Fungos

Protozoários

Mercado no Brasil

Agentes Microbianos de controle utilizados e em desenvolvimento  
no Brasil **244**

Riscos associados ao uso dos agentes microbianos de controle **247**

Regulamentações sobre comercialização de agentes microbianos de controle  
de pragas no Brasil e região do Cone Sul **248**

Legislação brasileira

Organismos geneticamente modificados (OGMs)

Legislação regional

Avaliações de AMCs para fins de registro comercial

Perspectivas do uso de agentes microbianos **252**

Conclusões **255**

Agradecimentos **256**

Referências bibliográficas **257**

Anexo 1 **260**



# AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Itamar Soares de Melo

## INTRODUÇÃO

Alguns dos problemas associados com o uso de pesticidas incluem, freqüentemente, falhas no controle de patógenos (resistência de populações de patógenos), contaminação ambiental e danos à saúde humana. Os fungicidas, por serem aplicados em muitos casos no solo, têm atingido e contaminado águas superficiais e subterrâneas. Esses e outros motivos como, por exemplo, a pressão da sociedade por produtos livres de agroquímicos, têm exigido dos pesquisadores e da indústria maior empenho em programas de controle biológico. O controle biológico de fitopatógenos pode ser alcançado através de práticas de manejo para favorecer antagonistas nativos e também através da introdução de microrganismos selecionados. Nesse último caso, estratégias de isolamento de um eficiente agente de biocontrole devem ser adotadas.

A introdução de antagonistas adaptados ao microhabitat do patógeno é um aspecto relevante para muitos sistemas planta-patógeno. No entanto, com algumas exceções, antagonistas podem ser introduzidos em outro ambiente diferente daquele onde foi isolado, se estabelecer e parasitar o patógeno. O sucesso do biocontrole, no entanto, depende-

rá da natureza das propriedades antagonísticas e mecanismos de ação do hiperparasita. Muitos fungos e bactérias inibem fitopatógenos através da competição por nutrientes, do parasitismo direto e da produção de metabólitos secundários (enzimas líticas e antibióticos).

Os microrganismos agentes de controle de fungos fitopatogênicos têm mais chances de sucesso no controle de patógenos de solo. É nesse ambiente que inúmeros microrganismos, com atividade antifúngica, têm sido isolados, apesar de pouquíssimos produtos à base desses organismos serem comercializados. Uma comprovação de que isso é verdade, é verificada pela relação de trabalhos científicos publicados e o número de produtos à base de agentes de biocontrole em uso. Avaliando o número de artigos científicos sobre controle biológico de doenças de plantas, por um período de cinco anos, publicados pela revista *Phytopathology*, Becker (1993) concluiu que 80% deles relacionavam-se com o controle de doenças de solo.

Atualmente o mercado global de biopesticidas está em torno de 75 milhões de dólares por ano (Lisansky & Coombs, 1994). Isso representa muito pouco (menos de 1%) quando comparado com o mercado de pesticidas químicos que, em 1991, alcançou a cifra de 26.800 milhões de dólares (Powell & Jutsum, 1993). Dessa quantia, os biofungicidas representam 21% do volume de vendas, cujos produtos são representados pelos seguintes microrganismos: *Agrobacterium*, *Peniophora*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* e *Streptomyces*. A maior penetração no mercado mundial é dominada pelos bioinseticidas (Tabela 1), sendo os produtos à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* os mais comercializados (cerca de 80%), vindo a seguir os bioinseticidas à base de *Bacillus sphaericus*, *Beauveria* spp. e *Metarhizium* spp. A Tabela 1 compara o volume de vendas de pesticidas químicos e de biopesticidas.

Muitos fungos patogênicos, por exemplo, habitam raízes de seus respectivos hospedeiros e podem sobreviver por muito tempo. Em geral, eles são extremamente suscetíveis aos agentes de controle biológico quando na fase saprofítica (Garrett, 1956). Os patógenos não-especializados, como *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Fusarium solani* etc. podem ser controlados com mais facilidade do que os patógenos especializados. O ambiente solo não está sujeito às variações extremas de temperatura, umidade ou radiação, conseqüentemente é um ambiente mais estável, apesar de complexo.

TABELA 1. Volume de vendas de pesticidas e biopesticidas<sup>1</sup>.

Produto	Venda de biopesticidas (US\$ milhões)	
	1985	1991
Inseticidas	4.970	7.635
Bioinseticidas	31	120
Fungicidas	2.800	5.560
Biofungicidas	< 1	< 1
Herbicidas	7.000	11.905
Bioherbicidas	< 1	< 1

<sup>1</sup>Fonte: Powell & Jutsum (1993)

Com base no exposto, pode-se inferir que as chances de sucesso de controle biológico, entre outros fatores, estão fundamentadas na escolha do patossistema apropriado e da escolha acertada do agente de biocontrole para as condições onde a doença é prevalente. O controle biológico clássico não tem sido empregado com sucesso em fitopatologia. Um agente de biocontrole ideal seria aquele que colonizasse e fosse competitivo no microambiente (rizosfera, filosfera, rizoplane e espermosfera) do patógeno. Nessas condições, as chances de selecionar um agente mais adaptado seriam maiores. Por exemplo, alguns patógenos de solo, como *Sclerotinia minor*, *S. sclerotiorum* e *Pythium* spp., são favorecidos por condições sub-ótimas de temperatura e umidade para germinação e parasitismo e, portanto, a seleção de antagonistas deveria ser feita nessas condições.

Embora um número relativamente expressivo de importantes doenças de plantas possa ser controlado biologicamente, em termos práticos poucas doenças têm sido controladas, dada as limitações impostas aos produtos biológicos, tais como sensibilidade aos fatores ambientais, extrema especificidade, problemas de formulação, tempo de aplicação, persistência do efeito etc.

Por sua vez, no tocante à comercialização de agentes de biocontrole, há um número de fatores críticos que contribuem para o modesto desenvolvimento e o insucesso de formulações biológicas, a saber: confiabilidade dos agricultores, custo-benefício, registro do produto por órgãos governamentais etc.

## MICRORGANISMOS UTILIZADOS NO CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Fungos, bactérias e actinomicetos têm sido envolvidos no controle de fitopatógenos. Alguns com sucesso comprovado e muitos outros com potencial de uso. Assim é que, para o controle de alguns patógenos, o isolamento seletivo de um determinado antagonista pode abreviar o árduo trabalho de seleção. Nesse caso, tem-se descrito como potenciais agentes de biocontrole os seguintes **fungos**: *Trichoderma* sp., *Gliocladium roseum*, *Gliocladium virens*, *Coniothyrium minitans*, *Talaromyces flavus*, *Pythium oligandrum*, *Sporidesmium sclerotivorum*, *Peniophora gigantea*, *Ampelomyces quisqualis*, *Penicillium* spp.; e **bactérias**: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *Agrobacterium radiobacter* e *Streptomyces* spp.

TABELA 2. Alguns biopesticidas disponíveis comercialmente para controle de doenças de plantas.

Organismo	Produto	Organismo-alvo	Fabricante
<i>Agrobacterium radiobacter</i> <sup>1</sup>	Norbac 84-C; Agtrol; Galltrol; Diegall	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Conn, agente causal da galha da coroa	Bio-care technology (Austrália)
<i>Bacillus subtilis</i>	Kodiak	<i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Pythium</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp. agentes causadores de podridões radiculares	
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Blue Circle; Intercept	<i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Pythium</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp. = tombamento de plântulas	Gustafson, Inc. (Dallas, Tx)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , EG 1053	Dagger	<i>Rhizoctonia</i> spp. e <i>Pythium</i> spp.	Ecogen
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , A506		<i>Pseudomonas</i> spp. ativas para nucleação de gelo – INA*	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , NC1B 12089	Conquer	Podridão bacteriana de cogumelos comestíveis	Burns Phillips
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> <sup>2</sup>		<i>Gaeumanomyces graminis</i> agente do mal-do-pé em trigo	Monsanto, St. Lois, MO
<i>Peniophora gigantea</i>		<i>Heterobasidium annosus</i> , em plantas florestais	Ecological Labs
<i>Pythium oligandrum</i> <sup>3</sup>	Polygandron	<i>Pythium ultimum</i> Trow em beterraba açucareira	

Organismo	Produto	Organismo-alvo	Fabricante
<i>Trichoderma harzianum</i>	BINAB-T	<i>Verticillium dahliae</i> e fungos causadores de podridões de madeira	
<i>Trichoderma harzianum</i> <sup>4</sup>	F-Stop; Trichodex; Supravit	<i>Heterobasidium annosum</i> e doenças causadas por <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i>	Bio-Innovation, Eastman Kodak
<i>Arthrobotrys robusta. antipolis</i>	Royal 300	<i>Ditylenchus mycelisphagus</i> Goodey	
<i>Arthrobotrys superba</i>	Royal 350	Meloidogyne spp.	
<i>Pseudomonas syringae, 742RS</i>		<i>Pseudomonas</i> spp. ativas para nucleação de gelo – INA*	
<i>P. syringae, ESC 10</i>		Patógenos que ocorrem pós-colheita	
<i>Streptomyces griseovindes</i>	Mycostop	<i>Alternaria</i> sp. e <i>Fusarium</i> spp. em plantas ornamentais	Kemira Oy
<i>Ampelomyces quisqualis</i>		<i>Sphaerotheca fuliginea</i> (oidio)	WR Grace
<i>Coniothyrium minitans</i>	Coniothyrin	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em girassol	
<i>Gliocladium virens</i>	Glio Gard	<i>Rhizoctonia</i> spp. e <i>Pythium</i> spp. agentes de tombamento de plântulas	W.R. Grace

\* Registrado para uso nos Estados Unidos, Austrália e Nova Zelândia e comercializado em outros países, como França, Japão e Noruega. Na Austrália, a companhia **Bio-Care Technology** recebeu aprovação em 1989 para vender o produto No Gall contendo uma linhagem geneticamente modificada de *A. radiobacter* deletada para um gene de resistência a antibiótico (Agron, 1989).

<sup>2</sup> Isolada na Universidade do Estado de Washington (Weller & Cook, 1983). A Companhia Monsanto recebeu aprovação do governo americano para testar uma nova linhagem recombinante contendo o gene *lac ZY* que facilita o monitoramento dele no ambiente (Drahos *et al.*, 1986).

<sup>3</sup> Registrado para uso na Rússia e também comercializado na República Tcheca.

<sup>4</sup> Registrado para uso em Israel.

Muitos desses agentes têm demonstrado certa especialização em parasitar determinadas classes de patógenos, como pode ser visto na Tabela 2, que mostra exemplos dos principais biopesticidas disponíveis para controle de fitopatógenos. Alguns fungos antagônicos têm sido relatados como parasitas de uma gama de patógenos que, no entanto, mostram-se mais efetivos em parasitar um grupo em particular. *Sporidesmium sclerotivorum*, por exemplo, é capaz de parasitar escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum* e *Sclerotium cepivorum*, mas é incapaz de parasitar escleródios de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani* (Ayers & Adams, 1979).

Este capítulo examina e descreve agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. Particular atenção é dada àqueles agentes onde há maior volume de trabalho publicado e que, além de representarem grande potencial de uso, alguns já se encontram disponíveis comercialmente. Muitos outros agentes, como *Acremonium* spp., *Paezilomyces* spp., *Hansfordia puluinata*, *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. não foram considerados neste capítulo, mas merecem destaque especial pelo seu potencial de uso.

### ***Ampelomyces quisqualis***

*Ampelomyces quisqualis* Ces. é um Deuteromiceto, Coelomiceto, Dematiaceae. Produz conídios e picnídios que parasitam muitas espécies dentro de Erysiphaceae (oídio), não sendo, portanto, especializado em atacar um hospedeiro em particular.

**Controle biológico.** O controle do oídio (*Sphaerotheca fuliginea*) com *A. quisqualis* aparece como uma excelente oportunidade de controle para algumas importantes espécies agrícolas cultivadas em condições de casa-de-vegetação. Alguns autores utilizaram o micoparasita para controlar o oídio em trevo (Yarwood, 1932), em maçã (Odintsova, 1975), em cucurbitáceas (Jarvis & Slingsby, 1977; Sundheim, 1982), em cenoura e manga (Sztejnberg *et al.*, 1989), em quiabeiro (Fernandes & Leal, 1985) e em ipê (Rezende & Ferreira, 1988).

Hashioka & Nakai (1980) em observações ultraestruturais de *A. quisqualis* verificaram que o fungo penetra de célula para célula através de poros septados de *S. fuliginea*. Também, utilizando-se de microscopia eletrônica, Sundheim & Krekling (1982) notaram que em até 24 horas após a inoculação de *A. quisqualis*, esse germinou e os tubos germinativos desenvolveram estruturas semelhantes a apressório no ponto de contato com o hospedeiro. Em 5 dias, *A. quisqualis* produziu picnídios com conídios maduros sobre as hifas e conidióforos de *S. fuliginea*.

Aplicações foliares em plantas de pepino com suspensões de esporos de *A. quisqualis* reduziram o ataque do oídio (*S. fuliginea*) e aumentaram a produção de frutos (Jarvis & Slingsby, 1977). Do mesmo modo, Sztejnberg (1979) e Philipps & Crüger (1979) relataram o controle desse patógeno em pepino, melancia e em outras culturas sob condições controladas de casa-de-vegetação. Também observaram que o hiperparasita infectava o hospedeiro sob condições de alta umidade.

Uma maior eficiência no controle de *S. fuliginea* em pepino foi alcançada combinando-se a aplicação de *A. quisqualis* com o fungicida triforine (Sandheim & Amundsen, 1982). O hiperparasita é resistente ao fungicida, que efetivamente controlou o patógeno em dosagens reduzidas (um terço da dose recomendada). O hiperparasita sozinho não apresentou uma completa proteção contra o patógeno. O controle integrado resultou em produções superiores quando comparado com plantas tratadas com triforine.

**Considerações gerais.** O controle do oídio (*S. fuliginea*) por *A. quisqualis* tem sido relatado com razoável sucesso em condições controladas. Em estufas, é possível manipular o ambiente para favorecer o antagonista, cujo crescimento e parasitismo são favorecidos por períodos prolongados de alta umidade.

Cuidado deve ser tomado quanto ao fato de que algumas linhagens de *A. quisqualis* podem causar infecções moderadas em frutos maduros de pepino (Jarvis & Slingby, 1977).

## ***Bacillus* spp.**

O gênero *Bacillus* compreende um grupo heterogêneo de bactérias quimiorganotróficas. São Eubactérias Bacillaceae, geralmente Gram-positivas; formadoras de endosporos, aeróbias ou anaeróbias facultativas. Uma das suas principais características é a capacidade para produzir endosporos resistentes ao calor. O gênero contém um número de espécies de importância industrial, como: *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. megaterium*, *B. pumilis* e *B. brevis*. *Bacillus* spp. podem secretar metabólitos comercialmente importantes como: enzimas amilolíticas, enzimas proteolíticas, antibióticos, muitos dos quais com atividades antifúngicas etc.

**Ecologia.** O maior reservatório de espécies de *Bacillus* é o solo, onde se têm encontrado isolados de ambientes extremos, como desertos e geleiras. Além do solo, *Bacillus* spp. têm também como habitat ambientes marinhos, água doce (Allen *et al.*, 1983), sedimentos, sementes, rizosfera, folhas (Ercolani, 1978; Norris *et al.*, 1981) e amêndoas de cacau (Ostovar & Keeney, 1973). *B. popilliae*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus* e *B. lentimorbus* são freqüentemente isolados de insetos (Bulla *et al.*, 1978; Hernstadt *et al.*, 1986). Águas do mar não poluídas parecem ser dominadas por *B. licheniformis* seguida por *B. pumilis*.

Segundo Priest (1989), solos com baixo teor de matéria orgânica apresentam uma flora restrita dominada por *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. cereus*, porém, com o aumento da fertilidade muitas outras espécies podem ser encontradas.

**Controle biológico.** *B. subtilis* tem sido testado em uma série de culturas agrícolas para controlar fitopatógenos. É uma bactéria com grande potencial de uso como inoculante, pois produz endosporos que são termotolerantes e resistentes à dessecação, irradiação UV e solventes orgânicos (Roberts & Hitchins, 1969), além de produzir uma gama de antibióticos com atividade contra fitopatógenos. *B. subtilis* A13, isolado por Broadbent *et al.* (1971) a partir de micélio lisado de *S. rolfsii*, produz metabólitos tóxicos ativos contra vários patógenos de plantas e tem promovido o crescimento de muitas espécies de plantas (Broadbent *et al.*, 1971, 1977).

Tratamento de sementes de aveia com uma suspensão de células de *B. subtilis* A13 proporcionou um aumento de 40% na produção de grãos. Peletização de sementes de cenoura com este mesmo isolado aumentou em 48% a produção de raízes (Merriman *et al.*, 1974).

*B. subtilis* pode ser aplicado tanto no tratamento de sementes e de propágulos vegetativos, como pode ser introduzido no solo para controlar doenças de planta. Aplicação de antagonistas a substratos para produção de mudas antes ou imediatamente após o plantio, especialmente quando o solo é previamente esterilizado, contribui para o sucesso de controle. Baker & Cook (1982) empregaram *B. subtilis* para proteger mudas de plantas ornamentais do ataque de *R. solani*, *P. ultimum* e *Fusarium roseum*. Tratamento de mudas de cravo com suspensão de células de *B. subtilis* foi efetivo contra *F. roseum* (Aldrich & Baker, 1970) e também contra *Botryodiplodia solani* (Thirimalachar & O'Brien, 1977).

Uma linhagem de *B. subtilis* (OG), isolada do rizoplano de plantas sadias de feijoeiro, tem reduzido a podridão radicular do feijoeiro causada por *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* (Figs. 1 e 2) e promovido o crescimento de plantas e a produção de grãos (Melo & Valarini, 1995). Uma formulação de células de *B. subtilis* (OG), com um polímero natural, a pectina, tem sido desenvolvida e se mostrado eficiente no controle de *F. solani* (Brandão *et al.*, 1998).

Estudos de biocontrole, filtrados de cultura de *B. subtilis*, têm provado ser efetivos contra o agente da ferrugem do feijoeiro, *Uromyces*

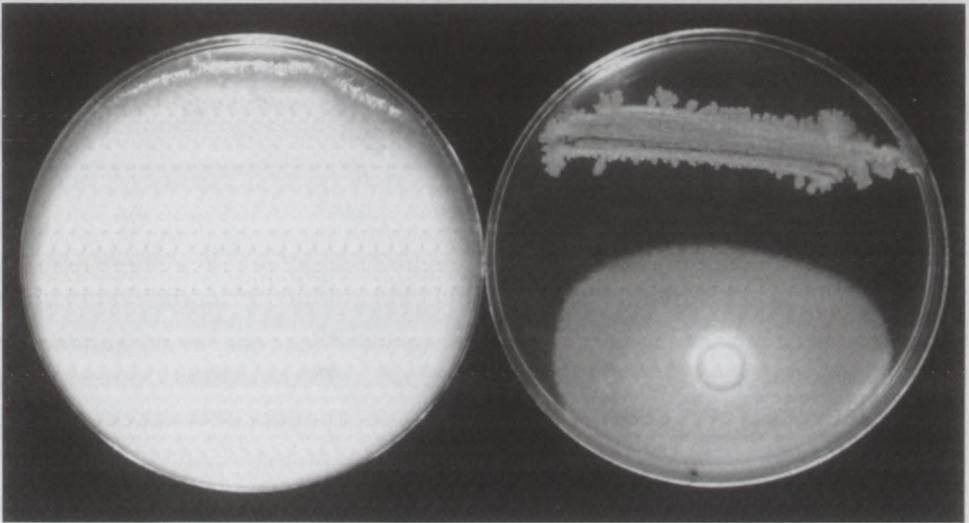


FIGURA 1. Inibição micelial de *F. solani* por *B. subtilis*, linhagem OG. A placa à esquerda da fotografia mostra o crescimento normal do patógeno.



FIGURA 2. Controle da podridão radicular do feijoeiro (*Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*) por *Bacillus subtilis*. O vaso à direita continha somente solo infestado com o patógeno e o vaso à esquerda solo infestado com o patógeno e sementes de feijão tratadas com uma formulação à base de *B. subtilis*.

*phaseoli*; contra o cancro foliar da maçã, *Nectria galligena* (Swinburne et al., 1975); contra a requeima da batata, *Alternaria solani* (Vasadeva & Chakravanthi, 1954); contra a podridão da batata, *Macrophomina phase-*

*lina* e *Botryodiplodia solani-tuberosi*; contra as podridões de frutos de pera e de maçã, por *Monilinia fructicola* (McKeen *et al.*, 1986) e contra muitos outros fungos fitopatogênicos (Asante & Neal, 1964; Babad *et al.*, 1952; Landy *et al.*, 1948). O gênero *Bacillus* também é utilizado como potencial agente de controle de patógenos de parte aérea de plantas. *B. cereus*, quando aplicado em folhas de alho, reduziu o número de pústulas formadas por *Puccinia allii* (Doherty & Preece, 1978). *B. pumilus* reduziu a incidência da ferrugem em cereais causada por *Puccinia recondita* (Morgan, 1963) e *B. subtilis* controlou mais de 75% da ferrugem do feijão causada por *U. phaseoli* (Baker *et al.*, 1983). Muitos outros patógenos, tanto de solos como de parte aérea de plantas têm sido controlados por espécies de *Bacillus* (Tabela 3), sendo *B. subtilis* a espécie mais bem estudada e onde há o maior número de relatos.

TABELA 3. Espécies de *Bacillus* utilizadas como agentes de controle de fungos fitopatogênicos. (Tabela ampliada, baseada na revisão de Edwards *et al.*, 1994)

Espécies de <i>Bacillus</i> /Patógenos	Cultura	Referência
<b><i>B. subtilis</i></b>		
<i>Monilinia fructicola</i>	pera	*Pusey & Wilson, 1984
<i>Monilinia fructicola</i>	cereja	*Utkhede & Sholberg, 1986
<i>Alternaria alternata</i>	cereja	*Utkhede & Sholberg, 1986
<i>Rhizoctonia solani</i>	solo	*Olsen & Baker, 1968
<i>Rhizoctonia solani</i>	algodão	*Kloepper, 1991
<i>Uromyces appendiculatus</i>	feijão	*Baker <i>et al.</i> , 1985
<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Acer</i> spp.	*Hall <i>et al.</i> , 1986
<i>Sclerotium cepivorum</i>	cebola	*Utkhede & Rahe, 1983
<i>Puccinia pelargonii-zonalis</i>	gerânio	*Ryther <i>et al.</i> , 1989
<i>Phytophthora cactorum</i>	maçã	*Utkhede & Smith, 1991
<i>Eutypa lata</i>	uva	*Ferreira <i>et al.</i> , 1991
<i>Fusarium reseau</i> f.sp. <i>dianthi</i>	cravo	*Baker & Aldrich, 1970
<i>Monilinia fructicola</i>	pêssego	McKeen <i>et al.</i> , 1986
<i>Botrytis cinerea</i>	uva	Rodgers, 1989
<i>Uromyces phaseoli</i>	feijão	Centurion, 1991
<i>Hemileia vastatrix</i>	café	Bettiol <i>et al.</i> , 1989
<i>Phytophthora citrophthora</i> e <i>P. parasitica</i>	citrus	Amorin, 1997
<i>Fusarium solani</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	feijão	Melo <i>et al.</i> , 1995

Espécies de Bacillus/Patógenos	Cultura	Referência
<i>Phytophthora cactorum</i>	maçã	Utkhede, 1984
<i>Alternaria solani</i>	batata	Vasudeva & Chakravarthi, 1954
<i>Macrophomina phaseolina</i>	batata	Thirumalachar & O'Brien, 1977
<i>Botryodiplodia solani-tuberosi</i>	batata	Thirumalachar & O'Brien, 1977
<i>Nectria galligena</i>	maçã	Swinburne <i>et al.</i> , 1975
<i>Fusarium solani</i>	pepino	Melo & Valarini, 1995
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	trigo	Luz, 1994
<i>Fusarium graminearum</i>	milho	Chang & Kommedahl, 1968
<b>B. mycoide</b>		
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	trigo	Rovira (1985)
<b>B. cereus</b>		
<i>Puccinia allii</i>	alho	*Doherty & Preece, 1978
<i>Alternaria alternata</i>	tabaco	*Fravel & Spurr, 1977
<i>Sclerotium cepivorum</i>	cebola	*Wong & Hughes, 1986
<i>Phytophthora megasperma</i> f.sp. <i>medicaginis</i>	alfafa	*Handelsman <i>et al.</i> , 1990
<b>B. megaterium</b>		
<i>Fusarium roseum</i>	arroz	*Islam & Nandi, 1985
<i>Alternaria alternata</i>	arroz	*Islam & Nandi, 1985
<i>Sclerotium cepivorum</i>	cebola	*Wong & Hughes, 1986
<b>B. pumilus</b>		
<i>Puccinia</i> spp.	trigo	*Morgan, 1963
<i>Penicillium digitatum</i>	citrus	*Huang <i>et al.</i> , 1992
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	trigo	Capper & Campbell, 1986
<b>B. licheniformis</b>		
<i>Sclerotium cepivorum</i>	cebola	*Wong & Hughes, 1986
<i>Pyrenophora teres</i>	cevada	*Scharen & Bryan, 1981
<b>B. brevis</b>		
<i>Botrytis cinerea</i>	alface	*Wood, 1951a
<i>Rhizoctonia solani</i>	alface	*Wood, 1995b
<b>B. penetrans</b>		
<i>Meloidogyne javanica</i> ; <i>M. incognita</i> ; <i>Pratylenchus scribneri</i>	várias culturas	Imbriani & Mankau, 1977; Mankau, 1975; Mankau & Pragud, 1977

Segundo Shoji (1978) *Bacillus* spp. produzem quatro classes de antibióticos: 1) oligopeptídeos cíclicos-bacitracina; 2) oligopeptídeos lineares ou cíclicos (gramicidina e polimixina); 3) peptídeos básicos (edeina) e 4) aminoglicosídeos (Tabela 4). De acordo com Bérdy (1974), mais de 100 antibióticos têm sido identificados no gênero *Bacillus*.

TABELA 4. Antibióticos produzidos por *Bacillus* spp., suas características e atividades (resumido de Kleinkauf & Von Döhrem, 1985).

Nome/Estrutura	Espécie	Atividade	Comentários
Alboleutina	<i>B. subtilis</i> AF8	Antifúngico	ativo contra fungos fitopatogênicos
B-344/ciclopeptídio	<i>B. subtilis</i>	G <sup>+</sup> , G <sup>-</sup> , antifúngico	
Fluvmicina	<i>B. subtilis</i>		
Ituricina	<i>B. subtilis</i>	G <sup>+</sup> , G <sup>-</sup> , antifúngico	
Subtilina	<i>B. subtilis</i>	G <sup>+</sup> , antiviral	conservante de alimentos
Toximicina/bacilomicina	<i>B. subtilis</i>	G <sup>+</sup> , antifúngico, antitumor, antiviral	ativo contra fungos fitopatogênicos
B-43/polipeptina	<i>B. circulans</i>	G <sup>+</sup> , G <sup>-</sup>	
Johpeptina/polipeptina	<i>B. polymyxa</i> - <i>colistinus</i>	G <sup>+</sup> , G <sup>-</sup>	
Octapeptina	<i>B. circulans</i> ATCC 31805	G <sup>+</sup> , G <sup>-</sup> , antifúngico, micobacteriano	antihelmintico
Polimixina	<i>B. polymyxa</i>	G <sup>+</sup> , G <sup>-</sup>	ativo em membrana
Tiocilinas/micrococinina	<i>B. cereus</i> G <sup>-</sup> 15, B <i>B. megaterium</i> I-13	G <sup>+</sup> , G <sup>-</sup> G <sup>+</sup>	ativo em membrana

G<sup>+</sup> = Gram-positiva; G<sup>-</sup> = Gram-negativa

Além de antibióticos, certas espécies de *Bacillus* produzem substâncias reguladoras de crescimento de plantas, como auxinas, giberelinas e citocininas (Tabela 5), bem como sideróforos (Neilands, 1984). *B. megatherium* var. *phosphaticum* tem sido encontrada também solubilizando fosfato, podendo ser usada como inoculante para o tratamento de sementes com o objetivo de aumentar a produção agrícola. O mecanismo de ação dessa bactéria inclui aumento da solubilização

de fosfato orgânico via ação da fosfatase ou por solubilização de fosfatos inorgânicos com ácidos orgânicos e subsequente incremento na absorção desse elemento pelas plantas (Suba Rao, 1984; Cooper, 1959; Markina, 1956).

TABELA 5. Produção de substâncias reguladoras de crescimento de plantas por *Bacillus* spp.

Espécie	Hormônio	Referência
<i>Bacillus</i> spp.	auxina	Kampert <i>et al.</i> , 1975
<i>B. brevis</i>	IAA, giberelina	Mahmoud <i>et al.</i> , 1984
<i>B. cereus</i>	IAA, giberelina	Mahmoud <i>et al.</i> , 1984
<i>B. megaterium</i>	IAA, ICA	Kaunat, 1969
<i>B. megaterium</i>	giberelina	Hussain & Vancura, 1970
<i>B. circulans</i>	auxina	Strzelezyk & Pokojska-Burdziej, 1984
<i>B. circulans</i>	citocinina	Kampert & Strzelczyk, 1984

IAA – ácido indole acético; ICA – ácido indolecarboxílico

Embora existam relatos demonstrando a promoção de crescimento de plantas por *Bacillus* spp., Kloepper (1993) comenta que a maioria das espécies de *Bacillus* não são colonizadoras de raízes, apesar de Turner & Backman (1991) terem demonstrado colonização de raízes por uma linhagem específica de *Bacillus*. Poucos organismos são verdadeiramente adaptados à rizosfera. Rovira (1963) inoculou individualmente sementes de milho com *Azotobacter chroococcum*, *B. polymixa*, *Clostridium pasteurianum* e *P. fluorescens*. *A. chroococcum* mostrou-se ineficaz na colonização de raízes, mesmo com nenhuma competição. *B. polymixa* e *Clostridium* chegaram a alcançar uma população moderada na rizosfera e somente *P. fluorescens* alcançou um número populacional considerável no rizoplano.

Colonização de raízes é um atributo fundamental de um eficiente agente de biocontrole. Como também o é a colonização da rizosfera. Assim, dada a gama de substâncias importantes sintetizadas por *Bacillus*, que, direta ou indiretamente, estão associadas ao biocontrole de fitopatógenos e com a saúde da planta, fica evidente que existe uma grande lacuna sobre estudos ecológicos dessa bactéria no rizoplano e na rizosfera.

**Formulação.** Uma preparação comercial denominada “Kodiak”, à base de *B. subtilis*, linhagem GB03, é comercializada pela Gustafson, Texas, para tratamento de sementes de algodoeiro e feijoeiro. É um biofungicida em pó eficiente contra *Fusarium* e *Rhizoctonia solani*, além de promover o crescimento de plantas (Turner & Backman, 1991).

Uma outra formulação pó molhável contendo esporos de *Bacillus* spp. é eficiente no controle de *Cercospora* que ataca o amendoim. O produto apresentou uma viabilidade de vários meses à temperatura ambiente (Knudsen & Spurr, 1987).

**Considerações gerais.** A rizobactéria *B. cereus* tem sido considerada como deletéria às plantas. É o agente causal da doença de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) conhecida como “frenching” (Woltz, 1978). Outros isolados de *Bacillus* spp. têm sido identificados como deletérios, causando redução no crescimento de plantas e, conseqüentemente, afetando a produção (Bowen & Theodoron, 1979; Andrade *et al.*, 1995). Segundo Dowson (1957) e Gorlenko (1961) citados por Schroth & Hancock (1981) linhagens de *B. subtilis* e de *B. polymyxa* podem ser patogênicas em algumas situações.

*Bacillus* spp., por possuírem esporos de resistência, são adequadas para formulação e comercialização, podendo ser empregadas no tratamento de sementes, de parte aérea e também podem ser introduzidas no solo, para o controle de fitopatógenos e para a promoção de crescimento de plantas. Esporos de *Bacillus* spp. podem permanecer metabolicamente dormentes por longos períodos, fazendo aumentar sua sobrevivência em condições desfavoráveis, como por exemplo, deficiência nutricional temporária. É um organismo que se apresenta como um promissor agente de biocontrole, com grandes chances de obter sucesso quando a seleção de um bom isolado e um adequado conhecimento de sua ecofisiologia forem determinados.

### *Coniothyrium minitans*

*Coniothyrium minitans* Campbell é um Deuteromiceto, Coelomices, Sphaeropsidales. Não é considerado um habitante do solo (Tribe, 1957). Produz picnídios globosos superficiais de cor pálida a marrom escuro, uninucleares. Picnidiósporos exsudando de ostíolos, com massa preta; esporos marrons, elipsoidais, com tamanhos que variam de 4-6 x 3,5-4  $\mu\text{m}$ .

A temperatura exerce efeito importante quanto ao seu parasitismo. A temperatura ótima para germinação de esporos e infecção de escleródios está em torno de 20°C. Temperaturas abaixo de 7°C afetam negativamente o crescimento micelial e o controle biológico. A umidade relativa do ar mínima para o crescimento é de 95% (Cook & Baker, 1983).

**Controle biológico.** *C. minitans* é hiperparasita de fungos formadores de escleródios como: *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor*, *S. trifoliorum*, *Botrytis fabae*, *B. cinerea*, *B. narcissicola*, *Sclerotium cepivorum* e *Clavips purpurea* (Ayers & Adams, 1981; Turner & Tribe, 1976). Hifas de *C. minitans* penetram às hifas *S. sclerotiorum* diretamente, com nenhuma estrutura de penetração especializada. O que se observa, no entanto, é uma depressão na parede celular do patógeno precedendo à penetração. Há formação de numerosos picnídios nas camadas superficiais dos escleródios, os quais se tornam moles e se desintegram com facilidade. Segundo Campbell (1947), escleródios de *S. sclerotiorum* tornam-se infectados e cobertos com picnídios até 10 dias após a inoculação. A Fig. 3 ilustra um bioensaio para avaliar e selecionar linhagens de *C. minitans* eficientes no controle de *S. sclerotiorum*. Escleródios do patógeno, depois de infectados por *C. minitans*, são inoculados em segmentos de cenoura que, após incubação, são avaliados.

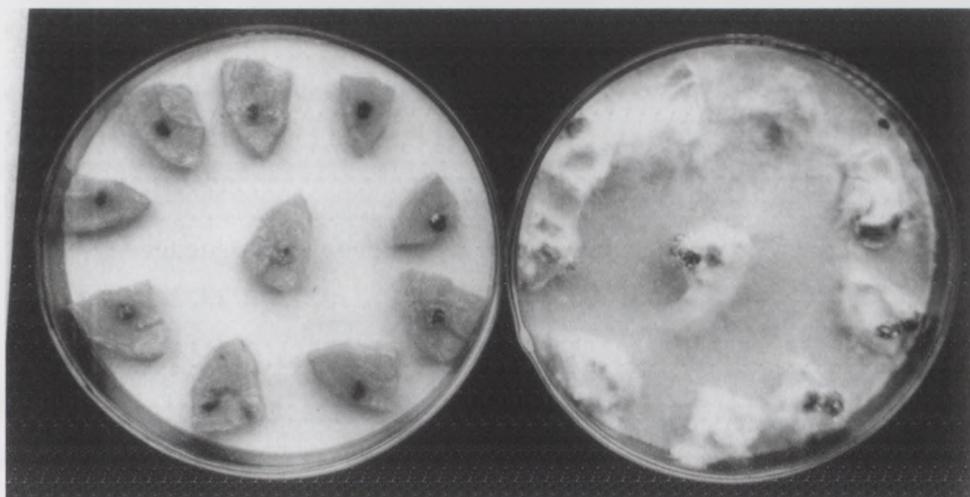


FIGURA 3. Bioensaio utilizando-se de segmentos de cenoura para avaliar o parasitismo de *Coniothyrium minitans* a escleródios de *S. sclerotiorum*. A placa à esquerda da fotografia mostra segmentos de cenoura não infestados cujos escleródios foram parasitados pelo antagonista. A placa à direita mostra os segmentos de cenoura apodrecidos pela ação do patógeno (controle).

Através de observações com auxílio de microscópio eletrônico, Phillips & Price (1983) e Tu (1984) mostraram crescimento inter e intracelular de *C. minitans* em escleródios de *S. sclerotiorum*. Phillips & Price (1983) relataram que o parasita penetra as células de escleródios por pressão física, concluindo, todavia, que enzimas líticas produzidas por *C. minitans* não teriam muito significado no processo de infecção. Em contraste, Jones & Watson (1969) e Jones *et al.* (1974) demonstraram que as enzimas endo e exo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanases e quitinase de *C. minitans* eram as responsáveis pela destruição de escleródios de *S. sclerotiorum*. Mais tarde Huang & Kokko (1987) demonstraram evidências de que a penetração de células de *S. sclerotiorum* por *C. minitans* requer atividade química. Esses autores observaram que os tecidos da medula de escleródios infectados mostraram sinais de plasmólise, agregação e vacuolização do citoplasma e dissolução das paredes celulares.

*C. minitans* não é um fungo exigente nutricionalmente. Cresce e esporula bem em meio BDA, em arroz triturado e numa mistura de sementes de cevada, de centeio e de girassol, a 20°C (Ahmed & Tribe, 1977; Huang, 1980).

Em condições de campo, mais de 65% dos escleródios de *S. trifoliorum* foram destruídos após inoculação com uma formulação de *C. minitans* à base de picnídios (Turner & Tribe, 1976). Os tratamentos de solos e de sementes de cebola com esse hiperparasita foram eficazes no controle de *Sclerotium cepivorum* (Ahmed & Tribe, 1977). Também em condições de campo, em ensaios conduzidos por um período de 3 anos, Huang (1980) mostrou que a introdução de *C. minitans* em solos infestados com *S. sclerotiorum* diminuiu a incidência da murcha de esclerotinia de girassol e reduziu as perdas na produção.

**Considerações gerais.** *C. minitans* é um fungo que encontra condições ideais para germinação de esporos e parasitismo de escleródios a temperaturas em torno de 20-22°C e, em condições tropicais, com temperaturas superiores a essas, o patógeno *S. sclerotiorum* ataca dezenas de culturas agrícolas importantes. Nesse caso, o controle biológico não teria o sucesso esperado. A seleção de linhagens de *C. minitans* adaptadas e/ou melhoradas geneticamente, visando obter linhagens eficientes em condições de temperaturas mais elevadas, seria uma alternativa possível.

Também, *C. minitans* é um fungo que apresenta uma taxa lenta de crescimento em meio de cultura. A produção de picnídios em grande quantidade chega a levar cerca de seis semanas. Sabe-se que uma característica importante de um agente de biocontrole é a produção rápida de biomassa e a ausência de requisitos nutricionais onerosos.

## *Gliocladium roseum* e *Gliocladium virens*

*Gliocladium* spp. pertencem à classe dos Deuteromicetos, subclasse Hifomicetos, Moniliaeae, Gloiosporae. Duas espécies se destacam no controle biológico, *G. roseum* Baibñier e *G. virens* Miller; Giddens & Foster. O estágio perfeito de *G. virens* é *Hypocrea gelatinosa* e de *G. roseum* é *Nectria gliocladioides*. Uma outra espécie, *G. catenulatum* Gilmar & Abott tem se mostrado eficiente no controle de *Fusarium* spp. e de *S. sclerotiorum* (Huang, 1978). *Gliocladium* é um fungo micoparásita facultativo, habitante natural do solo, que pode viver saprofítica ou parasiticamente sobre outros fungos.

**Controle biológico.** *G. roseum* tem sido observado parasitando inúmeros fungos, entre eles: *Botrytis allii*, *B. cinerea*, *Eutypa ameniacea*, *Phomopsis sclerotioides*, *S. sclerotiorum*, *Ceratocystis fimbriata*, *Helminthosporium sativum*, *Trichotecium roseum*, *Thamnidium elegans* (Barnett & Lilly, 1962; Gindrat *et al.*, 1977; Walker & Maude, 1975; Makkonen & Pohjakallio, 1960). Por sua vez, *G. virens* tem um potencial antagonístico com relação a outros fungos fitopatogênicos: *Fusarium* spp., *Pythium ultimum*, *S. sclerotiorum*, *Phytophthora cactorum*, *R. solani* (Tu, 1980; Tu & Vaastaja, 1981; Howell, 1982; Smith *et al.*, 1990; Howell, 1982).

*G. roseum* tem sido observado sempre parasitando escleródios de *B. allii* em campos de cebola (Walker & Maude, 1975).

*G. roseum* reduziu a incidência da podridão preta de raízes de pepino (*Phomopsis sclerotioides*) em solos naturalmente infestados por um período de dez semanas (Moody & Gindrat, 1977). *G. roseum* é comum em folhas de moranguinho, cultivados no Canadá e Estados Unidos, e aplicações desse fungo para controle do mofo cinzento causado por *B. cinerea* são uma maneira de aumentar a população desse antagonista. Segundo Sutton (1994), populações residuais de *G. roseum* em frutos colhidos provenientes de plantas tratadas são geralmente baixas ou não detectadas. Vários isolados de *G. roseum* de diferentes regiões geográficas

cas têm mostrado eficácia no biocontrole do mofo cinzento. No Canadá, três ou quatro aplicações semanais de  $5 \times 10^6$  ou  $10^7$  conídios/ml suprimiu *B. cinerea* nos frutos de oito cultivares de moranguinho. Esse tratamento foi tão eficiente quanto o tratamento com o fungicida Captan (Sutton, 1994). *G. roseum* diminuiu a incidência do mofo cinzento de 90-100% e foi consistentemente tão efetivo quanto o fungicida Clorotalonil (Braun & Sutton, 1984). A consistente efetividade de *G. roseum* no controle de *B. cinerea* está relacionada, segundo Sutton & Peng (1993), com sua capacidade de suprimir o patógeno em condições de temperaturas baixas (10-15°C), assim como em temperaturas mais elevadas (20-25°C).

Antibiose e hiperparasitismo não parecem ser os mecanismos comuns de controle de *B. cinerea* por *G. roseum*. Peng (1991) obteve mutantes de *G. roseum* que produziram altos, intermediários e baixíssimos níveis de metabólitos antifúngicos. Quando os mutantes foram testados contra o patógeno, eles foram individualmente efetivos. Também não foi verificada evidência de parasitismo de *B. cinerea* por *G. roseum*. Esses dados levaram Sutton (1994) a concluir que competição por substrato é o principal mecanismo pelo qual *G. roseum* inibe *B. cinerea* em morango.

Enzimas líticas produzidas por *Gliocladium* sp. também têm sido relatadas no controle biológico. Altos níveis de atividades quitinolíticas e  $\beta$ -1,3-glucanolíticas em filtrados de cultura de *G. virens* (Roberts & Lumsden, 1990) e *G. roseum* (Pachenari & Dix, 1980) têm sido reportados. Di Pietro *et al.* (1993) isolaram e caracterizaram diferentes tipos de quitinases produzidas por *G. virens* com atividades contra *B. cinerea*.

**Modo de ação.** *Gliocladium virens* produz vários metabólitos extracelulares, incluindo gliovirina (Howell & Stipanovic, 1983), viridina (Jones & Hancock, 1987) e gliotoxina (Weinding & Emerson, 1936). Gliovirina é um epitiodietopiperazina que inibe o crescimento de *P. ultimum* e *Phytophthora* sp. Mutantes deficientes na produção desse antibiótico não inibem *P. ultimum*, fato esse que sugere o envolvimento de antibiótico no controle biológico. Um mutante com produção superior de gliovirina mostrou maior atividade inibitória. Aluko & Hering (1970) verificaram que os antibióticos de *G. virens* podem matar escleródios de *R. solani*. Mais tarde, Howell (1987) isolou mutantes de *G. virens* incapazes de parasitarem hifas de *R. solani in vitro*. Esses mutantes mantiveram a mesma produção de gliotoxina ou viridina encontrada na linhagem parental e mostraram eficácia similar no controle de *R.*

*solani* em algodoeiro, indicando, desse modo, que o micoparasitismo não é essencial no processo de biocontrole.

## ***Peniophora gigantea***

*Peniophora gigantea* (Fr.) Karst. é um Basidiomiceto, Himenomiceto, Corticiaceae. É comum em madeira e cerne de coníferas, em regiões temperadas, considerado um invasor primário de cortes de árvores resultantes de podas.

**Controle biológico.** A aplicação de esporos de *P. gigantea* para controlar *Heterobasidium* (*Fomes*) *annosus* é um dos exemplos práticos de sucesso de um agente de controle biológico com registro para uso aprovado pela Agência de Proteção Ambiental – EPA, dos Estados Unidos. *H. annosus* causa podridão radicular em coníferas. Em florestas onde *P. gigantea* é um colonizador natural de toras de madeira e de cortes de ramos podados, o fungo tem evitado a infecção causada por *H. annosus* por se desenvolver e colonizar os tecidos expostos resultantes de podas de árvores, principalmente aquelas com infecções iniciais provenientes de enxertia (Fig. 4).

Quando o antagonista é aplicado na parte aérea, ele cresce e se estende até as raízes, onde pode invadir as raízes de árvores adjacentes.

O mecanismo pelo qual o fungo antagonístico atua é, principalmente, por competição física nas superfícies dos tecidos e/ou por nutrientes.

**Comercialização.** O inóculo comercial de esporos de *P. gigantea* tem sido distribuído em pequenas embalagens por Ecological Laboratories Ltd. (Inglaterra). O produto é viável por até 4 meses, a 20°C. Cada embalagem contém um mínimo de  $5 \times 10^6$  conídios/viáveis. A aplicação do produto, em condições de campo, é feita diluindo-se o conteúdo de um pacote em 5 litros de água e a suspensão de esporos é aplicada sobre as superfícies dos ramos cortados, utilizando-se, para isso, um pincel (Rishbeth, 1975).

Segundo Rishbeth (1963), o custo do tratamento é de US\$0.07 por corte, incluindo o valor do inóculo e o trabalho dispendido.

O fungo é comercializado nos Estados Unidos pela Bio Basic Ltd.

**Considerações gerais.** Como *P. gigantea* pode causar declínio em pinheiros, cuidado especial deve ser tomado ao se inocular o fungo, evitando a base do tronco.

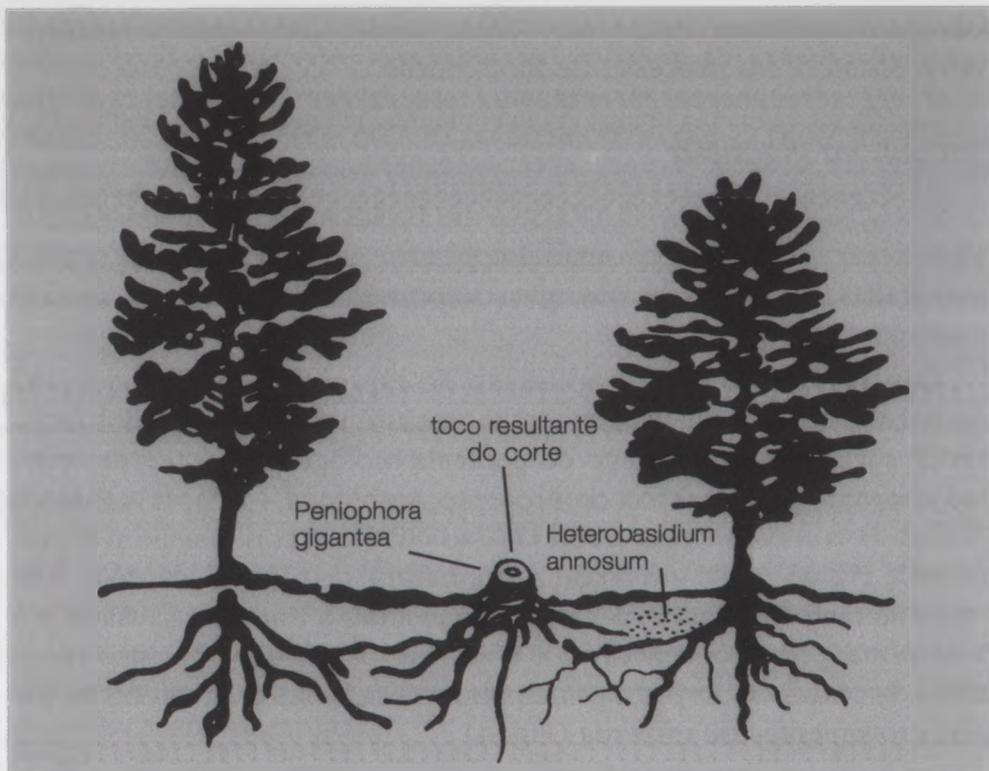


FIGURA 4. *Peniophora gigantea* previne infecção causada por esporos de *Heterobasidium annosum*. Uma vez estabelecida a população de *P. gigantea* em tocos provenientes de cortes para aproveitamento de madeira, ele pode restringir a disseminação do patógeno de áreas infestadas para raízes não infectadas (Deacon, 1983).

### ***Pseudomonas putida* e *P. fluorescens***

*Pseudomonas* sp. são Eubacterias, Pseudomonadaceae. Duas espécies têm sido estudadas mais intensamente no controle biológico, *P. putida* e *P. fluorescens*. São encontradas comumente no solo, mas também podem colonizar o filoplano das plantas e competir ativamente por nutrientes nesse ambiente (Blakeman & Brodie, 1977). No entanto, é na rizosfera que certas linhagens de *Pseudomonas* são competidoras eficientes, podendo interferir e controlar microrganismos nativos colonizadores de raízes (Kloepper & Schroth, 1981). Segundo Loper *et al.* (1984), as rizobactérias são distribuídas na rizosfera obedecendo a um padrão de "log" normal. Bahme & Schroth (1987) concluíram que elas são dispersas, esporadicamente, ao longo das raízes em microcolônias.

As *Pseudomonas* são favorecidas por alta umidade e crescem numa faixa ampla de temperatura.

Certas linhagens de *Pseudomonas*, efetivas no biocontrole de fitopatógenos, são conhecidas por promoverem o crescimento de plantas, aumentarem a germinação de sementes e elevarem a produção em algumas culturas. Essas bactérias são chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP), assim como outros gêneros: *Serratia* (Kloepper *et al.*, 1986), *Arthrobacter* (Kloepper *et al.*, 1990) e *Bacillus* (Backman & Turner, 1989).

**Mecanismos de ação e controle biológico.** O mecanismo de ação pelo qual certas linhagens de *Pseudomonas* promovem o crescimento de plantas está ligado, indiretamente, à redução de populações de microrganismos deletérios, caracterizados por causarem inibição do crescimento de plantas e deformações de raízes (Schippers *et al.*, 1985; Bakker *et al.*, 1987). Kloepper (1983) mostrou que uma *Pseudomonas* fluorescente, responsável por um aumento significativo na produção de tubérculos de batata, reduziu em 95-100% a população de *Erwinia carotovora*.

Uma característica benéfica das RPCPs com impacto direto na agricultura é o fato de que algumas delas, denominadas *rizobactérias promotoras de emergência*, podem aumentar a emergência de plântulas, melhorando, assim, o nível de germinação de sementes em baixas temperaturas (Kloepper *et al.*, 1986; Höfte *et al.*, 1991; Melo & Lucon, 1995).

Vários mecanismos estão envolvidos no controle biológico de alguns patógenos por *Pseudomonas* sp., incluindo a produção de compostos inibitórios ou metabólitos, tais como antibióticos (Tabela 6) e sideróforos. As *Pseudomonas* fluorescentes produzem uma variedade de metabólitos com atividades inibitórias contra outros microrganismos, incluindo patógenos de solo e de parte aérea de plantas. Os estudos de controle biológico de patógenos foliares com *Pseudomonas* não são tão intensos quanto aqueles relacionados com patógenos que infectam raízes, mas Newhook (1951) verificou que linhagens de *Pseudomonas* isoladas de folhas de alface infectadas com *B. cinerea* produziram zonas de inibição contra o patógeno e controlaram a doença em condições naturais. *P. cepacia*, isolada de milho, produziu zonas de inibição contra *Drechslera maydis in vitro* (Sleesman & Lehen, 1976) e controlou *Cercospora* sp. em amendoim e *Alternaria* sp. em fumo (Spurv, 1981). É, no entanto,

com doenças de raízes que os trabalhos de biocontrole, utilizando *Pseudomonas* spp., têm sido mais intensos. Ademais, uma linha que ganha importância a cada dia é o controle biológico em condições controladas, onde se pode manipular as condições ambientais para favorecer a sobrevivência dos antagonistas. Esse é o caso de doenças que ocorrem em estufas e doenças que ocorrem em câmaras frias. Mantovanello & Melo (1990) identificaram uma linhagem de *P. putida*, isolada da rizosfera de cenoura, capaz de reduzir, em câmara fria, mais de 30% a podridão mole da batata causada por *Erwinia carotovora*. A Tabela 7

TABELA 6. Exemplos de antibióticos produzidos por *Pseudomonas putida-fluorescens*.

Metabólitos	Patógenos	Doenças	Comentários	Referência
<i>Pyoluteorina</i>	<i>Pythium ultimum</i>	Tombamento de plântulas de algodoeiro	O antibiótico é inativado no solo e sua ação é somente efetiva no tratamento de plântulas	Howell & Stipanovic, 1980
<i>Pyrolnitrina</i>	<i>Verticillium dahliae</i> , <i>Thielaviopsis basicola</i> , <i>Alternaria</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i>	Tombamento de plântulas de algodoeiro	Antibiótico inativo contra <i>P. ultimum</i>	Howell & Stipanovic, 1979
<i>Fenazina</i> (ácido 1- carboxílico fenazina)	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	"Mal-do-pé" de trigo		Thomashow & Weller, 1988
C-acetil-phloroglucinois	<i>G. graminis</i> var. <i>tritici</i> , <i>T. basicola</i>	"Mal-do-pé" de trigo e podridão de raízes de fumo		Kell & Vicent, 1991, citados por David & O'Gara, 1994
Amônia	<i>Pythium</i> spp.	Tombamento de plântulas		Howell et al., 1988
Ácido Cianídrico	<i>T. basicola</i>	Podridão negra de raízes de fumo	É tóxico às plantas em altas concentrações e <i>Pseudomonas</i> pode ser responsável pela redução na produção agrícola	Voisard et al., 1989; Bakker & Schippers, 1987

sumariza alguns exemplos de biocontrole de fitopatógenos com *Pseudomonas* spp. Metabólitos antimicrobianos, produzidos por *Pseudomonas*, tais como fenazinas e C-acetil-floroglucinóis são efetivos contra *G. graminis* var. *tritici*, agente do “mal-do-pé” de trigo (Thomashow & Weller, 1988; Brishane & Rovira, 1988). Pesquisas têm evidenciado o papel dos antibióticos no controle do “mal-do-pé” por linhagens de *P. fluorescens*, inclusive *in vitro*. Mutantes negativos na síntese de fenazina foram obtidos através de DNA clonado, a partir da linhagem parental 2-79 de *P. fluorescens* contendo as seqüências necessárias para a produção do antibiótico (Thomashow & Weller, 1988). Uma outra linhagem de *P. fluorescens*, a Pf-5, produziu um antibiótico denominado pioluteorina, efetivo no controle de tombamento de plântulas de algodoeiro, causado por *Pythium ultimum* (Howell & Stipanovic, 1980). Este metabólito foi efetivo somente no tratamento de sementes, sendo considerado inativo no solo e não-ativo contra outros patógenos. No entanto, Howell & Stipanovic (1979) isolaram uma linhagem de *P. fluorescens* que não inibiu o crescimento *P. ultimum*, contrariamente ao observado *in vitro* com *V. dahliae*, *Thielaviopsis basicola* e *Alternaria* spp. e *in vivo* com *R. solani*, que por sua vez, produziu o metabólito pirrolnitrina.

TABELA 7. Relação de fitopatógenos que têm sido controlados por *Pseudomonas* spp.

Agente de biocontrole	Patógenos	Doenças/culturas	Mecanismos de ação	Referências
<i>P. fluorescens</i>	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	Mal-do-pé de trigo	Antibiose e sideróforos	Poplawsky & Ellingboe, 1989; Weller <i>et al.</i> , 1988
<i>P. fluorescens</i> , linhagem Hv 371R2	<i>Pythium ultimum</i>	Tombamento de plântulas de algodão	Antibiose	Howie & Suslow, 1991
<i>P. putida</i> , linhagem R20	<i>P. ultimum</i>	Tombamento de plântulas de beterraba	Competição	Osburn <i>et al.</i> , 1989
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	Murcha vascular em várias culturas	Sideróforos – competição por ferro. Influência na germinação de clamósporos	Elad & Baker, 1985; Scher & Baker, 1982

Agente de biocontrole	Patógenos	Doenças/culturas	Mecanismos de ação	Referências
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>P. ultimum</i>	Tombamento de plântulas em algodão	Sideróforos – competição por ferro	Loper, 1988
<i>P. fluorescens</i>	<i>Thielaviopsis basicola</i>	Podridão radicular em fumo	Produção de ácido cianídrico	Keel <i>et al.</i> , 1989; Voisard <i>et al.</i> , 1989
<i>P. fluorescens</i> (C12) <i>P. fluorescens</i> (A2) e <i>P. multivorans</i>	<i>P. tolaasii</i>	Mancha marrom do cogumelo comestível	Competição por nutrientes	Nair & Fahy, 1972; 1976
<i>P. fluorescens</i>	<i>R. solani</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>Phymatotrichum omnivorum</i> , <i>Phytophthora megasperma</i> e <i>Pythium aphanidermatum</i>		Sideróforos	Misaghi <i>et al.</i> , 1982
<i>P. fluorescens</i> Pf-5	<i>S. homoeocarpa</i> <i>Drechslera poae</i>	"dollar spot" "melting out"/ grama	Antibiose (pioluteorina, pirrolnitrina e 2,4-diacetilphloroglucinol)	Rodrigues & Pfender, 1997
<i>P. putida</i>	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lini</i>	Murcha vascular/ linho	Sideróforos	Scher & Baker, 1980; 1982
<i>P. fluorescens</i>	<i>Drechslera dictyoides</i>	Mancha foliar/ lolium	Antibiose	Austin <i>et al.</i> , 1977
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Botrytis cinerea</i>	Mofo cinzento	Antibiose	Newhook, 1951
<i>P. cepacia</i>	<i>Drechslera maydis</i>	Milho/ mancha foliar	Antibiose	Sleesman & Leben, 1976
<i>P. cepacia</i>	<i>Cercospora</i> sp. ou spp.	Mancha foliar/ amendoim	Antibiose	Spurr, 1981
<i>P. putida</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Mancha foliar/ fumo		
<i>P. putida</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Murcha/pepino	Sideróforos	Siminoff <i>et al.</i> , 1980
<i>P. syringae</i> – INA (ice nucleation activity)	<i>P. syringae</i> – INA*, <i>Erwinia herbicola</i> – INA*	Geadas leves, em diversas culturas agrícolas	Antibiose e/ou competição	Lindow, 1985

Agente de biocontrole	Patógenos	Doenças/culturas	Mecanismos de ação	Referências
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Phytophthora megasperma</i> f.sp. <i>glycinea</i>	Podridão radicular/soja		Lifshitz <i>et al.</i> , 1986
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>B. cinerea</i> e <i>Phoma betae</i>	Podridão radicular/beterraba	Competição	Blakeman & Fokkema, 1982
<i>P. chlororaphis</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	Podridão radicular/trigo	Possivelmente pigmentos de cor amarela alaranjadas	Kropp <i>et al.</i> , 1996
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas avenae</i>	Mancha foliar/milho		Lopes, 1986
<i>P. fluorescens</i>	<i>Septoria lycopersici</i>	Mancha foliar/tomateiro		Blum <i>et al.</i> , 1996
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>P. ultimum</i>	Podridão radicular/tulipa	Não estudado	Weststeijn, 1990
<i>P. fluorescens</i>	<i>P. ultimum</i>	Tombamento de plântulas	Competição por ferro e antibiose	Yuen <i>et al.</i> , 1987
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i>	Murcha vascular/cravo	Competição por ferro	Van Peer <i>et al.</i> , 1990
<i>P. cepacia</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	Podridões de sementes, raízes e murcha de plântulas/milho	Antibiose	Hebbar <i>et al.</i> , 1992
<i>P. cepacia</i>	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i>	Podridão de plântulas e de bulbos/cebola	Antibiose	Kawamoto & Lorbeer, 1976
<i>P. aureofaciens</i>	<i>G. graminis</i> var. <i>tritici</i>	Mal-do-pé/trigo	Antibiose (1, 2,6-trihidroxi-2,4-diaceto-fenona)	Harrison <i>et al.</i> , 1993

\*As estirpes de *P. syringae* e *E. herbicola* - INA\* catalizam a formação de cristais de gelo a temperaturas de 0°C ou abaixo dessa, iniciando prematuramente a solidificação da água. Algumas estirpes dessas bactérias não catalizam a formação de gelo (INA ), colonizam o filopiano de plantas mais sensíveis a geadas brandas e suprimem as estirpes INA\*.

*Pseudomonas* spp. que induzem aumentos no crescimento de plantas, produzem sideróforos extracelulares que quelam o ferro, tornando-o indisponível a certos grupos da microbiota nativa. Sideróforos são compostos de baixo peso molecular, com alta afinidade pelo íon férrico (Fe<sup>3+</sup>), que transportam o ferro dentro de células bacterianas

(Leong, 1986; Neilands, 1981). Quando desenvolvidas sob condições limitantes de ferro, *Pseudomonas* fluorescentes produzem sideróforos fluorescentes, amarelo-esverdeados, do tipo pioverdina e proteínas receptoras de membrana, que reconhecem e absorvem o complexo sideróforo-ferro (Hohnadel & Meyer, 1986). Elas também produzem uma gama de compostos que quelam ferro, como: ácido salicílico, pioquelinas, pseudobactinas, ferribactina, ferroxamina B e ferricromo (Dowling & O'Gara, 1994). Sideróforos têm sido isolados do solo, evidenciando o envolvimento desses compostos no biocontrole de fitopatógenos (Bakker & Schippers, 1987; Elad & Baker, 1985; Klopffer *et al.*, 1980; Scher & Baker, 1980; Sneh *et al.*, 1984; Wong & Baker, 1984). O mecanismo pelo qual os sideróforos atuam funciona somente sob condições de baixa disponibilidade de ferro, cuja concentração na solução do solo está relacionada diretamente com o pH. À medida em que o pH diminui abaixo de 6,0 a disponibilidade de ferro aumenta, e conseqüentemente, os sideróforos tornam-se inefetivos.

**Produção de inóculo e formulação.** *Pseudomonas* spp. crescem e produzem células em abundância em cultura submersa (Connick *et al.*, 1989). Esse método de crescimento tem sido usado para a produção de produtos microbianos, tais como antibióticos, vitaminas, enzimas, ácidos orgânicos, proteínas e aminoácidos. No entanto, inoculantes microbianos, onde a biomassa celular e, freqüentemente, esporos são ativos no biocontrole podem ser produzidos em cultura submersa (Browsers, 1982). Biomassa de inúmeras bactérias é produzida por fermentação em meio líquido. A biomassa é recuperada do meio de cultura ou por centrifugação ou por filtração. Mais recentemente, fermentação direta de bactérias em dois diferentes meios sólidos, suplementados com nutrientes tem sido relatada (Graham-Weiss *et al.*, 1987; Somasegaran & Holliday, 1982). Esses processos não são onerosos e resultam em produtos que estão prontos para uso imediato, eliminando a necessidade de concentrar e formular os organismos fermentados.

Várias empresas estão tentando desenvolver RPCPs como agentes de controle biológico. O interesse fundamental é aproveitar os efeitos benéficos das rizobactérias que colonizam as raízes, utilizando exsudados para seu crescimento, ao tempo que protegem a planta hospedeira contra vários patógenos de solo. Uma delas, a *Ecogen*, introduziu no mercado um fungicida denominado "Dagger" à base de *P. fluorescens*

para o controle de tombamento de plântulas de algodoeiro. A formulação, à base de turfa, é similar à formulação de *Rhizobium*, usada no tratamento de sementes de leguminosas. Entretanto, devido à baixa viabilidade da bactéria durante o armazenamento do produto, a empresa teve que retirar o fungicida do mercado (Powell & Futsum, 1993).

Bashan (1986) desenvolveu um método de encapsulamento utilizando alginato de sódio e leite desnatado, para formar pequenas esferas contendo uma mistura de células da ordem de  $10^9$  ufc/ml de *Azospirillum* e de *Pseudomonas*. Esse produto, assim formulado, permitiu uma liberação controlada da bactéria e um maior tempo de vida de prateleira. Uma outra formulação granulada foi desenvolvida por Trevors *et al.* (1992), acrescentando bentonita à formulação de Bashan (1986). Essa formulação resultou em excelente sobrevivência da *P. fluorescens* no solo. O microhabitat formado pelo complexo bentonita/alginato protege as células da bactéria contra condições adversas, como seca e a presença de bacteriofágos líticos (Smit *et al.*, 1996; Trevors *et al.*, 1993)

**Considerações gerais.** Em geral, os problemas mais freqüentes encontrados em produtos à base de *Pseudomonas* spp. são sensibilidade à dissecação e à luz ultravioleta, quando o produto se presta para o controle de patógenos foliares. Quando o propósito é o controle de doenças de solo, o maior problema é o tipo de solo e pH. É, pois, possível selecionar *Pseudomonas* spp. ou melhorá-las geneticamente, capazes de crescerem em uma gama maior de condições ambientais.

### *Pythium oligandrum* e *Pythium nunn*

*Pythium oligandrum* Drechsler é um Mastigomycotina, Oomiceto, Pythiaceae. Vários estudos têm comprovado o parasitismo necrotrófico de *P. oligandrum* sobre espécies de *Pythium* e de outros fungos, como: *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Phialophora radicolica*, *Botryotrichum piluliferum*, *Fusarium nivale*, *Psalliota* spp., *Phialophora graminicola*, *Arthrotrichum superba* (Deacon, 1976) e *Rhizoctonia solani* (Al-Hamdani & Cooke, 1983). No entanto, *P. oligandrum* foi descrito primeiramente como um patógeno de plantas, causando podridão radicular em ervilha e em outras culturas. O fungo está quase sempre associado a *P. debaryanum* e outras espécies de *Pythium* spp. como um invasor secundário dos tecidos vegetais. A natureza da relação de

*P. oligandrum* com raízes de plantas ainda não está clara. Pieczarka & Abawi (1978) encontraram *P. oligandrum* associado comumente a raízes de feijoeiro, porém sem causar sintomas. O fungo, todavia, não tem sido reconhecido como fitopatógeno, mas há relatos de que alguns isolados podem causar pequenos efeitos deletérios em certas culturas (Kilpatrick, 1968; Martin & Hancock, 1986).

**Controle biológico.** Com relação aos mecanismos pelos quais *P. oligandrum* age sobre seus hospedeiros, há evidências comprovadas de que o antagonista pode detectar e localizar as hifas de espécies-alvo no seu microhabitat. Por exemplo, *P. oligandrum* cresce em direção a hifas de fungos suscetíveis, presumivelmente em resposta a um estímulo químico produzido pela hifa-alvo (Lutchmeah & Cook, 1984). Além de causar deformações na hifa de seus hospedeiros, *P. oligandrum* provoca uma degeneração citoplasmática poucos minutos após o contato com *Sclerotium cepivorum* (Lutchmeah & Cook, 1984).

As paredes de células de Oomicetos, como *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp. são compostas na sua maioria de  $\beta$ -glucanas, celulose e menos de 1,5% de quitina (Dietrich, 1973; Novaes *et al.*, 1967). Em contraste, paredes de células dos Basidiomicetos e Ascomicetos contêm uma concentração relativamente superior de quitina, assim como de  $\beta$ -glucanas. Já as paredes de células dos Mucorales contêm quitina e quitosan. Evidencia-se que a produção de celulasas e glucanases por *P. oligandrum* que degradam paredes de células pode ser um importante fator no controle biológico de *Pythium* spp.

Uma forte agressividade de *P. oligandrum* (isolado IMI 133857) contra *P. ultimum* foi observada por Al-Hamdani *et al.* (1983) através da incorporação do micoparasita a sementes de agrião (*Lepidium sativum* L.) impregnadas com carboximetil celulose. O tombamento de plântulas causado por *P. ultimum* em solos naturalmente infestados foi sensivelmente reduzido. Esse fato foi atribuído à germinação de oosporos do micoparasita na superfície das sementes com subsequente geração de uma camada protetora de micélio na espermosfera e rizosfera.

Uma outra espécie de *Pythium*, *P. nunn* Lifshitz, Stanghellini & Baker tem sido descrita como micoparasita de *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. e de outros fungos fitopatogênicos (Lifshitz *et al.*, 1984b). O fungo foi primeiramente isolado de um solo supressivo a *P. ultimum* (Lifshitz *et al.*, 1984a).

Tem-se verificado que *P. nunn* produz  $\beta$ -1,3-glucanase e celulase quando ele é crescido em meio de cultura suplementado com paredes de células de *P. ultimum* e produz quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase na presença de paredes de células de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* (Elad *et al.*, 1985). Essas enzimas hidrolíticas foram produzidas em culturas pareadas de *P. nunn* com várias espécies de *Pythium*, *Phytophthora*, *Mucor*, *Rhizopus*, *R. solani* e *S. rolfsii*, mas não foram detectadas com 10 fungos Deuteromicetos não-hospedeiros. Essa diferença, segundo Elad *et al.* (1985) pode ser devida à camada externa de mucilagens da parede celular associada com esses fungos não-hospedeiros. Isso sugere que a gama de hospedeiros de *P. nunn* é limitada.

Supressão de *P. ultimum* em plântulas de pepino foi induzida quando inóculo de *P. nunn* foi adicionado a um solo suplementado com folhas de feijão trituradas. Quando somente o inóculo de *P. nunn* foi adicionado ao solo, não houve crescimento saprofítico do antagonista e nenhuma supressividade a *P. ultimum* (Paulitz & Baker, 1987). Essa evidência indica que *P. nunn* pode competir com *P. ultimum* pelos mesmos substratos.

### *Sporidesmium sclerotivorum*

*Sporidesmium sclerotivorum* Vecker, Ayers & Adams é um Deuteromiceto, Hifomiceto, Dematiaceae. Foi primeiramente descrito como hiperparasita de escleródios de *Sclerotinia minor* (Vecker *et al.*, 1979).

**Controle biológico.** Segundo Ayers & Adams (1979), mais de 95% dos escleródios de *S. minor* tornam-se parasitados dentro de 10 dias. O fungo é potencialmente ativo como micoparasita de células sem melanina, atacando, portanto, *S. sclerotivorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotinia trifoliorum* e *Botrytis cinerea*. Observou-se, no entanto, que escleródios de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani* não são parasitados por esse micoparasita (Ayers & Adams, 1979).

*S. sclerotivorum* é um parasita com hábito extremamente especializado, cujos esporos somente germinam na presença de escleródios (Adams & Ayers, 1983). Uma outra característica é que *S. sclerotivorum* infecta escleródios sem formar qualquer estrutura de penetração. Uma vez dentro do escleródio, a hifa penetra intracelularmente, tornando o escleródio mole, o qual se desintegra com o tempo (Adams & Ayers, 1983; Ayers & Adams, 1979). O parasita sobrevive no interior do es-

cleródio utilizando para isso enzimas produzidas pelo escleródio, que auxiliam na sua auto-digestão. *S. sclerotivorum* é ativo como parasita em solos com temperaturas entre 20-25°C e numa faixa de pH que varia entre 5.5 a 7.5. O fungo cresce no solo com um potencial de água de -8 bares ou superior a este (Adams & Ayers, 1980). Em seus experimentos, Adams & Ayers (1981) não encontraram nenhuma evidência de que o fungo exista como saprófita na natureza.

Em condições naturais de campo, uma única aplicação de esporos do fungo desenvolvido em areia esterilizada, contendo 1% de escleródios vivos de *S. minor*, reduziu o desenvolvimento da podridão de alface causada por *Sclerotinia minor* em 40-80% em quatro cultivos sucessivos, durante dois anos (Adams & Ayers, 1982; Adams *et al.*, 1984). Esses mesmos autores, estudando a dinâmica populacional de *Sporidesmium sclerotivorum*, observaram que um número tão baixo de inóculo na ordem de cinco macroconídios por grama de solo, ou 22 kg/ha é suficiente para infectar escleródios. Cada escleródio infectado suporta a produção de aproximadamente 15.000 novos macroconídios no solo (Adams *et al.*, 1984).

**Considerações gerais.** *S. sclerotivorum* mostra-se como um potente agente de controle de *S. minor* e *S. sclerotiorum*. No entanto, alguns fatores podem limitar, em parte, seu uso como agente de biocontrole em condições tropicais. Um deles é a temperatura, pois o fungo cresce e infecta escleródios no solo em uma faixa de 20-25°C e sabe-se que *S. sclerotiorum* ataca muitas espécies de plantas em temperaturas mais altas. É possível, no entanto, selecionar linhagens mais adaptadas a essas condições.

## ***Streptomyces***

*Streptomyces* são bactérias Gram-positivas classificadas como Eubactérias, Actinomicelates, aeróbias estritas encontradas no solo, em restos de culturas vegetais e em água, com um ciclo de vida complexo, alternando a formação de esporos e micélio. São bactérias dominantes em quase todos os solos (Williams *et al.*, 1984), sendo a maioria das espécies de *Streptomyces* saprofíticas. São capazes de crescer em potencial de água tão baixo quanto -60 bares, a uma temperatura ótima de 25-37°C e em pH alcalino e neutro.

*Streptomyces* é o gênero mais bem estudado, em termos biotecnológicos, dentre os membros da família *Actinomycetales*. Espécies de

*Streptomyces* são produtoras de antibióticos, enzimas e inibidores enzimáticos, com aplicações nas áreas de medicina, agricultura e veterinária. De acordo com Willians & Vickens (1988), cerca de 3.477 antibióticos produzidos por *Streptomyces* foram descobertos e patenteados até 1984.

**Produção de antibióticos.** Estreptomicina, o primeiro antibiótico aminoglicosídeo descoberto, foi isolado a partir de uma cultura de *S. griseus* (Schatz *et al.*, 1944). Outras espécies de *Streptomyces* produzem estreptomicina em produtos da mesma família, como: manostreptomicina, dihidroestreptomicina, manosidodihidroestreptomicina, N-dimetilestreptomicina, hidroxistreptomicina. Entre estes, somente estreptomicina e seu derivado, dihidroestreptomicina, produzidos industrialmente através da redução catalítica da estreptomicina, são usados diariamente.

Na área agrícola, alguns metabólitos secundários produzidos por actinomicetos têm sido comercializados como fungicidas. A maioria destes é produzida por *Streptomyces* (Tabela 8).

TABELA 8. Fungicidas à base de antibióticos produzidos por actinomicetos.

Organismo	Composto	Alvo
<i>Streptomyces caespitosus-detoxicus</i>	Blasticidina	bruzone (arroz)*
<i>S. hygroscopicus</i>	Validamicina	requeima (arroz)
<i>S. kasugaensis</i>	Kasugamicina	bruzone (arroz)
<i>S. auvochoromogenes</i>	Ploixina (A-K)	requeima (arroz)
<i>Streptoverticillium rimofaciens</i>	Mildiomicina	oídio

Fonte: Lange *et al.* (1993)

\*A bruzone tem como agente causal o fungo *Pyricularia oryzae*.

O potencial dos estreptomicetos para produzirem pesticidas é evidenciado pelas avermectinas, um grupo de metabólitos produzidos por *S. avermitilis*. As avermectinas e seus derivados semi-sintéticos são ativos contra certos nematóides em doses extremamente baixas, mas apresentando, no entanto, baixa toxicidade em mamíferos (Heisey *et al.*, 1988). Entre as avermectinas, avermectina B1 e, em menor extensão, avermectina B2a têm sido estudadas contra *Meloidogyne incognita*.

Vários outros grupos fitopatogênicos são inibidos por diferentes espécies de *Streptomyces*. *Macrophomina phaseolina*, que causa tombamento de plântulas e podridões de raízes, caules e vagens em mais de 400 espécies de plantas (Dhingra & Sincliar, 1975), foi inibido por *S. griseus* e *S. noursei* (Ghaffar, 1971). A sobrevivência de *M. phaseolina* na rizosfera de plantas de juta foi baixa na presença de *S. fradiae* (Mukhopadhyaya & Nandi, 1978). Significante redução na infecção do algodoeiro causada por *M. phaseolina* foi conseguida com a utilização de *S. albus* e *S. griseus*, sem efeitos deletérios no crescimento de plantas (Ghaftan, 1971).

*Rhizoctonia solani* também é inibido por *Streptomyces* sp. O tombamento de plântulas de alface foi controlado por *S. lavendulae* quando o solo foi suplementado com matéria orgânica (Wood, 1951).

Embora a variabilidade inter e intraespecífica de *Streptomyces* existente seja grande para muitos caracteres de importância biotecnológica, é possível, através de técnicas de genética clássica, proceder ao melhoramento de linhagens, visando aumentar a capacidade de controlar patógenos. É o que fizeram El-Abyad & El-Batanoiny (1993). Esses pesquisadores isolaram de solos egípcios duas espécies de *Streptomyces*, *S. corchorusii* e *S. spiroverticillatus* antagônicas, a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e *Pseudomonas solanacearum*, respectivamente. Numa tentativa de melhorar as atividades antimicrobianas dessas bactérias, os autores obtiveram, através de irradiação com luz ultravioleta, mutantes com eficiência superior no biocontrole. Um mutante de *S. corchorusii* destruiu completamente as hifas de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* e reduziu a incidência da podridão de raízes de feijoeiro em um grau superior à linhagem selvagem.

**Considerações gerais.** Os actinomicetos são relativamente resistentes à dessecação e podem sobreviver sob condições de seca em solos desérticos. São favorecidos em pH alcalino e neutro (7.0-8.0). No entanto, *Streptomyces* são tolerantes às condições ácidas (Davies & Williams, 1970), enquanto solos áridos de pH alcalino tendem a ter uma baixa população de *Streptomyces* e um número bem maior de outros gêneros raros, como *Actinoplanes* e *Streptosporangium*. Assim, num programa de seleção de actinomicetos para fins de biocontrole, é fundamental selecionar espécies/genêros adaptados àquelas condições onde a doença é prevalente.

Poucos trabalhos têm se referido à utilização de actinomicetos para o controle biológico, apesar da enorme quantidade de metabólitos secundários produzidos por esse grupo de bactérias. As razões para isso são várias, a começar pelas dificuldades de isolamento de actinomicetos com potencial de uso. Actinomicetos são bactérias de crescimento lento e, portanto, devem ser incubadas por até semanas, para visualização de espécies "raras", com potencial biotecnológico.

Um meio de cultura que tem se mostrado eficiente para isolamento de actinomicetos do solo é o que contém quitina coloidal, desenvolvido por Hsu e Lockwood (1975). Em geral, esses meios possuem fontes complexas de carbono e nitrogênio, tais como amido, caseína, ácido húmico etc. Portanto, com altas taxas de carbono-nitrogênio, reduz-se o número de bactérias quando do isolamento de actinomicetos em meio de cultura, pois as bactérias se desenvolvem melhor em meio com baixa taxa carbono-nitrogênio e são incapazes de atacar polímeros resistentes de alto peso molecular (Gray & Willians, 1971).

### *Talaromyces flavus*

*Talaromyces flavus* (Klocker) Stolk & Samson (anamorfo *Penicillium vermiculatum* Dangeard) é um Ascomiceto, comum em solos cultivados. Caracteriza-se por possuir cleistotécio pequeno (100-500  $\mu$ ) globoso ou subgloboso, superficial, não ostiolado, de coloração amarelada. Os ascósporos são na sua maioria granulados, raramente ornamentados, contínuos, hialinos, variando em tamanho de 3,0-6,0  $\mu$ m (Stolk & Samson, 1972). As estipes de conidióforos nascidos de hifas aéreas, chegam a medir de 20 a 80  $\mu$ m de comprimento. Nesse estágio *Penicillium* é tipicamente biverticilado, simétrico e comumente menos monoverticilado, com medula de 10-15  $\mu$ m de comprimento, fiálide acerosa de 10-16  $\mu$ m de comprimento, conídios elipsoides ou fusiformes, com medidas de 2,2-3,5 x 2,0 x 2,5  $\mu$ m, paredes enrugadas e espinhosas.

As colônias de *T. flavus*, em meio MEA, usualmente são amarelas e produzem exsudados de cor vermelha, que são melhor visualizados no reverso da placa de Petri.

Os ascósporos de *T. flavus*, termotolerantes, podem suportar uma temperatura de 100°C por 30 min. (Van der Spy *et al.*, 1975).

**Controle biológico.** O fungo *T. flavus* é um parasita natural de *Verticillium dahliae*, importante patógeno que afeta centenas de cultu-

ras agrícolas, causando murcha vascular. A adição de esporos de *T. flavus* a solos naturais foi seguida por um aumento na respiração do solo e um aumento na população do fungo (Marois & Fravel, 1983). Fahima & Henis (1990) observaram a formação de conidióforos de *T. flavus* sobre microescleródios de *V. dahliae* na superfície radicular. *T. flavus* inibe o crescimento micelial e afeta a germinação de microescleródios de *V. dahliae* através da produção de metabólitos tóxicos, entre eles o talaron (Mizuno *et al.*, 1974). O fungo produz também metabólitos extracelulares que têm forte efeito inibidor contra fungos, bactérias e protozoários (Kim *et al.*, 1986; Fravel *et al.*, 1987; Saito & Melo, 1997). Um desses metabólitos, uma enzima identificada como  $\beta$ -D-glucose oxigênio redutase (Kim *et al.*, 1988), cataliza a oxidação de glucose a gluconato e peróxido de hidrogênio. Glucose oxidase na presença de glucose inibe e destrói microescleródios de *V. dahliae*, tanto *in vitro* como no solo (Kim *et al.*, 1987). *T. flavus* é conhecido também por produzir outros antibióticos, como vermicilina, vermiculina, vermistatina e ácido 2-metil sórbico (Freska *et al.*, 1972; 1979; Proska *et al.*, 1992).

O micoparasitismo está envolvido no controle de *S. sclerotiorum* (McLaren *et al.*, 1986) e *S. rolfsii* (Madi & Henis, 1989) por *T. flavus*. Em condições controladas e em condições de campo *T. flavus* diminuiu sensivelmente a murcha de *Verticillium* em berinjela (Saito *et al.*, 1994; Marois *et al.*, 1982). A Fig. 5 ilustra o efeito de uma linhagem de *T. flavus* no controle da murcha em berinjela.

O antagonista coloniza raízes de batata e de berinjela e se move a partir de sementes tratadas com ascósporos para raízes em desenvolvimento, incluindo as pontas das raízes. Nagtazaam & Bollen (1997) sugerem que esse transporte passivo seja um dos principais fatores envolvidos na colonização pelo fungo. O controle biológico deveria objetivar o estabelecimento de altas densidades do antagonista sobre a raiz no início do plantio, em particular perto das pontas e pêlos radiculares.

**Produção de inóculo e formulação.** *T. flavus* se desenvolve bem, com uma biomassa abundante em meio líquido à base de melão de cana-de-açúcar e levedura de indústria (Papavizas *et al.*, 1984). Uma formulação granulada à base de alginato e argila foi desenvolvida por Fravel *et al.* (1985). Os autores observaram que a formulação à base de ascósporos apresenta uma maior viabilidade do que a formulação à base de conídios. A estes ingredientes Papavizas *et al.* (1987) acrescentaram farelo de trigo no desenvolvimento dos "pelets". Estes, por sua



FIGURA 5. Bioensaio realizado em casa-de-vegetação sobre o controle de *Verticillium dahliae* em berinjela com uma linhagem de *Talaromyces flavus*, T4. O vaso à esquerda da fotografia continha somente solo artificialmente infestado com o patógeno e o vaso à direita, solo infestado com o patógeno e inóculo de *T. flavus*.

vez, quando introduzidos no solo, resultaram em uma maior atividade no biocontrole, apresentando uma germinação mais rápida de conídios. Os benefícios do farelo de trigo estão associados ao fornecimento de uma base alimentar prontamente disponível para o crescimento do antagonista no solo, onde este invade completamente o substrato antes que os microrganismos não desejáveis possam colonizá-lo.

### ***Trichoderma* spp.**

*Trichoderma* spp. é um Deutoremiceto, sub-classe Hifomiceto, ordem Moniliales, família Moniliaceae. É um fungo que produz conídios em abundância a partir de conidióforos que se originam diretamente das hifas (Fig. 6). O estado Teleomórfico, quando conhecido, pertence a *Hypocrea* ou a um gênero relacionado. Rifai (1964) descreveu nove agregados de espécies: 1) *Trichoderma piluliferum*, 2) *T. polysporum*, 3) *T. hamatum*, 4) *T. koningii*, 5) *T. aureoviride*, 6) *T. pseudokoningii*, 7) *T. harzianum*, 8) *T. longibrachiatum* e 9) *T. viride*. Bissett (1984)

fez uma revisão do gênero *Trichoderma* e estabeleceu *Longibrachiatum* como uma seção do gênero na qual incluía *T. viride*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* e *T. longibrachiatum* e adicionou duas novas espécies, *T. citrinoviride* e *T. atroviride*. As espécies de *Trichoderma* dentro de um mesmo grupo ou seção apresentam características sobrepostas, o que torna difícil a classificação de isolados.

O gênero *Trichoderma* é natural do solo, especialmente em solos orgânicos, e pode viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos. Há relatos, embora muito poucos, de ocorrência de doenças de plantas causadas por *Trichoderma*.

**Controle biológico.** *Trichoderma* sp. é um micoparasita necrotrófico eficaz no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos, principalmente aqueles com estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos. *T. harzianum* tem sido a espécie mais estudada do ponto de vista do biocontrole, mas outras espécies como *T. koningii*, *T. viride*, *T. hamatum* e *T. pseudokoningii* também têm sido isoladas e estudadas. Sucesso maior com o uso de *Trichoderma* tem sido documentado para patógenos de solo, como: *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp. e *Pythium* spp. No entanto, diversos trabalhos têm documentado o parasitismo de *Trichoderma* a uma vasta gama de fungos fitopatogênicos (*Armillaria*, *Colletotrichum*, *Verticillium*, *Venturia*, *Endothia*, *Phytophthora*, *Rhizopus*, *Diaporthe*, *Fusicladium*, *Botrytis*, *Poria monticola*, *Stereum purpureum*).

**Modos de ação.** *Trichoderma* pode atuar, via de regra, através de um ou da associação dos seguintes mecanismos: parasitismo, antibiose e competição.

Revisões abordando os mecanismos de ação e exemplos de biocontrole por *Trichoderma* podem ser encontradas em Cook & Baker (1983), Papavizas (1985), Chet (1987), Wells (1988) e Melo (1996). Muitas espécies já estudadas possuem a capacidade de produzir metabólitos secundários tóxicos, tais como antibióticos e enzimas líticas capazes de inibir e destruir propágulos de fungos fitopatogênicos. Não se conhece, no entanto, o papel desses antibióticos *in situ*. Em condições de laboratório, *Trichoderma* produz uma gama de antibióticos com efeitos pronunciados contra fungos e bactérias, tanto de interesse agrícola como de interesse na medicina. A Tabela 9 sumariza alguns antibióticos produzidos por *Trichoderma*, muitos deles já comercializados.

Um novo antibiótico produzido por *T. koningii*, com atividade contra fungos fitopatogênicos, foi identificado recentemente por pesquisadores da EMBRAPA Meio-Ambiente (Frighetto & Melo, 1996).

TABELA 9. Antibióticos produzidos por *Trichoderma* sp., características e atividades.

Nome	Espécie	Estrutura/ caracterização	Atividade	Referências
Ciclosporina	<i>T. polysporum</i>	peptídeo	antifúngico, antiviral, imunossupressor	*
Tricopolinas	<i>T. polysporum</i>	peptídeo contendo 9 aminoácidos	G <sup>+</sup> , fungos fitopatogênicos,	*
Tricorzianina	<i>T. harzianum</i>	dipeptídeo	quelante de Fe <sup>3+</sup>	
Tricotoxina A-40	<i>T. viride</i>	octadeca-peptídeo	antiviral, modificador de membrana	*Bruckner et al., 1985
	<i>T. viride</i>	peptaíbol	G <sup>+</sup> , antiprotozoário	*
Alameticina	<i>T. viride</i>	peptídeo com 19 aminoácidos	G <sup>+</sup> , G <sup>-</sup> , propriedades hemolíticas	Brewer et al., 1987
Isonitrinas	<i>T. harzianum</i>	isocianida ciclopentil (provavelmente idêntico à dermadina)	antibacteriano	Fujiwara et al., 1982
Tricorzianinas (peptaíbol)	<i>T. harzianum</i>	peptídeo com 19 aminoácidos	modifica a polaridade e permeabilidade de membranas, ativo contra fungos fitopatogênicos	El-Hajji et al., 1987; Merlier et al., 1984; Bodo et al., 1985
Dermadina	<i>T. koningii</i>	pertence ao grupo isocianídrico	G <sup>+</sup> , G <sup>-</sup> , antifúngico	Tamura et al., 1975; Pyke & Dietz, 1966
Tricoviridina	<i>T. koningii</i>	pertence ao grupo isocianídrico	ativo contra <i>Escherichia coli</i> e <i>Trichophyton asteroides</i>	Yamano et al., 1970
Ácido Heptelídico (ácido koníngico)	<i>T. koningii</i>	terpenoide (lactona sesquiterpeno)	antifúngico e antibacteriano, ativo contra <i>R. solani</i> , <i>Bacterioides fragilis</i> , tem efeito citostático em células de ratos, potente inibidor de ATP	Endo et al., 1985 Itoh et al., 1980

Nome	Espécie	Estrutura/ caracterização	Atividade	Referências
Pirona	<i>T. koningii</i>	6PP-1 e 6PP-2		Simon <i>et al.</i> , 1988 Ghisalberti <i>et al.</i> , 1990
Isonitrinas	<i>T. hamatum</i>	metabolismo de aminoácido	G <sup>+</sup> , G <sup>-</sup> , leveduras e fungos filamentosos	Fujiware <i>et al.</i> , 1982; Okuda <i>et al.</i> , 1982
Pirona	<i>T. hamatum</i>	6PP-1	ativo contra <i>Gaeumannomyces</i>	Ghisalberti <i>et al.</i> , 1990
Paracelsinas	<i>T. reesei</i> ( <i>T. longibrachiatum</i> )	peptibol, produzido por um mutante		Bruckner <i>et al.</i> , 1985
Trichobraquina	<i>T. longibrachiatum</i>	peptaibol		Bruckner <i>et al.</i> , 1990
Sorbivilinas	<i>T. longibrachiatum</i>	poliketideos	atividade contra <i>Mycena citricolor</i>	Andrade, 1989
Pirona	<i>T. harzianum</i>	G-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6PP-1) e 6-n-pentenyl-2H-pyran-2-one (6PP-2)	controle de fungos fitop. ( <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Ceratocystis ulmi</i> ), entre outros	Cladton <i>et al.</i> , 1987
Antraqui-nona	<i>T. harzianum</i>	1-hidroxy-e 1,8-dihidroxy-3-metilanthraquinona	controle de <i>Gaeumannomyces graminis</i>	Ghisalberti <i>et al.</i> , 1990; Alamassi <i>et al.</i> , 1991
Piridona	<i>T. harzianum</i>	metabolismo de aminoácido	antifúngico, controle de <i>R. solani</i> e <i>B. cinerea</i>	Dickinson <i>et al.</i> , 1989

\*Fonte: Baseado na revisão de Kleinkauf & Von Döhren (1985)

\*Peptídeo contendo uma alta proporção de ácido  $\alpha$ -aminoisotritrico, com um N-terminal acetilado e um C-terminal amino álcool.

Enzimas líticas extracelulares degradadoras da parede celular de muitos fungos, tais como quitinases, celulasas,  $\beta$ -1,3-D-glucanases,  $\beta$ -1,4-glucosidase e proteases estão envolvidas no processo de parasitismo de *Trichoderma* (Ridout *et al.*, 1986; Elad *et al.*, 1982). A parede celular de muitos fungos é composta de  $\beta$ -1,3-glucana e quitina (*Sclerotium*

*rolfsii*, *Rhizoctonia solani*) e de celulose (*Pythium* sp., *Phytophthora* sp.). *T. harzianum* é capaz de se desenvolver nas paredes das células de *R. solani* como única fonte de carbono (Hadar *et al.*, 1979). Harman *et al.* (1981) melhoraram a eficácia de *T. hamatum* para controle de *Pythium* spp. e *R. solani* incorporando quitina ao solo. Segundo os autores, pressupõe-se que a indução desse polímero tenha aumentado a atividade da quitinase produzida por *Trichoderma*. Para provar que há uma atividade enzimática maior nos pontos onde *T. harzianum* parasita *S. rolfisii* ou *R. solani*, Elad *et al.* (1983) usaram com sucesso microscopia de fluorescência, observando nos pontos de ataque grampos de conexão e enrolamento de hifas. As fases do micoparasitismo envolvem localização, reconhecimento, contato e penetração, bem como aquisição de nutrientes. *Trichoderma* pode detectar e localizar hifa de fungos suscetíveis, crescendo em sua direção, presumivelmente em resposta a estímulos químicos produzidos pela hifa hospedeira, geralmente enrolando-se fortemente em toda a sua extensão (Fig. 7), para depois haver, então, penetração da hifa.

Elad *et al.* (1982) sugeriram que linhagens de *Trichoderma* spp. podem ser selecionadas como agentes de biocontrole, com base na atividade de 1,3- $\beta$ -D-glucanase e quitinase, com quitina e glucana sendo, talvez, os substratos mais prováveis de ataque nas paredes de células de fungos fitopatogênicos.

Um outro mecanismo de ação de *Trichoderma*, ainda não muito bem compreendido cientificamente, é a capacidade de certos isolados promoverem o crescimento de planta e aumentarem a germinação e emergência de sementes (Baker *et al.*, 1989; Lynch *et al.*, 1991; Martins & Melo, 1989; Windham *et al.*, 1986). Também tem-se descoberto que certas linhagens de *Trichoderma harzianum* que colonizam a rizosfera são denominadas linhagens “competentes na rizosfera” (Ahmada & Baker, 1987; Melo *et al.*, 1997).

### ***Verticillium lecanii***

*Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viegas é um Deuteromiceto, Hifomiceto, Dematiaceae, Gloiosporae. Apresenta estágio teleomórfico (estádio sexual), tendo *Torrubiella* sp. descrito por Evans & Samson (1986) como teleomorfo de *V. lecanii*. Conídios podem ser produzidos a partir de micélio vegetativo.

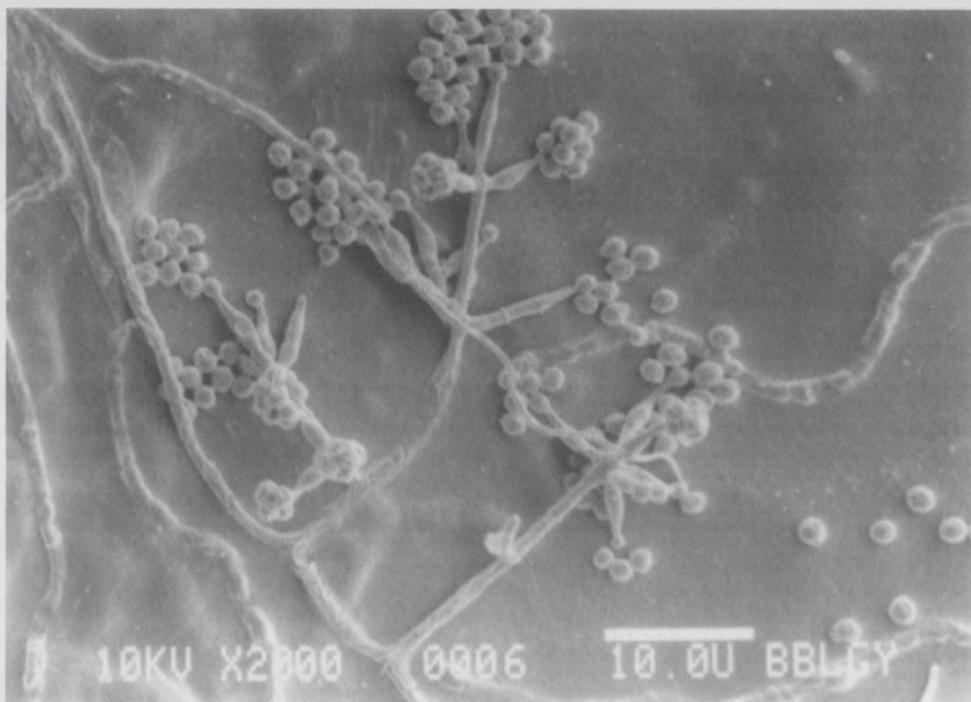


FIGURA 6. Elétron-micrografia de varredura da morfologia de *Trichoderma harzianum*. Visualiza-se conidióforos com fiálides e esporos.

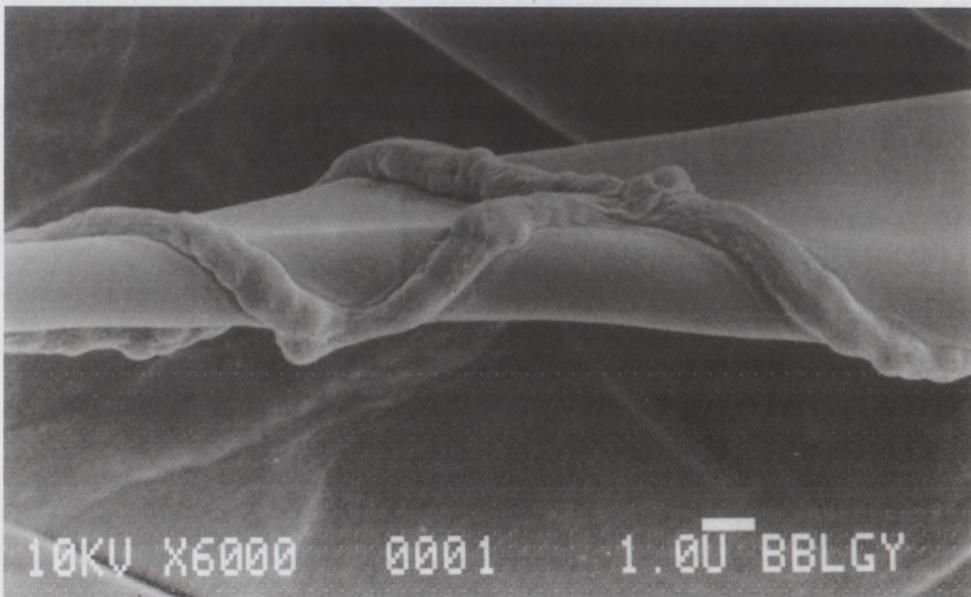


FIGURA 7. Elétron-micrografia de varredura do parasitismo de *Trichoderma harzianum* sobre *Rhizoctonia solani*.

O hiperparasita requer alta umidade relativa do ar para o crescimento sobre pústulas de ferrugem de *Puccinia striiformis*, sendo que a condição ótima de umidade é de 95 a 100%. Temperaturas entre 15 e 18°C são ideais para o bom desenvolvimento de *V. lecanii* sobre pústulas de *P. striiformis*, assim como altas intensidades de luz favoreceram o parasitismo (Mondgen, 1981). O fungo é extremamente sensível à irradiação ultravioleta (Conus & Melo, 1989), fato esse que pode impedir o desenvolvimento normal quando ele é aplicado no filopiano de plantas.

**Controle biológico.** *V. lecanii* vem sendo descrito como hiperparasita de uredíniosporos e tubos germinativos de fungos causadores de ferrugens. Linhagens de *V. lecanii* produzem grandes quantidades de proteases e quitinases em meio de cultura líquido (St. Leger *et al.*, 1986a).

Leal & Villanueva (1962) observaram o ataque de *V. lecanii* sobre uredíniosporos de *Hemileia vastatrix*, *Puccinia graminis* e *Melampsora* sp. Segundo os autores, a desintegração dos uredíniosporos ocorreu devido à produção de enzimas líticas.

*V. lecanii* foi descrito também como hiperparasita de *Puccinia striiformis* (Mendgen, 1981), *Uromyces appendiculatus* (Grabsky & Mendgen, 1985), *P. hordei*, *U. jabae* e *U. trifolii* (Silveira & Rodrigues, 1972).

O hiperparasita é capaz de penetrar em espermácia e uredíniosporos, mas raramente em teliósporos de ferrugens macrocíclicas. Fato este que impede, portanto, sua utilização no biocontrole de ferrugens macrocíclicas de culturas agrícolas cultivadas em casa-de-vegetação. Todavia, Srivastava *et al.* (1985) observaram colonização de tédio de *P. borianna* em folhas de crisântemo (*Chrysanthemum leucanthemum*) e *P. dianthi* em folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.). Em condições controladas, Spencer (1980) obteve resultados significativos quanto ao controle da ferrugem de cravo usando conídios de *V. lecanii*. O número de urédias por planta foi reduzido de 84 a 90% quando *V. lecanii* foi aplicado conjuntamente com uredíniosporos (Spencer & Atkey, 1981).

**Produção de inóculo.** *V. lecanii* pode ser produzido em meios de cultura, sólidos e líquidos. Esporos são produzidos com facilidade a partir de micélio vegetativo em sementes de milho. Após crescimento do fungo, as sementes são trituradas e os esporos são suspensos em água. Em meio de cultura líquido, o fungo chega a produzir mais de 10<sup>2</sup> esporos/litro de meio (Spencer, 1980; Spencer & Atkey, 1981).

Algumas linhagens de *V. lecanii* produzem muitos blastósporos em meio de cultura líquido e estes podem ser colhidos por centrifugação, secos e formulados. Esses esporos, no entanto, apresentam uma sobrevivência extremamente curta, requerendo armazenamento em baixas temperaturas.

*V. lecanii* é comercializado em alguns países com o nome de *Mycotal* para controle de afídeos e *Vertalec* para controle de mosca branca. Os dois produtos são derivados de duas diferentes linhagens. Um outro produto comercializado pela "Crop Genetics International" tem se mostrado promissor em ensaios de campo para controle de nematóides que atacam a cultura da soja (Rodgers, 1993).

**Considerações gerais.** Uma das principais limitações do uso de *V. lecanii* em condições brasileiras está relacionada às condições climáticas de temperatura e umidade. O fungo se desenvolve melhor e hiperparasita seus hospedeiros em baixas temperaturas, em torno de 18-22°C e com alta umidade relativa do ar entre 95-100%. Condições estas que ocorrem somente em curtos períodos do ano em áreas produtoras de café, onde o fungo pode ser visto, naturalmente, parasitando *H. vastatrix*. Desse modo, o hiperparasita não cumpre seu papel no biocontrole, porque quando as condições ambientais são ideais para o desenvolvimento da ferrugem (*H. vastatrix*), não o são para seu próprio crescimento.

*V. lecanii* apresenta crescimento micelial muito lento em meio sólido, como também uma baixa produção de conídios em meios semi-sólidos e líquidos, o que limita a produção de inóculo.

## CONCLUSÕES

Apesar do grande volume de trabalhos científicos na área de controle biológico de doenças de plantas, poucos produtos à base de microrganismos são disponíveis no mercado. Algumas áreas do conhecimento, como a Biotecnologia e a Biologia Molecular são acessíveis para melhorar a eficácia de muitos biopesticidas, mas há muitas lacunas a serem vencidas no sentido de se alcançar o pleno sucesso do controle biológico em condições naturais de campo. Uma dessas lacunas refere-se a um melhor entendimento sobre **ecologia** tanto dos agentes de controle, como do próprio patógeno-alvo. Fungos, por exem-

plo, se desenvolvem melhor em solos menos úmidos do que bactérias, as quais sob tais condições podem ser fracos antagonistas. No entanto, bactérias como *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces* são os agentes mais preferidos, dadas as suas características peculiares de amplo espectro de ação, de produzirem antibióticos e, no caso de *Bacillus*, por ser resistente aos fatores ambientes estressantes, como UV, dessecação e altas temperaturas. Por sua vez, a luz solar, particularmente a luz UV, e a temperatura podem limitar o uso de fungos no controle de doenças foliares. A irradiação UV pode reduzir a sobrevivência de conídios.

Devido a possíveis mutações e contaminação de produtos biológicos, eles deixam de cumprir sua finalidade maior e passam a diminuir em eficiência e também em credibilidade perante os agricultores. A instabilidade genética é inerente a organismos vivos. É bem conhecido que certos fungos e bactérias agentes de biocontrole, quando cultivados em fermentadores, podem perder caracteres genéticos importantes ligados à patogenicidade após sucessivos ciclos de reprodução *in vitro*. É, pois, fundamental proceder observações detalhadas sobre tal fenômeno com o agente com que se está trabalhando. Fungos do solo, por exemplo, devem ser mantidos em solo esterilizado ou liofilizados, ao invés de meios de cultura. Em organismos onde se tem comprovado perda de infectividade e/ou outras características, é primordial proceder sempre à inoculação em meio de cultura utilizando-se material da colônia parental. Reisolamentos periódicos também devem ser feitos, após inoculação do organismo em seus respectivos hospedeiros. O que se percebe é que o controle de qualidade de produtos biológicos deve ser extremamente rígido, e cuidado especial deve ser tomado desde a produção do inóculo até a formulação e armazenamento.

Além das características intrínsecas dos agentes de biocontrole, muitos outros fatores têm limitado a comercialização dos biopesticidas. Entre esses fatores encontram-se a suscetibilidade relativa de organismos vivos aos fatores edáficos e mudanças nas condições ambientais.

A exemplo do que ocorre no controle integrado de pragas, os agentes de controle de doenças devem tolerar os pesticidas químicos, ou melhor, devem ser usados em conjunto onde os fungicidas químicos poderiam ser usados em dosagens reduzidas, associados a agentes de biocontrole resistentes a esses mesmos fungicidas. Combinação de agentes de biocontrole também pode ser usada para aumentar o nível de controle. *T. harzianum* e *Pythium nunn* foram combinados para

reduzir a incidência de *Pythium ultimum* em pepino. Nelson *et al.* (1986) mostraram que a atividade de *Trichoderma* contra *Pythium* foi melhorada pela adição de lectina produzida por *Enterobacter cloacae*.

## AGRADECIMENTOS

O autor expressa seu agradecimento à Dra. Elizabeth A. de Nardo e ao Dr. João de Cássio Bonfim pela revisão do manuscrito.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, P.B.; AYERS, W.A. Biological control of *Sclerotinia* lettuce drop in the field by *Sporidesmium sclerotivorum*. **Phytopathology**, v.72, p.485-488, 1982.
- ADAMS, P.B.; AYERS, W.A. Factors affecting parasitic activity of *Sporidesmium sclerotivorum* on sclerotia of *Sclerotinia minor* in soil. **Phytopathology**, v.70, p.366-368, 1980.
- ADAMS, P.B.; AYERS, W.A. Histological and physiological aspects of infection of sclerotia of *Sclerotinia* species by two mycoparasites. **Phytopathology**, v.73, p.1072-1076, 1983.
- ADAMS, P.B.; MAROIS, J.J.; AYERS, W.A. Population dynamic of the mycoparasite *Sporidesmium sclerotivorum*, and its host, *Sclerotinia minor* in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.16, p.627-633, 1984.
- ADAMS, P.B.; AYERS, W.A. *Sporidesmium sclerotivorum*: distribution and function in natural biological control of sclerotial fungi. **Phytopathology**, v.71, p.90-93, 1981.
- AHMAD, J.S.; BAKER, R. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v.77, p.182-189, 1987.
- AHMED, A.H.M.; TRIBE, H.T. Biological control of white rot of onion (*Sclerotium cepivorum*) by *Coniothyrium minitans*. **Plant Pathology**, v.26, p.75-78, 1977.
- 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.
- ALLEN, D.A.; AUSTIN, B.; COLWELL, R.R. Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a fresh water fishery. **Journal of General Microbiology**, v.129, p.2043-2062, 1983.
- ALMASSI, F.; GHISALBERTI, E.L.; NARBEBY, M.J.; SIVASITHAMPARAM, K. New antibiotics from strains of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Natural Products**, v.54, p.396-402, 1991.
- AMORIN, E.P.R. Controle biológico de *Phytophthora nicotinae* parasitica e *P. citrophthora* em plântulas de Citros. Tese de Doutorado na Unesp, Botucatu, 111p., 1997.
- ANDRADE, G.; AZCÓN, R.; BETHLENFALVAY, G.J. A rhizobacterium modifies plant and soil responses to the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Applied Soil Ecology**, v.2, p.195-202, 1995.
- ANDRADE, R. Metabolites of *Trichoderma longibrachiatum*. **Dissertation Abstracts** (International Edition), v.50, p.5063, 1990.
- ASANTE, G.S.; NEAL, A.L. Characterization of fungistatic substances produced by a *Bacillus* antagonistic to *Ceratomyces ulmi*. **Phytopathology**, v.54, p.819-822, 1964.
- AYERS, W.A.; ADAMS, P.B. Mycoparasitism of sclerotia of *Sclerotinia* and *Sclerotium* species by *Sporidesmium sclerotivorum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.25, p.17-23, 1979.
- BABAD, J.; PINSKY, A.; TURNER-GRAFF, R.; SHARON, N. An antifungal polypeptide produced by *Bacillus subtilis*. **Nature**, v.170, p.618-619, 1952.
- BACKMAN, P.A.; TURNER JR., J.T. Plant response and disease control following seed inoculation with *Bacillus subtilis*. In: BROWER, J.M. **Processing Beltwide Cotton Products Research Conference**, Memphis, 1989, p.16-17.
- BAHME, J.B.; SCHROTH, M.N. Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato. **Phytopathology**, v.77, p.1093-1100, 1987.
- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; SASSER, M.; MACFALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. **Phytopathology**, v.73, p.1148-1152, 1983.
- BAKER, R. Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v.7, p.34-38, 1989.
- BAKKER, A.W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.451-457, 1987.
- BARNETT, H.L.; LILLY, V.G. A destructive mycoparasite, *Gliocladium roseum*. **Mycologia**, v.54, p.72-77, 1962.
- BASHAN, Y. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that effect plant growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, p.1089-1098, 1986.

- BECKER, J.O.; SCHWINAN, F.J. Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook. **Pesticide Science**. v.37, p.355-363, 1993.
- BETTIOU, W.; GALVÃO, J.A.H.; GHINI, R.; MENDES, M.D.L. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*). **Summa Phytopathologica**. v.15, p.43, 1989 (Abstract).
- BLAKEMAN, J.P.; BRODIE, I.D.S. Competition for nutrients between epiphytic micro-organisms and germination of spores of plant pathogens on beetroot leaves. **Physiological Plant Pathology**, v.10, p.29-42, 1977.
- BLAKEMAN, J.P.; FOKKEMA, N.J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Review of Phytopathology**. v.20, p.167-192, 1982.
- BLUM, L.E.B.; WILSON, M.; BACKMAN, P. Biological control of *Septoria lycopersi* with epiphytic bacteria and yeasts under greenhouse. **Phytopathology**. v.86, p.937 (Abstract), 1996.
- BODO, B.; REBUFFAT, S.; EL HAJJI, M.; DAVOUST, D. Structure of trichorzianines A IIs, an antifungal peptide from *Trichoderma harzianum*. **Journal of the American Chemical Society**. v.107, p.6011-6017, 1985.
- BOWEN, G.D.; THEODORON, C. Interactions between bacteria and ectomycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**. v.11, p.119-126, 1979.
- BRANDÃO, M.; VALARINI, P.J.; MELO, I.S.; MAIA, A.H. Desenvolvimento de uma formulação contendo *Bacillus subtilis* para controle da podridão radicular do feijoeiro. In: CONGRESSO DE FITOPATOLOGIA, 21., 1998. Botucatu. **Resumos**. p.123.
- BRAUN, P.G.; SUTTON, J.C. Effectiveness of fungicides in reducing inoculum production by *Botrytis cinerea* in dead strawberry leaves. **Proceedings British Crop Protection Conference of Pests Diseases**. v.3, p.971-976, 1984.
- BREWER, D.; MASON, F.G.; TAYLOR, A. The production of alamethicins by *Trichoderma* spp. **Canadian Journal of Microbiology**. v.33, p.619-625, 1987.
- BRUCKNER, H.; KONIG, W.A.; AYDIN, M.; JUNG, G. Trichotoxin A40. Purification by counter current distribution and sequencing of isolated fragments. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.827, p.51-62, 1985.
- BULLA JR., L.A.; COSTILOW, R.N.; SHARPE, E.S. Biology of *Bacillus popilliae*. **Advanced Applied Microbiology**. v.23, p.1-18, 1978.
- CAMPBELL, W.A. A new species of *Coniothyrium* parasitic on sclerotia. **Mycologia**. v.39, p.190-195, 1947.
- CENTURION, M.A.P.C. Controle biológico da ferrugem (*Uromyces phaseoli*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). In: BETTIOU, W., org. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1991, p.345-382, 388p.
- CHANG, I.; KOMMEDAKL, T. Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. **Phytopathology**. v.58, p.1395-1401, 1968.
- 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.
- CLAYDON, N.; ALLAN, M.; HANSON, J.R.; AVENT, A.G. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. **Transactions of the British Mycological Society**. v.88, p.503-513, 1987.
- CONUS, G.A.; MELO, I.S. Obtenção de biótipos de *Verticillium lecanii* resistentes à luz ultravioleta e avaliação de sua capacidade de controle de *Hemileia vastatrix*, agente causal da ferrugem do cafeeiro. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 3., 1989, Piracicaba, p.94.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, **American Phytopathological Society**, p.539, 1983.
- 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.; MEYER, S.F.; QUIMBY, 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.
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. An annotated bibliography of *Macrophomina phaseoli*.
- DI PETRO, A.; LORITO, M.; HAYES, C.K.; BRIADWAY, 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.
- DICKINSON, J.M.; HANSON, J.R.; HITCHCOCK, P.B.; CLAYDON, N. Structure and biosynthesis of harzianopyridone, an antifungal metabolite of *Trichoderma harzianum*. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions**. v.1, p.1885-1887, 1989.
- DOWLING, D.N.; O'GARA, F. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. **Tibtech**. v.12, p.133-141, 1994.
- DRAHOS, D.J.; HEMMING, B.C.; McPHERSON, S. Tracking recombinant organisms in the environment:  $\beta$ -galactosidase as a selectable nonantibiotic marker for fluorescent pseudomonads. **BioTecnology**, v.4, p.439-444, 1986.
- EDWARDS, S.G.; MCKAY, T.; SEDDON, B. Interactron g. *Bacillus* species with *Phytopathogenic* Fungi - Methods g. Analysis and Manipulation for biocontrol Purposes. In: BLAKEMAN, J.P.E.; WILLIAMSON, B. ed. **Ecology of plant Pathogens**. CAB International, Bristol, UK, 1994, p.101-118.
- EICHERS, T.R. Use of pesticides by farmers. In: PIMENTEL, D., ed. **CRC handbook of pest management in agriculture**, Boca Raton: CRC Press, 1981. v.2, p.3-54.
- EL HAJJI, M.; REBUFFAT, S.; LECOMMANDEUR, D.; BODO, B. Isolation and determination of trichorzianines A antifungal peptides from *Trichoderma harzianum*. **International Journal of Peptide Protein Research**, v.29, p.207-215, 1987.
- EL-ABYAD, M.S.; EL-BATANI, N.H. Inhibitory effects of UV mutants of *Streptomyces corchorusii* and *Streptomyces spiroverticillatus* on bean and banana wilt pathogens. **Canadian Journal of Botany**. v.71, p.1080-1086, 1993.

- ELAD, Y.; CHET, I.; BOYLE, P.; HENNIS, Y. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* on electron microscopy and fluorescence microscopy. **Phytopathology**, v.73, p.85, 1983.
- ELAD, Y.; CHET, I.; HENNIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.28, p.719-725, 1982.
- ELAD, Y.; LIFSCHITZ, 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.
- ENDO, A.; HASUMI, K.; SAKAI, K.; KANBE, T. Specific inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by koningic acid (heptelic acid). **Journal of Antibiotics**, v.38, p.920-925, 1985.
- ERCOLANI, G.L. *Pseudomonas savastoni* and other bacteria colonizing the surface of olive leaves in the field. **Journal of General Microbiology**, v.109, p.245-257, 1978.
- FAHIMA, T.; HENNIS, Y. Interactions between pathogen, host and biocontrol agent: multiplication of *Trichoderma harzianum* and *Talaromyces flavus* on roots of diseased and healthy roots. In: HORNBY, D. ed. **Biological control of soil-borne plant pathogens**. Wallingford: CAB International, 1990. p.165-180.
- FAHMY, F.; FLOSSDORF, J.; CLAUUS, D. The DNA base composition of type strains of the genus *Bacillus*. **Systematic Applied Microbiology**, v.6, p.60-65, 1985.
- FERNANDES, M.C.A.; LEAL, N.R. **Controle de oídio em quiabeiro**. Itaguaí: PESAGRO, 1985. 4p. (PESAGRO-RIO. Pesquisa em Andamento).
- FRAVEL, D.R.; BAKER, C.J.; RISTAINO, B.J. Metabolite produced by *Talaromyces flavus* reduces viability of microesclerotia of *Verticillium dahliae* in vitro and in soil. **Phytopathology**, St. Paul, v.75, p.625, 1985.
- FRAVEL, D.R.; KIM, K.K.; PAPAIVAS, G.C. Viability of microesclerotia of *Verticillium dahliae* reduced by a metabolite produced by *Talaromyces flavus*. **Phytopathology**, St. Paul, v.77, p.616-619, 1987.
- FRAVEL, D.R.; MAROIS, J.J.; LUMSDEN, R.D.; CONNICK, W.J. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate - clay matrix. **Phytopathology**, St. Paul, v.75, p.774-777, 1985.
- FRIGHETTO, R.T.S.; MELO, I.S. Isolation of a new biologically active compound from *Trichoderma koningii*. **Annual Meeting of International Society of Chemical Ecology**, 13., Praga, 1996, p.180.
- FUJIWARA, A.; OKUDA, T.; MASUDA, S.; SHIOMI, Y.; MIYAMATO, C.; SEKINE, Y.; TAZOE, M.; FUJIWARA, M. Fermentation, isolation and characterization of isonitrile antibiotics. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.46, p.1803-1809, 1982.
- FUSKA, J.; FUSKOVA, A.; NEMEC, P. Vermistatin, an antibiotic with cytotoxic effects produced from *Penicillium vermiculatum*. **Biologia (Bratislava)**, v.34, p.735-740, 1979a.
- FUSKA, J.; NEMEC, P.; KUHR, I. Vermiculine, a new antiprotazoal antibiotic from *Penicillium vermiculatum*. **Journal of Antibiotic**, Tokyo, v.25, p.208-211, 1972.
- GHAFFAR, A. Interaction of actinomycetes with *Macrophomina phaseoli*, the cause of root rot of cotton. **Mycopathology Mycology Applied**, v.44, p.271, 1971.
- GHISALBERTI, E.L.; NARBAY, M.J.; DEWAN, M.M.; SIVASITHAMPARAM, K. Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. **Plant and Soil**, v.121, p.287-291, 1990.
- GINDRAT, D.; VAN DER HOEVEN, E.; MOODY, A.R. Control of *Phomopsis sclerotoides* with *Gliocladium roseum* or *Trichoderma*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.83, n.1, p.429-438, 1977.
- GRAHAM-WEISS, L.; BENNETT, M.L.; PAAU, A.S. Production of bacterial inoculants by direct fermentation on nutrient supplemented vermiculite. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.2138-2141, 1987.
- GRAY, T.R.G.; WILLIAMS, S.T. **Soil micro-organisms**. Hafner, New York, p.55, 1971.
- HADAR, Y.; CHET, I.; HENNIS, 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 seeds as a biocontrol agent. **Phytopathology**, v.71, p.569-572, 1981.
- HARRISON, L.A.; LETENDRE, L.; KOVACEVICH, P.; PIERSON, E.; WELLER, D. Purification of an antibiotic effective against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritice* produced by a biocontrol agent, *Pseudomonas aurefaciens*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.25, p.216-221, 1993.
- HASHIOTA, Y.; NAKAI, Y. Ultrastructure of pycnidial development and mycoparasitism of *Ampelomyces quisqualis* parasitic on *Erysiphe*. **Transactions Mycological Society of Japan**, v.21, p.329, 1980.
- HEBBAR, K.P.; ATKINSON, D.; TUCKER, W.; DART, P.J. Suppression of *Fusarium moniliforme* by maize root-associated *Pseudomonas cepacia*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, n.10, p.1009-1020, 1992.
- HEISY, R.M.; MISHRA, S.K.; PUTNAM, A.R.; MILLER, J.R.; WHITENACK, C.J.; KELLER, J.E.; HUANG, J. Production of herbicidal and insecticidal metabolites by soil microorganisms. In: HORACE, G.C., ed. **Biologically active natural products-potential use in agriculture**. ACS symposium Series, 1988. p.483. (ACS Symposium Series).
- HERNSTADT, C.; SOARES, G.C.; WILCOX, E.R.; EDWARDS, D.L. A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects. **BioTechnology**, v.4, p.305-308, 1986.
- HÖFTE, M.; BOELEN, J.; VERSTRAETE, W. Seed protection and promotion of seedling emergence by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strains 7NSK2 and ANPIS. **Soil Biology and Biochemistry**, v.23, n.5, p.407-410, 1991.
- HOHNADÉL, D.; MAYER, J.M. Pyoverdine - facilitated onion uptake among fluorescent pseudomonas. In: SWINBURNE, T.R., ed. **Iron, siderophores and plant diseases**. New York: Plenum, 1986. 351p.
- HOWELL, C.R. Effect of *Gliocladium virens* on *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* and damping-off of cotton seedlings. **Phytopathology**, v.72, p.496-498, 1982.

- HOWELL, C.R.; STIPANOVIC, R.D. Control of *Rhizoctonia solani* in cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with antibiotic produced by the bacterium. **Phytopathology**, v.69, p.480-482, 1979.
- HSU, S.C.; LOCKWOOD, J.L. Powdered chitin as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. **Applied Microbiology**, v.29, p.422-426, 1975.
- HUANG, H.C. *Gliocladium catenulatum*: Hyperparasite of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium* species. **Canadian Journal of Botany**, v.56, p.2243-2246, 1978.
- HUANG, H.C. Control of *Sclerotinia* wilt of sunflower by hyperparasites. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.2, p.26-32, 1980.
- HUANG, H.C.; KOKKO, E.G. Ultrastructure of hyperparasitism of *Coniothyrium minitans* on sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 65, p. 2483, 2489, 1987.
- HUSSAIN, A.; VANCURA, V. Formation of biologically active substances by rhizosphere bacteria and their effect on plant growth. **Folia Microbiologica**, v.15, p.468-478, 1970.
- IMBRIANI, J.L.; MANKAU, R. Ultrastructure of the nematode pathogen *Bacillus penetrans*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.30, p.337-347, 1977.
- ITOH, Y.; KODAMA, K.; FURUYA, K.; TAKAHASHI, S.; HANEISHI, T.; TAKIGUCHI, Y.; ARAI, M. A new sesquiterpene antibiotic, heptelidic acid producing organisms, fermentation, isolation and characterisation. **Journal of Antibiotics**, v.33, p.468-473, 1980.
- JARVIS, W.R.; SLINGSBY, K. The control of powdery mildew of greenhouse cucumber by water sprays and *Ampelomyces quisqualis*. **Plant Disease Reporter**, v.61, p.726-730, 1977.
- JONES, D.; GORDON, A.H.; BACON, J.S.D. Co-operative action by endo-end-exo-b-(1→3)-glucanases from parasitic fungi in the degradation of cell-wall glucans of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biochemistry Journal**, v. 140, p. 47-55, 1974.
- JONES, D.; WATSON, D. Parasitism and lysis by soil fungi of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary a phytopathogenic fungus. **Nature**, v.224, p.287-288, 1969.
- KAMPERT, M.; STRZELCZYK, E. Effect of pH on production of cytokinin-like substances by bacteria isolated from soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestris* L.). **Acta Microbiologica Polonica**, v.33, p.77-85, 1984.
- KAMPERT, M.; STRZELCZYK, E.; POKOJSKA, A. Production of auxins by bacteria isolated from the roots of pine seedlings (*Pinus sylvestris* L.). **Acta Microbiologica Polonica**, v.7, p.135-143, 1975.
- KAUNAT, H. Bildung von indolderivaten durch rhizosphärenspezifisch Bakterien und Aktinomyzeten. **Zentralblatt für Bakteriologie Abteilung II**, v.133, p.501-514, 1969.
- KAWAMOTO, S.; LORBEER, J.W. Protection of onion seedling from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepe* by seed and soil infestation with *Pseudomonas cepacea*. **Plant Disease Reporter**, v.60, p.189-191, 1976.
- KILPATRICK, R.A. Seedling reaction of bailey, acts and wheat to *Pythium* species. **Plant Disease Reporter**, v.52, p.209-212, 1968.
- KIM, K.K. FRAVEL, D.R.; PAPAIVIZAS, G.C. Identification and characterization of a metabolite produced by *Talaromyces flavus* which mediates biocontrol of *Verticillium dahliae* (Abstr.). **Phytopathology**, St. Paul, v.77, p.172, 1987.
- KIM, K.K. FRAVEL, D.R.; PAPAIVIZAS, G.C. Identification of a metabolite produced by *Talaromyces flavus* as glucose oxidase and its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae*. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, p.488-492, 1988.
- KIM, K.K.; FRAVEL, D.R.; PAPAIVIZAS, G.C. A novel metabolite from the culture filtrate of *Talaromyces flavus* (abstract). **Proceedings American Society of Experimental Biology**, v.45, p.1796, 1986.
- KLEINKAUF, H.; VON DÖHREN, H. **Peptide Antibiotics**. In: MURRAY, M.Y., ed. **Comprehensive biotechnology: the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. Oxford: Pergamon Press, 1985, p.95-136.
- KLOEPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: BLAINE Jr METTING, F., ed. **Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management**. New York: Marcel Dekker, 1993, p.255-274.
- KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth – promoting rhizobacteria. **Nature**, v.286, p.885-886, 1980.
- KLOEPPER, J.W.; SCHER, F.M.; LALIBERTE, M.; TIPPING, B. Emergence-promoting rhizobacteria: description and implications for agriculture. In: SWINBURN, T.R., ed. **Siderophones and plant diseases**. New York: Plenum Press, 1986, p.155-164.
- KLOEPPER, J.W.; YOUNG, S.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. Descriptor of a coryneform plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) strain and its effects on plant development. In: KLEMENT, Z., ed. **Plant pathogenic bacteria**. Part A. Budapest: Akadémia Kiadó, 1990, p.613-618.
- KNUDSEN, G.R.; SPURR, H.W.Jr. Field persistence and efficacy of five bacterial preparations for control of peanut leaf spot. **Plant Disease**, v.71, p.442, 1987.
- KROPP, B.R.; THOMAS, E.; POUNDER, J.I.; ANDERSON, A.J. Increased emergence of spring wheat after inoculation with *Pseudomonas chlororaphis* isolate 2E3 under field and laboratory conditions. **Biology and Fertility of Soil**, v.23, p.200-206, 1996.
- LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.187-209, 1986.
- LIFSHITZ, R.; SIMONSON, C.; SHER, F.M.; KLOEPPER, J.W.; RODICK-SEMPLE, C.; ZALESKA, I. Effect of rhizobacteria on the severity of phytophthora root rot of soybean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.8, p.102-106, 1986.
- LIFSHITZ, R.; SNEH, B.; BAKER, R. Soil suppressiveness to a plant pathogenic *Pythium* species. **Phytopathology**, v.74, p.1054-1061, 1984.

- LIFSHTZ, R.; STANGHELINI, M.; BAKER, R. A new species of *Pythium* isolated from soil in Colorado. *Mycotaxon*, v.20, p.373-379, 1984.
- LINDOW, S.E. Integrated control and role of antibiosis in biological control of fire blight and frost injury. In: WINDELS, C.E.; LINDOW, S.E. **Biological control on the phytosphere**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1985. p.83-115.
- LOPES, C.A. Biological control of *Pseudomonas avenae* with epiphytic bacteria isolated from corn plants. Miami: University of Florida. 1986, 103p. Tese de Doutorado.
- LOPPER, J.E.; SUSLOW, T.V.; SCHROTH, M.N. Lognormal distribution of bacterial subpopulations in the rhizosphere. *Phytopathology*, v.74, p.1454-1460, 1984.
- LUTCHMEAH, R.S.; COOKE, R.C. Aspects of antagonism by the mycoparasitic *Pythium oligandrum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.83, p.696-700, 1984.
- LUZ, W.C. Microbiolização das sementes para o controle da podridão comum das raízes e dos patógenos e seu efeito no rendimento de trigo. *Fitopatologia Brasileira*, v.19, p.144-148, 1994.
- LYNCH, J.M.; WILSON, K.L.; OUSLEY, M.A.; WHIPPS, J.M. Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. **Letter in Applied Microbiology**, v.12, p.59-61, 1991.
- MACLAREN, D.L.; HUANG, H.C.; RIMMER. Hyperparasitism of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Talaromyces flavus*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Ontario, v.8, p.43-48, 1986.
- MADI, L.; HENIS. Parasitism of *Sclerotium rolfsii* by *Talaromyces flavus*. *Phytopathology*, St. Paul, v.79, p.1160, 1989.
- MAKKONEN, R.; POHJAKALLIO, O. On the parasites attacking the sclerotia of some fungi pathogenic to higher plants and on the resistance of those sclerotia to their parasites. *Acta Agriculturae Scandinavica*, v.10, p.105-126, 1960.
- MANKAU, R. *Bacillus penetrans* causing a virulent disease of plant-parasitic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.26, p.333-339, 1975.
- MANKAU, R.; PRASAD, N. Infectivity of *Bacillus penetrans* in plant parasitic-nematodes. *Journal of Nematology*, v.9, p.40-45, 1977.
- MAROIS, J.J.; FRAVEL, D.R. Effect on respiration of addition of fungal spores to soil. *Phytopathology*, v.73, p.967, 1983.
- MAROIS, J.J.; JOHNSTON, S.A.; DUNN, M.T.; PAPAIVIZAS, G.C. Biological control of *Verticillium* wilt of eggplant in the field. *Plant Disease*, Beltsville, v.66, p.1166, 1168, 1982.
- 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.
- MARTINS, M.P.; MELO, I.S. Efeito de *Trichoderma koningii* e *T. viride* na germinação e no desenvolvimento de beringela (*Solanum melongena* L.). *Summa Phytopathologica*, v.15, p.37, 1989 (Resumo)
- McKEEN, C.D.; REILLY, C.C.; PUSEY, P.L. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, v.76, p.136-139, 1986.
- MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. In: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p.415, 1996.
- 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 bean rhizosphere competence. *Mycological Research*, v.101, p.1389-1392, 1997.
- MELO, I.S.; LUCON, C.M.M. Efeito de rizobactérias na germinação de sementes e no crescimento de plantas de milho, em baixa temperatura. *Fitopatologia brasileira*, v.20, p.350, 1995.
- MELO, I.S.; VALARINI, P.J.; FAULL, J.L. Controle biológico de *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* por *Bacillus subtilis* isolado da rizosfera de feijoeiro. *Fitopatologia brasileira*, v.20 (suplemento), p.342, 1995.
- MELO, I.S.; VALARINI, P.J. Potencial de Rizobactérias no Controle de *Fusarium solani* em pepino. *Scientia Agrícola*, v.52, n.2, p.526-530, 1995.
- MENDGEN, K. Growth of *Verticillium lecanii* in pesticides of stripe rust (*Puccinia striiformis*). *Phytopathology Zeitschrift*, v.102, p.301-, 1981.
- MERLIER, A.M.O.; BOIRE, J.M.; PONS, J.B.; RENAUD, M.C. European patent application EP 124388. **Chemical Abstracts**, 183747r, 102, 1985, 1984.
- MERRIMAN, P.R.; PRICE, R.D.; KOLLMARGEN, J.F.; PIGGOT, T.; RIDGE, E.H. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. *Australian Journal of Agricultural Research*, v.25, p.219-226, 1974.
- MIZUNO, K.; YAGI, A.; TAKADA, M.; MATSUURA, K.; YAMAGUCHI, K.; ASANO, K. A new antibiotic, Talaron. *Journal of Antibiotics*, Tokyo, v.27, p.560-563, 1974.
- MANTOVANELLO, C.M.; MELO, I.S. Isolamento e seleção de rizobactérias antagonistas à podridão mole (*Erwinia carotovora*). In: **Simpósio de Controle Biológico**, 2., 1990. Brasília, DF. Anais, Brasília, DF, 1990, p.134.
- MOODY, A.R.; GINDRATT, D. Biological control of cucumber black root not by *Gliocladium roseum*. *Phytopathology*, v.67, p.1159-1162, 1977.
- MOORMAN, T.B. Adaptation of microorganisms in subsurface environments: significance to pesticide degradation. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R., eds. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: ACS, 1990. p.167-180 (ACS Symposium Series, 426).
- MORRIS, J.R.; BERKELEY, R.C.W.; LOGAN, N.A.; O'DONNELL, A.G. The genera *Bacillus* and *Sporolietobacillus*. In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRÜPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G. eds. **The Prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria**, (eds.), Berlin: Springer-Verlag, 1981. p.1711-1742.
- MUKHOPADHYA, D.; NANDI, B. Survival of *Macrophomina phaseolina* in presence of antagonistic organisms in jute rhizosphere. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, v.85, p.719, 1978.

- NAGTZAAM, M.P.M.; BOLLEN, G.J. Colonization of roots of eggplant and potato by *Talaromyces flavus* from coated seed. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.1499-1507, 1997.
- NEILANDS, J.B. Microbial iron compounds. **Annual Review of Biochemistry**, v.50, p.715-731, 1981.
- NEILANDS, J.B. Siderophores of bacteria and fungi. **Microbiological Science**, v.1, p.9-14, 1984.
- NEWHOOD, F.J. Microbiological control of *Botrytis cinerea* Pers. I. The role of pH changes and bacterial antagonists. **Annals of Applied Biology**, v.38, p.169-184, 1951.
- ODINTSOVA, O.V. Role of the hyperparasite *Cicinnobalus cesatii* de Bary, in Suppression of powdery mildew on apple trees. **Mikologia i Fitopatologia**, v.9, p.337-339, 1975.
- OKUDA, T.; FUJIWARA, A.; FUJIWARA, M. Correlation between species of *Trichoderma* and production patterns of isonitrile antibiotics. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.46, p.1811-1822, 1982.
- OSTOVAR, K.; KEENEY, P.G. Isolation and characterization of microorganisms involved in the fermentation of Trinidad's cacao beans. **Journal of Food Sciences**, v.38, p.611-617, 1973.
- PACHENARI, A.; DIX, N.J. Production of toxins and wall degrading enzyme by *Gliocladium roseum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.74, p.561-566, 1990.
- 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.; DUNN, M.T.; LEWIS, J.A.; BEAGLE-RISTANO, J. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, p.1171-1175, 1984.
- PAPAVIZAS, G.C.; FRAVEL, D.R.; LEWIS, J.A. Proliferation of *Talaromyces flavus* in soil and survival in alginate pellets. **Phytopathology**, St. Paul, v.77, p.131-136, 1987.
- PAULITZ, T.C.; BAKER, R. Control of *Pythium* damping-off of cucumber with *Pythium nunn*: influence of soil environmental and organic amendments. **Phytopathology**, v.77, p.341-346, 1987.
- PHILIPP, W.D.; CRÜGER, G. *Parasitismus* var. *Ampelomyces quisqualis* auf Echten Mehtanpulzen na Guerken und andiren Gemüsearten. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.86, p.129, 1979.
- PHILLIPS, A.J.L.; PRICE, K. Structural aspects of the parasitism of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de bary by *Coniothyrium minitans* Campb. **Phytopathology Zeitschrift**, v.107, p.193-203, 1983.
- PIECZARKA, D.J.; ABAW, G.S. Population and biology of *Pythium* spp. associated with snap bean roots and soils in New York. **Phytopathology**, v.68, p.409-416, 1978.
- PIMENTEL, D. **CRC Handbook of pest management in agriculture**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1991.
- POWELL, K.A.; JUTSUM, A.R.: Technical and commercial aspects of biocontrol products. **Pesticide Science**, v.37, p.315-321, 1993.
- PRIEST, F.G. DNA homology in the genus *Bacillus*. In: BERKELEY, R.C.W.; GOODFELLOW, M., ed. **The aerobic endospore-forming bacteria**: classification and identification. London: Academic Press, 1981. p.33-57.
- PRIEST, F.G. Isolation and identification of aerobic endospore-forming. In: HARWOOD, C.R., ed. *Bacillus*. New York: Plenum Press, 1989. p.27-56.
- PROSKSA, B.; ADAMCOVA, J.; FUSKA, J. 2-Methylsorbic acid, an antifungal metabolite of *Penicillium vermiculatum*. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v.37, p.443-445, 1992.
- PYKE, T.H.; DIETZ, A. U-21, 9263, a new antibiotic. I. Discovery and biological activity. **Applied Microbiology**, v.14, p.506-510, 1966.
- REZENDE, D.V.; FERREIRA, F.A. Mancha prateada de ipê (*Tabebuia* spp.) associada a fase anamórfica de *Uncinula* sp. (*Oidium* sp.) com hiperparasitismo de *Ampelomyces* sp. **Fitopatologia Brasileira**, v.13, n.2, p.150, 1988.
- RICHARD, J.L.; GROSELAND, C.; ALE-AGHA, N. Antagonism between *Eutypa ameriacea* and *Gliocladium roseum*. **Plant Disease Report**, v.58, p.983, 1974.
- RIDOUT, C.J.; COLEY-SMITH, J.R.; LYNCH, J.M. Enzyme activity and electrophoretic of extracellular protein induced in *Trichoderma* spp. by cell walls of *Rhizoctonia solani*. **Journal General Microbiology**, v.132, p.2345-2352, 1986.
- RISHBETH, J. Stump inoculation: a biological control of *Fomes annosus*. In: BRUEHL, G.W., ed. **Biology and control of soil pathogens**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1975. 158p.
- RISHBETH, J. Stump protection against *Fomes annosus* III Inoculation with *Peniophora gigantea*. **Annals of Applied Biology**, v.52, p.63, 1963.
- ROBERTS, D.P.; LUMSDEN, R.D. Effect of extracellular metabolites from *Gliocladium virens* on germination of sporangia and mycelial growth of *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, v.80, p.461-465, 1990.
- RODGERS, P.B. Potential of biological control organisms as a source of antifungal compounds for agrochemical and pharmaceutical product development. **Pesticide Science**, v.27, p.155-164, 1989.
- RODGERS, P.B. Potential of biopesticides in agriculture. **Pesticide Science**, v.39, p.117-129, 1993.
- RODRIGUES, F.; PFENDER, W. Antibiosis and antagonism of *Sclerotinia homoearpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 *in vitro* and in planta. **Phytopathology**, v.87, p.614-621, 1997.
- ROUATT, J.W.; LECHEVALIER, M.; WAKSMAN, S.A. Distribution of antagonistic properties among actinomycetes isolated from different soils. **Antibiotic Chemother**, v.1, p.185-192, 1951.
- ROVIRA, A.D. Manipulation of the rhizosphere microflora to increase plant production. In: LENG, R.A.; BAKER, J.S.F.; ADAMS, D.B.; HUTCHINSON, K.J., ed. **Biotechnology and recombinat DNA technology in the animal production industries**. Review in Rural Science, 6. Armdal: University of New England Publishing Unit, 1985. p.185-197. (Review in Rural Science, 6).



- SAITO, E.S.; MELO, I.S. Produção de metabólitos por um mutante de *Talaromyces flavus* e seus efeitos em fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Biologia**, v.57, n.2, p.257-260, 1997.
- SAITO, E.S.; MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L.; FAULL, J.L. Antagonistic properties of wild-type and mutants of *Talaromyces flavus* against *Vectillum dahliae*. **Phytoparasitica**, v.23, v.1, p.67-69, 1995. (Abstract).
- SCHROTH, M.; HANCOCK, J. Selected topics in biological control. **Annual Review of Microbiology**, v.35, p.453-476, 1981.
- SIMEONI, L.A.; LINDSAY, W.L.; BAKER, R. Critical iron levels associated with biological control of *Fusarium* wilt. **Phytopathology**, v.77, p.1057-1061, 1987.
- SIMON, A.; DUNLOP, R.W.; GHISALBERTI, E.L.; SVASITHAMPARAM, K. *Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties. **Soil Biology and Biochemistry**, v.20, p.263-264, 1988.
- SLEESMAN, J.P.; LEBEN, C. Microbial antagonist of *Bipolaris maydis*. **Phytopathology**, v.66, p.1212-1218, 1976.
- SMIT, E.; WOLTERS, A.C.; LEE, H.; TREVORS, J.T.; VAN ELSAS, J.D. Interactions between a genetically marked *Pseudomonas fluorescens* strain and bacteriophage phi R2f in soil: effects of nutrients, alginate encapsulation and the wheat rhizosphere. **Microbial Ecology**, v.31, p.125-140, 1996.
- SOMASEGARAM, P.; HOLLIDAY, J. Dilution of liquid *Rhizobium* cultures to increase production capacity of inoculant plants. **Applied Environmental Microbiology**, v.44, p.330-333, 1982.
- SPENCER, D.M. Parasitism of carnation rust (*Uromyces dianthi*) by *Vectillum lecanii*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.74, p.191-, 1980.
- SPENCER, D.M.; ATKEY, P.T. Parasitic effects of *Vectillum lecanii* on two rust fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v.77, p.535-, 1981.
- SPURR, H.W. Experiments on foliar disease control using bacterial antagonists. In: BLAKEMAN, J.P., ed. **Microbial ecology of the phylloplane**. London: Academic Press. 1981. p.369-381.
- SRIVASTAVA, A.K.; DEFAGO, G.; KERN, H. Hyperparasitism of *Puccinia horiana* and other microcyclic rusts. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.114, p.73-, 1985.
- STOLK, A.C.; SAMSON, R.A. **The genus *Talaromyces* and related genera**. II. Baaran: Central-Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, 1972. (Studies in Mycology, 2)
- STRZELCZYK, E.; POKOJSKA-BURDZIEJ, A. Production of auxins and gibberellin-like substances by mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes isolated from soil and the mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris* L.). **Plant and Soil**, v.81, p.185-194, 1984.
- SUNDHEIM, L. Control of cucumber powdery mildew by hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* and fungicides. **Plant Pathology**, v.31, p.209-214, 1982.
- SUNDHEIM, L.; AMUDSEN, T. Fungicide tolerance in the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* and integrated control of cucumber powdery mildew. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v.32, p.349-355, 1982.
- SUNDHEIM, L.; KREKLING, T. Host-parasite relationship of the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* and its powdery mildew host *Sphaerotheca fuliginea*. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.104, p.202, 1982.
- SUTTON, J.C. Biological control of strawberry diseases. **Advances in Strawberry Research**, v.13, p.1-12, 1994.
- SUTTON, J.C.; PENG, G. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. **Phytopathology**, v.83, p.615-621, 1993.
- SZTEJMBERG, A. A biological control of powdery mildews by *Ampelomyces quisqualis*. **Phytopathology**, v.69, p.1047, 1979.
- SZTEJNHERG, A.; GAPER, S.; MAZER, S.; LISKER, N. *Ampelomyces quisqualis* for biological and integrated control of powdery mildews in Israel. **Phytopathology**, v.124, p.285-295, 1989.
- TAMURA, A.; KOTANI, H.; NARUTO, S. Trichoviridin and dermadin from *Trichoderma* sp. TK 1. **Journal of Antibiotics**, v.28, p.161-162, 1975.
- THIRUMALACHAR, M.J.; O'VRIEN, M.J. Suppression of charcoal rot in potato with a bacterial antagonist. **Plant Disease Reporter**, v.61, p.543-546, 1977.
- TREVORS, J.T.; VAN ELSAS, J.D.; LEE, H.; VAN OVERBECK, L.S. Use of alginate and other carriers for encapsulation of microbial cells for use in soil. **Microbial Releases**, v.1, p.61-69, 1992.
- TREVORS, J.T.; VAN ELSAS, J.D.; LEE, H.; WOLTERS, A.C. Survival of alginate-encapsulated *Pseudomonas fluorescens* cells in soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.39, p.637-643, 1993.
- TU, J.C. *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v.70, p.670-674, 1980.
- TU, J.C. Mycoparasitism by *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum* and its effects on sclerotial germination. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.109, p.261-268, 1984.
- TU, J.C.; VARRTAJA, O. The effect of the hyperparasite (*Gliocladium virens*) on *Rhizoctonia solani* and on *Rhizoctonia* root rot of white beans. **Canadian Journal of Botany**, v.59, p.22-27, 1981.
- TURNER, G.J.; TRIBE, H.T. On *Coniothyrium minitans* and its parasitism of *Sclerotinia* species. **Transactions of British Mycological Society**, v.66, p.97-195, 1976.
- TURNER, J.T.; BACKMAN, P.A. Factors relating to peanut yield increases following *Bacillus subtilis* seed treatment. **Plant Disease**, v.75, p.347-353, 1991.
- VAN DER SPY, J.E.; MATTHEE, F.N.; CRAFTORD, D.J.A. Dangeard and *Penicillium brefeldianum* dodge in apple juice. **Phytophylactica**. Pretoria, v.7, p.105-108, 1975.
- VAN PEER, R.; VAN KUIK, A.J.; RATTINK, H.; SCHIPPERS, B. Control of *Fusarium* with in canation grown on rockwool by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r and by Fe-EDDHA. **The Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.96, p.119-132, 1990.

- VASUDEVA, R.S.; CHAKRAVARTHI, B.P. The antibiotic action of *Bacillus subtilis* in relation to certain parasitic fungi with special reference to *Alternaria solani*. **Annals Applied Biology**, v.41, p.612-618, 1954.
- VECKER, P.B.; AYERS, W.A.; ADAMS, P.B. A new hyphomycete on sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycotaxon**, v.7, p.275-282, 1978.
- VOISARD, C.; KELL, C.; HAAS, D.; DEFAGO, G. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. **EMBO Journal**, v.8, p.351-358, 1989.
- WALKER, J.A.; MANDE, R.B. Natural occurrence and growth of *Gliocladium roseum* on the mycelium and sclerotia of *Botrytis allii*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.65, p.335-338, 1975.
- WALKER, J.A.; MAUDE, R.B. Natural occurrence and growth of *Gliocladium roseum* on the mycelium and sclerotia of *Botrytis allii*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.65, n.2, p.335-337, 1975.
- WELLER, D.M.; COOK, R.J. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. **Phytopathology**, v.73, p.463-469, 1983.
- WELLS, H.D. *Trichoderma* as a biocontrol agent. In: MUKERJI, K.G.; GARG, K.L., ed. Biocontrol of plant diseases. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.211.
- WESTSTEIGN, E.A. Fluorescent *Pseudomonas* isolate E11.3 as biocontrol agent for *Pythium* root in tulips. **The Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.96, p.261-172, 1990.
- WILLIAMS, S.T.; LANNING, S.; WELLINGTON, E.M.H. Ecology of actinomycetes. In: GOODFELLOW, M.; MORDASKI, M.; WILLIAMS, S.T. ed. **The biology of the actinomycetes**. London: Academic Press, 1984. p.481-528.
- WILLIAMS, S.T.; VICKENS, J.C. Detection of actinomycetes in the natural environment – problems and perspectives. In: OKANI, Y.; BEPPER, T.; OGAWARA, H. ed. **Biology of the Actinomycetes'88**. Tokyo: Japan Scientific Society Press, 1988. p.265-270.
- WINDHAM, M.T.; ELAD, Y.; BAKER, R. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v.76, p.518-521, 1986.
- WOLTZ, S.S. Nonparasitic plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.16, p.403-430, 1978.
- WOOD, R.K.S. The control of diseases of lettuce by the use of antagonistic microorganisms. II. The control of *Rhizoctonia solani*. **Annals of Applied Biology**, v.38, p.217, 1951.
- YAMANO, T.; HEMMI, S.; YAMAMOTO, I.; TSUBAKI, K. Trichoviridin, a new antibiotic. Japanese Kokai 70 15435 (Chemical Abstracts 73, 65093). 1970.
- YARDWOOD, C.E. *Ampelomyces quisqualis* on clover mildew. **Phytopathology**, v.22, p.31, 1932.
- YUEN, G.; MEYER, J.M. Pyoverdine – facilitated iron competition and antibiosis in the inhibition of *Pythium ultimum* by *Pseudomonas fluorescens* Biovar IV. **Phytopathology**, v.77, p.1758, 1987 (Abstract).
- ZOGG, H.; JÄGGI, W. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.81, p.160-169, 1974.



# 2

## CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS-PRAGAS E SEU MELHORAMENTO GENÉTICO

**João Lúcio de Azevedo**

### INTRODUÇÃO

Os danos causados por insetos-pragas da agricultura, em plantas cultivadas, são enormes e de difícil avaliação, especialmente em regiões tropicais. Os insetos competem com os seres humanos e outros seres vivos na busca de alimentos, além de serem os responsáveis pela transmissão de doenças em plantas e animais, inclusive na espécie humana. Os insetos constituem o grupo mais numeroso dentre todos os seres vivos encontrados em nosso planeta, com uma estimativa de, no mínimo, seis milhões de espécies existentes. Embora muitas delas sejam úteis e até mesmo indispensáveis para a manutenção do equilíbrio biológico, outras causam severos prejuízos. O controle desses insetos é feito, especialmente a partir dos anos 40, pelo uso de inseticidas químicos, o que é, sem dúvida, eficiente em muitos casos. Entretanto, o uso em larga escala desses inseticidas químicos, realizado muitas vezes de uma maneira inapropriada, tem levado à emergência de resistência genética dos insetos a muitos deles, à semelhança do que ocorreu e tem ocorrido com relação à resistência bacteriana aos antibióticos e à resistência de fungos patogênicos a fungicidas. O uso de inseticidas leva fatalmente também a desequilíbrios biológicos causados pela destruição de outros insetos úteis, como os polinizadores e os controladores naturais de pragas. Devido a isso, a situação com respeito aos insetos-pragas da agricultura em geral é agravada em anos sub-

seqüentes ao uso desses produtos. Finalmente, produtos químicos são, em geral, tóxicos inclusive para os aplicadores dos mesmos, o que resulta em perda de vidas humanas. Com relação à emergência de resistência de insetos a inseticidas, o número de espécies onde resistência já foi constatada vem subindo constantemente. No final dos anos 70 era de cerca de 350 espécies, chegando atualmente a milhares de espécies. Em insetos que causam danos para a agricultura, resistência aos principais inseticidas utilizados já foi constatada em pragas de cereais, algodão, hortaliças e plantas frutíferas entre muitos outros vegetais úteis. No setor de saúde pública a situação também é altamente preocupante, pois resistência de anofelinos e outros vetores de doenças humanas aos inseticidas já foi verificada em praticamente todo o mundo. Isso vem resultando em um aumento de dezenas de vezes de casos de doenças transmitidas por insetos como malária, por exemplo. Com relação ao envenenamento e morte causados por agroquímicos no mundo, a Organização Mundial de Saúde vem divulgando números alarmantes, que envolvem até meio milhão de seres humanos, o que, em certos países, é número superior ao de óbitos causados por um conjunto de doenças como malária, tétano, poliomielite e difteria. As vítimas são geralmente trabalhadores rurais com pouca experiência na manipulação dos inseticidas e que não têm equipamentos e roupas de proteção ou que mesmo tendo à disposição essa proteção, não a utilizam, especialmente em países de clima tropical. Nesses países, como é o caso do Brasil, com condições climáticas distintas daquelas onde os produtos foram desenvolvidos, e com culturas extensivas abrangendo vastas áreas agriculturáveis, a situação fica ainda mais dramática. Muitas vezes os resultados não são tão favoráveis como os esperados e o processo torna-se inclusive antieconômico.

Apesar disso tudo, os produtos químicos são ainda a principal opção no combate à pragas agrícolas e vetores de doenças. A situação está, entretanto, tornando-se incontrolável, pois os problemas acima mencionados estão ficando mais graves. O desenvolvimento de um novo inseticida é cada vez mais dispendioso, o que faz aumentar o custo do insumo quando usado na agricultura, especialmente em grandes áreas cultivadas. Os produtos, para funcionar bem, têm sua toxicidade aumentada e com isso tornam-se mais perigosos para o pessoal encarregado da sua aplicação. Também animais e pessoas que ingerem esses produtos, seja através de alimentos contaminados, seja

indiretamente, sofrem as conseqüências do uso abusivo e indiscriminado de produtos químicos na agricultura. Mesmo as normas de proteção contra esses tipos de acidentes e os testes de segurança empregados tornam ainda mais elevado o custo de produção e de aplicação racional dos inseticidas.

Uma alternativa viável é o controle biológico de insetos, isto é, o envolvimento de outros seres vivos para controlar insetos-pragas. Esse controle pode ser feito de muitas maneiras e empregando diferentes espécies, inclusive outros insetos controladores de pragas agrícolas. Entretanto, é o controle microbiano que vai ser abordado no presente capítulo. O uso de microrganismos para o controle de insetos-pragas da agricultura não é novo e vem sendo empregado, principalmente após os anos 70, devido aos problemas advindos da utilização dos inseticidas químicos. Revisões sobre o assunto já existem em grande número, inclusive livros em português. Um livro altamente recomendado para os leitores que desejarem mais informações sobre o assunto é o de Alves (1986, 1998). Tendo em vista a literatura existente já disponível, o presente capítulo vai dar apenas uma rápida noção dos grupos de microrganismos empregados no controle biológico, para depois discutir as vantagens e desvantagens do ponto de vista ecológico e econômico do controle microbiológico. Finalmente serão abordadas algumas técnicas e estratégias empregadas no melhoramento genético dos microrganismos utilizados no controle biológico.

## **PRINCIPAIS MICRORGANISMOS EMPREGADOS NO CONTROLE DE INSETOS-PRAGAS DA AGRICULTURA**

Muitos microrganismos são utilizados no controle de pragas da agricultura destacando-se os vírus, bactérias e fungos. Um resumo dos mais utilizados vai ser apresentado em seguida salientando-se, como já mencionado, que mais detalhes podem ser encontradas em várias revisões sobre o assunto (Alves, 1986, 1992, 1998; Coutinho, 1996; Azevedo & Messias, 1985; Arantes & Azevedo, 1986; Lecuona, 1996).

### **Vírus**

Embora muitas viroses ocorram em insetos, é na família Baculoviridae que se concentram os mais importantes vírus empregados no

controle biológico. Esses vírus têm sido usados efetivamente há mais de 50 anos. É nessa família de vírus que estão aqueles que possuem corpos de inclusão visíveis ao microscópio ótico ou aqueles que são observáveis apenas por meio de microscópio eletrônico. Os vírus da poliedrose nuclear (NPV) ocorrem em ortópteros, neurópteros, coleópteros, himenópteros e lepidópteros, entre outros. Os vírus da granulose (GV) são específicos para lepidópteros e os da poliedrose citoplasmática (CPV) ocorrem também em lepidópteros, além de outros insetos.

Os vírus contaminam os insetos por via oral sendo ingeridos junto com órgãos e tecidos foliares, principalmente folhas e caules. Detalhes sobre os diferentes modos de aplicação, formulações mais apropriadas e outros aspectos do controle microbiológico de insetos por vírus podem ser encontrados em Alves (1986, 1998) e Lecuona (1996).

## Bactérias

Bactérias que produzem esporos e mesmo bactérias não-esporulantes podem causar doenças em insetos. As pertencentes ao gênero *Bacillus* são as mais importantes para o controle biológico, sendo o *Bacillus popilliae* utilizado desde a década de 30 no controle de coleópteros. Outras espécies do mesmo gênero produzem cristais protéicos que são tóxicos quando ingeridos por insetos. É o caso do *B. thuringiensis*, mais conhecido como Bt, largamente empregado contra certos dípteros, ortópteros, himenópteros e principalmente lepidópteros. Outras espécies como o *B. cereus* causam doenças em coleópteros, lepidópteros e himenópteros e o *B. sphaericus* é muito ativo contra mosquitos dos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles*. Outras bactérias, além das do gênero *Bacillus*, são patogênicas facultativas (*Serratia marcescens*) ou potenciais, como várias espécies dos gêneros *Pseudomonas* e *Proteus*.

As bactérias contaminam os insetos por via oral, multiplicam-se no interior dos mesmos, e no caso de certos *Bacillus* produzem protoxinas na forma de cristais. Os cristais atacados por proteases liberam toxinas que afetam os insetos com paralisia intestinal e suspensão da alimentação. Maiores detalhes sobre aplicação de bactérias no controle biológico podem ser encontradas nas mesmas referências já mencionadas para o caso dos vírus.

## Fungos

Os fungos são os microrganismos mais freqüentemente encontrados atacando insetos. Estima-se que os fungos sejam responsáveis por cerca de 80% das doenças de insetos (Coutinho, 1996). Um dos primeiros fungos entomopatogênicos descritos foi o *Cordyceps sinensis* em 1726, embora a patologia dos insetos por fungos só viesse a ser estudada com os trabalhos de Agostino Bassi que, aliás, foi o primeiro autor a demonstrar o ciclo patógeno-hospedeiro-patógeno, antes mesmo de Koch ter demonstrado seu postulado. No final do século passado, Metshnikov utilizou pela primeira vez o fungo *Metarhizium anisopliae* no controle biológico de pragas agrícolas. São conhecidas atualmente mais de 700 espécies de fungos que atacam insetos. Entretanto, é de se esperar que esse número seja ainda muito maior, considerando-se que insetos e fungos são os dois grupos mais numerosos entre os seres vivos. Uma lista de fungos que atacam insetos pode ser encontrada nos livros de Alves (1986, 1998) e Lecuona (1996). Dentre os mais usados salientam-se os gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Verticillium*, *Nomuraea*, *Hirsutella*, *Entomophthora* e *Asckersonia*.

O processo de infecção do inseto pelos fungos é mais bem estudado em certas espécies como o *M. anisopliae* e tem início pelo contato dos esporos, os conídios, do fungo com a cutícula do inseto. Os esporos aderem à cutícula, germinam e produzem filamentos, o micélio, cujos segmentos ou hifas produzem estruturas diferenciadas, os apressórios, que possuem a capacidade de penetração na cutícula do inseto tanto mecanicamente como produzindo enzimas que auxiliam a penetração. A cutícula do inseto tem duas camadas, a epicutícula e a procutícula, seguindo-se a epiderme e a hemolinfa. A epicutícula contém lipídeos e proteínas mas não possui quitina que fica na forma fibrilar embebida em proteína junto com lipídeos e quinonas. Uma vez atravessando a procutícula, o fungo atinge a epiderme e a hemolinfa, produzindo blastósporos. Para maiores detalhes recomenda-se a revisão de Clarkson & Charnley (1996). No interior dos insetos, os fungos produzem toxinas como as destruxinas, no caso de *M. anisopliae*, e colonizam todo o hospedeiro. O inseto é então morto e no seu exterior desenvolvem-se os esporos ou conídios que liberados, são disseminados pelo vento, água ou contato com outros insetos. Fungos como o *M. anisopliae* atacam mais de 300 espécies de insetos.

Como no caso de bactérias e vírus, há excelentes revisões sobre o emprego de fungos no controle biológico, incluindo as formas de aplicação, as formulações mais usuais e os processos de conservação e estocagem de fungos entomopatogênicos. Em especial recomendam-se os recentes livros de Alves (1998) e Lecuona (1996).

## **EXEMPLOS DE EMPREGO DE MICRORGANISMOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS PRINCIPALMENTE NO BRASIL**

O controle microbiano de insetos vem sendo empregado desde a Antiguidade — embora de maneira empírica — pois os microrganismos só vieram a ser descritos há três séculos. Entretanto, a partir do final do século passado e no atual, existem vários exemplos de emprego de microrganismos no controle biológico de insetos. Na década de 40, com a entrada dos compostos químicos no mercado, o uso do controle microbiano diminuiu para ressurgir no final dos anos 50 e início da década de 60, devido ao aparecimento de problemas pelo uso de agroquímicos, especialmente o da resistência dos insetos aos inseticidas mais usados. A partir daí, há uma tendência de constante aumento do uso do controle microbiano de insetos, devido às pressões cada vez maiores visando uma proteção do ambiente contra produtos químicos que poluem e causam desequilíbrios ecológicos. Recentemente, nos EUA, constatou-se que resíduos de 17 diferentes inseticidas foram encontrados em águas superficiais e subterrâneas de 23 estados americanos. O National Research Council dos EUA acredita que cerca de 80% dos casos de câncer dietário provém de 10 inseticidas químicos encontrados freqüentemente em alimentos. Os gastos com produtos químicos no controle de doenças e pragas agrícolas em todo o mundo são estimados em quase 6 bilhões de dólares, dos quais 2 bilhões nos Estados Unidos. Por outro lado, só o estado da Flórida perde por ano 2 bilhões e meio de dólares por perda de alimentos e compra de insumos para combate a pragas e doenças, o que significa que patógenos, pragas e plantas daninhas custam para cada habitante da Flórida cerca de 250 dólares por ano. O retorno, é verdade, é de cerca de 3 a 5 dólares para cada dólar gasto na compra de agentes químicos. No entanto, estima-se que o

retorno pelo uso do controle biológico possa chegar a 25 dólares por dólar gasto em um período de 5 anos, e chegar a 30 dólares/dólar gasto após um período de 10 anos. Só com insetos, as perdas mais gastos com inseticidas por ano na Flórida são da ordem de 1,3 bilhões de dólares, ou seja, mais da metade do total, considerando-se também fungicidas e herbicidas (Meeker, 1987). Exemplos no Brasil mostram que no Nordeste as cigarrinhas-da-cana-de-açúcar causam severos prejuízos. Só a *Mahanarva posticata*, a mais importante das cigarrinhas da região, causa 11% de perdas agrícolas e 15% de perdas no rendimento industrial (Alves & Lecuona, 1996). Não obstante, esses dados e cifras assustadoras tanto em termos econômicos como de impactos negativos no ambiente, estima-se que do total de gastos com produtos químicos na agricultura apenas 2% representam gastos com produtos de controle biológico, e desses 2% quase quatro quintos são de produtos à base de um único microrganismo, o *Bacillus thuringiensis*. Há, entretanto, uma tendência de aumento do uso do controle biológico não apenas isolado, mas em associação com o controle químico e outras práticas agrícolas, com redução da quantidade do agente químico empregado. Esse manejo integrado de pragas agrícolas é bem discutido no livro de Crocomo (1990).

Exemplos de programas bem sucedidos de controle biológico microbiano de pragas agrícolas podem ser mencionados. Os países que mais têm empregado o sistema são Brasil, China e Rússia, todos com vastas áreas agriculturáveis e com problemas econômicos que limitam o uso extensivo de agroquímicos. Há, porém, exemplos também provenientes de países do primeiro mundo, como EUA e Europa Ocidental, onde as pressões de ordem ecológica estão cada vez mais fortes contra o uso em larga escala de produtos químicos. Talvez o caso de maior sucesso registrado no mundo venha ocorrendo no Brasil, pelo uso do *Baculovirus anticarsia*, um vírus da poliedrose nuclear (NPV) no controle da lagarta-da-soja, a *Anticarsia gemmatalis*. São tratados anualmente 500.000 ha da cultura da soja com o vírus. No período 1989/90 chegou-se ao emprego do vírus em cerca de 1 milhão de ha, com economia de mais de 50 milhões de reais. O Centro Nacional de Pesquisa da Soja da EMBRAPA, em Londrina, no estado do Paraná, já transferiu a tecnologia lá desenvolvida para algumas empresas privadas (Flores, Sá & Moraes, 1992). Além das vantagens óbvias em termos econômicos e ecológicos, a produção do *Baculovirus* pode

ser feita pelos próprios agricultores a partir de lagartas mortas pelo vírus que são trituradas e depois pulverizadas na plantação. O procedimento vem obtendo sucesso, e além dos benefícios com relação a custo, eficiência e proteção do ambiente, fornece ainda trabalho à mão-de-obra não-qualificada que é empregada na coleta de larvas mortas, formulação e aplicação do produto que, saliente-se, não causa qualquer dano ao aplicador.

Outro vírus, o *Baculovirus erinnyis*, um vírus da granulose (GV) é usado desde 1985 em lavouras de mandioca no controle do mandorová da mandioca (*Erinnyis ello*) tanto na Bahia (cerca de 800 ha) como no Paraná (Pecoraro & Schmitt, 1992). Outro vírus da poliedrose nuclear é usado no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho (*Spodoptera frugiperda*) e foi desenvolvido pelo Centro de Milho e Sorgo da EMBRAPA em Minas Gerais. Essa praga reduz a produtividade em cerca de 20%, em média, com danos que podem chegar a 34%. Só para exemplificar, na safra de 1990/91, quando foram produzidos 23 milhões de toneladas de milho no Brasil, se fosse feito o controle de 100% dos danos causados pela lagarta-do-milho, a produção teria se elevado para 27 milhões de toneladas, com pouco custo adicional e sem danificar o ambiente. Há problemas com o tempo de atuação do vírus na lagarta, que pode ser muito longo, não impedindo danos. Entretanto, logo no início da infecção pelo vírus a lagarta já começa a diminuir sua taxa de ingestão (Valicente & Cruz, 1992). Além do Brasil, produção em escala piloto de vírus contra *Spodoptera litoralis* está sendo feita no Egito, Tailândia e Quênia (National Research Institute, 1992).

Com relação a bactérias, o uso do Bt no Brasil cobre uma área de 150.000 ha (Alves, 1990) e vários produtos comerciais têm sido utilizados. Também no controle de mosquitos a EMBRAPA vem desenvolvendo trabalhos com *B. thuringiensis* var. *israelensis* para *Aedes* e *Simulidae* (borrachudos) e *B. sphaericus* no controle de *Culex* e *Anopheles*. Também prefeituras municipais em associação com laboratórios de universidades e institutos de pesquisa têm produzido material biológico para controle de *Aedes aegypti*, transmissor da dengue. Outros países, tanto na África como na Ásia, usam em escala de experimentos em campo o Bt no combate a *Helicoverpa armigera* (National Research Institute, 1992)

Entre os fungos controladores de insetos, os exemplos são numerosos. O *M. anisopliae* era utilizado no Brasil, em cerca de 200.000 ha/

ano no início da década atual, principalmente no controle de cigarrinhas-da-cana-de-açúcar e das-pastagens. O programa mais conhecido de controle biológico com fungos no Brasil e possivelmente em todo o mundo foi e continua a ser o do controle da cigarrinha-da-cana-de-açúcar no Nordeste brasileiro pelo uso de *M. anisopliae*. Os primeiros resultados positivos foram obtidos em 1965, e dez anos mais tarde foram iniciadas instalações de laboratórios regionais (Marques *et al.*, 1981). Também em cigarrinhas-das-pastagens o *M. anisopliae* é empregado com estimativas de controle variando de 10 a 60% (Fontes, 1992), o que é razoável, considerando-se que as cigarrinhas-das-pastagens como *Zulia* e *Deois* produzem grandes prejuízos. De fato, as cigarrinhas-das-pastagens podem causar até 50% de queda na produção de leite e carne em rebanhos bovinos.

Uma interessante tabela apresentada por Alves (1990) mostra, dentre os 85 gêneros de fungos entomopatogênicos já descritos no Brasil, os mais utilizados e o nível de avanço nessa utilização (Tabela 1).

Outros exemplos de controle biológico de insetos por fungos são:

1. Uso de *Beauveria bassiana* e *B. amorpha* no controle da praga *Cosmopolites sordidus* que causa até 50% de queda de produção de bananas no Brasil, além de favorecer a entrada de patógenos. O controle com o fungo parece ser bastante eficiente (Batista Filho *et al.*, 1992).
2. Uso de *B. bassiana* e *M. anisopliae* contra termitas usando-se 3-6 g de conídios/termiteiro (Fernandes & Alves, 1991) podendo ser obtido 100% de eficiência, decorridos 3 meses da aplicação.
3. Uso de *B. bassiana* contra o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) pelo Centro Nacional de Pesquisa do Algodão da EMBRAPA (Miranda, 1992).
4. Uso de *M. anisopliae* no controle do percevejo-do-colmo-do-arroz (*Tibraca loubartiventris*) com redução de até 90% da população dos percevejos 20 dias após a aplicação.
5. Uso de *B. bassiana* nos EUA contra pragas do algodoeiro. Os dados experimentais demonstram uma produção de 851 libras/acre com uso do fungo, 915 com inseticidas, 996 associando fungo e inseticidas e apenas 167 libras/acre no controle sem inseticida ou fungo (USDA, 1994).

6. Muitos outros exemplos podem ser citados, especialmente empregando-se *B. bassiana* e *M. anisopliae* contra gorgulho-do-arroz, formigas, gorgulho-da-cana-de-açúcar, pragas de citrus, seringueira, café etc. Para maiores detalhes recomenda-se a leitura da revisão de Alves & Lecuona (1996).

TABELA 1. Fungos mais utilizados no Brasil em estudos básicos ou aplicados no controle biológico e nível de avanço desses estudos (segundo Alves, 1990).

Fungo	Utilização em	Nível*
<i>Aschersonia alegroides</i>	citrus	1
<i>Beauveria bassiana</i>	café, cana, banana, outros	3
<i>B. brongniartii</i>	cana-de-açúcar	3
<i>Conidiobolus obscurus</i>	trigo	0
<i>Culicinomyces clavisporus</i>	pernilongos (mangues)	0
<i>Entomophthora muscae</i>	estábulo, galinheiros	1
<i>Zoophtum radicans</i>	caupí	2
<i>Hirsutella thompsoni</i>	citrus	2
<i>Langenidium giganteum</i>	pernilongos	0
<i>Metarhizium anisopliae</i>	cana-de-açúcar, pastos, outros	4
<i>Nomuraea rileyi</i>	soja	2
<i>Paecilomyces farinosus</i>	cana-de-açúcar, caupi, outros	2
<i>Verticillium lecanii</i>	café, citrus	2

\*0 – incipiente; 1 – estudos de laboratório e pequenos experimentos; 2 – ensaios de campo e pequena produção em laboratório; 3 – ensaios de campo e produção elevada; 4 – produto comprovadamente eficiente e comercializado.

Um levantamento sobre a força de trabalho no Brasil atuando no controle biológico foi feito recentemente (Dias *et al.*, 1994). Os autores salientam a implantação de 10 programas de controle biológico, tornando o Brasil líder mundial na área. Por meio de um questionário foram identificados 127 laboratórios envolvidos no Brasil com controle biológico, onde trabalham 1280 pessoas, incluindo pesquisadores, técnicos, alunos e estagiários. A maioria dos trabalhos está concentrada em grupos de entomologistas, mas há 35% das linhas mencionadas envolvendo fungos, seguindo-se bactérias e vírus. De fato, estamos fazendo na presente revisão, uma comparação entre os trabalhos apresentados nos principais congressos envolvendo controle microbiano de insetos no Brasil. Esses dados revelam a estabilização do número

de resumos apresentados nos últimos anos com maior ênfase em fungos e bactérias, seguindo-se os vírus. Dos fungos, *B. bassiana* é o mais utilizado, seguindo-se *M. anisopliae*. Das bactérias salienta-se o *B. thuringiensis*, seguindo-se *B. sphaericus*. Dos vírus, destaca-se o da poliedrose nuclear contra a lagarta-da-soja (Tabela 2).

TABELA 2. Número de comunicações apresentadas em 3 congressos brasileiros envolvendo controle biológico, classificados de acordo com o microrganismo usado (porcentagem, entre parênteses, após o número de trabalhos).

Microrganismo	Congressos			
	A	B	C	Soma
<b>Fungos</b>				
<i>Metarhizium anisopliae</i>	13(27,1)	17(25,8)	7(25,0)	37(26,1)
<i>Beauveria bassiana</i>	22(45,8)	30(45,4)	11(39,3)	63(44,4)
Outros	13(27,1)	19(28,8)	10(35,7)	42(29,6)
<b>Total</b>	<b>48(40,3)</b>	<b>66(50,4)</b>	<b>28(50,9)</b>	<b>142(46,6)</b>
<b>Bactérias</b>				
<i>Bacillus thuringiensis</i>	40(80,0)	30(71,4)	16(80,0)	86(76,8)
<i>Bacillus sphaericus</i>	10(20,0)	12(28,6)	4(20,0)	26(23,2)
<b>Total</b>	<b>50(42,0)</b>	<b>42(32,1)</b>	<b>20(36,3)</b>	<b>112(36,7)</b>
<b>Vírus</b>				
NPV	21(100,0)	22(96,5)	7(100,0)	50(98,0)
Outros	0(0,00)	1(4,4)	0(0,0)	1(2,00)
<b>Total</b>	<b>21(17,7)</b>	<b>23(17,6)</b>	<b>7(12,7)</b>	<b>51(16,7)</b>
<b>Total Geral</b>	<b>119</b>	<b>131</b>	<b>55</b>	<b>305</b>

A – SICONBIOL 1994; B – SICONBIOL 1996; C – Congresso Brasileiro de Entomologia 1997

## MELHORAMENTO GENÉTICO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS

Os microrganismos têm sido muito utilizados na produção de antibióticos, enzimas, vitaminas e aminoácidos, entre outros. Têm sido também utilizados em processos de fixação biológica do nitrogênio, degradação de poluentes e no controle biológico de pragas e patógenos. Assim, da mesma maneira que plantas e animais superiores são melhorados geneticamente, também os microrganismos de interesse eco-

nômico têm sido submetidos a processos de melhoramento genético visando a obtenção de linhagens mais apropriadas para as finalidades a que eles se destinam. Microrganismos usados no controle de insetos-pragas podem então ser submetidos ao melhoramento genético. Evidentemente, não existe uma fórmula geral de melhoramento genético. Cada microrganismo tem suas características e usos próprios, e assim, cada caso é um caso com peculiaridades próprias. Entretanto, existem certas regras gerais que são sempre válidas e que podem ser utilizadas em um programa de melhoramento genético de microrganismos usados no controle biológico. A primeira regra, em geral olvidada nestas últimas duas décadas, quando novas e poderosas tecnologias de melhoramento genético foram introduzidas, é de que, sempre que possível, deve-se empregar em primeiro lugar, processos mais simples e naturais, e depois de esgotá-los, aí sim, partir para os mais sofisticados e mais dispendiosos. Embora esses últimos possam também originar linhagens de valor, eles muitas vezes são de difícil adaptação em um ambiente competitivo, como é o caso do meio de atuação de microrganismos usados no biocontrole. Nesse caso, o microrganismo tem que ser altamente competitivo, diferentemente do que ocorre em outros processos, como nas fermentações industriais bem controladas, onde um único microrganismo geneticamente modificado é introduzido em fermentadores, sem outros microrganismos e em condições ideais de cultivo. É por isso que no biocontrole por microrganismos, muitas vezes processos de melhoramento mais simples tendem a ser mais eficientes, embora, como será visto, também as modernas tecnologias encontrem o seu lugar e tenham sido utilizadas com potencial ou comprovado sucesso.

No melhoramento genético, o melhorista sempre utiliza a variabilidade genética existente na espécie a ser melhorada. Sem ela não existe, obviamente, a possibilidade de se conseguir linhagens que sejam superiores à já existente. A variabilidade é o fruto das mutações, ou seja, de modificações permanentes no material genético dos seres vivos e que são transmitidas de ascendentes para descendentes. Além da mutação, a recombinação é outro mecanismo que amplia a variabilidade. Assim, seleção de formas já existentes na natureza, indução de mutações e processos de recombinação, sejam eles naturais ou artificiais são métodos de melhoramento que, usados individualmente ou em conjunto, levam à obtenção de linhagens microbianas melhoradas

geneticamente. O que será assunto neste capítulo é apenas um esboço da filosofia do melhoramento genético. Mais detalhes podem ser encontrados em outros dois capítulos deste volume, o de Paccola-Meirelles (1998) e o de Valadares-Inglis *et al.* (1998).

## Seleção

É muito comum pensar que um único ou um pequeno número de isolados de um mesmo microrganismo representa um padrão da espécie. Este é um engano que, se não for corrigido no início, pode levar a um programa de melhoramento pouco eficiente. Como exemplo, a linhagem original de *Penicillium chrysogenum* isolada por Fleming produzia menos de 2 µg de penicilina por mililitro de meio de cultura. Se um programa de melhoramento fosse iniciado com esse isolado sem que fossem procurados antes outros isolados da mesma espécie na natureza, alta produção de penicilina seria conseguida com muito mais dificuldade. De fato, uma busca de outras linhagens explorando a variabilidade existente na natureza resultou na obtenção de uma linhagem encontrada em um melão nos Estados Unidos, que já dava um aumento de produção cerca de 100 vezes maior que a linhagem original isolada por Fleming. Da mesma forma, em organismos entomopatogênicos, o primeiro microrganismo isolado atacando um inseto-praga não é necessariamente o melhor. Uma busca de muitos outros tem que ser realizada e, quase com certeza, isolados mais apropriados que o primeiro obtido vão ser encontrados. É essa uma busca aproveitando a variabilidade natural já existente, selecionando-se entre centenas ou milhares de isolados, os mais apropriados. O processo tem sido empregado com muitos microrganismos de valor biotecnológico, incluindo-se os de interesse no controle biológico. Um exemplo da variabilidade encontrada para diversas características pode ser observado na Tabela 3, para diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. É claro que nem sempre todas as qualidades que se desejam são encontradas em um mesmo isolado. É necessário, assim, ir-se montando um banco de germoplasma de uma ou mais espécies. Esse banco será muito útil nas próximas etapas do melhoramento genético, como será visto mais adiante. A manutenção de um banco de germoplasma exige que sejam estudados e conhecidos os modos de preservação de cada espécie que faz parte do banco.

TABELA 3. Variabilidade para diferentes características em 4 linhagens de *Metarhizium anisopliae* (Segundo Azevedo *et al.*, 1986, modificado).

Linhagens	Características*											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A 4	++	21,5	3,1	44	114	19	0,7	0,7	0,5	0,8	4	6
C	+	14,0	2,8	11	18	9	1,0	0,7	0,7	0,6	5	12
E 9	+++	12,0	2,8	183	253	30	0,7	0,7	0,7	0,8	5	30
K	++	11,5	2,8	1	7	5	1,0	0,8	0,8	0,5	4	3

1 - eficiência em atacar insetos (+ = baixa; ++ = média; +++ = alta).

2 - volume médio do conídio em m<sup>3</sup>.

3 - crescimento da colônia em meio de cultura (diâmetro em cm).

4 até 6 - produção de conídios x 10 em: 4 - ausência de luz; 5 - luz azul; 6 - luz amarela.

7 a 10 - produção de enzimas medida em placas pelo diâmetro de colônias/diâmetro do halo de degradação.

7 - amilases; 8 - lipases; 9 - quitinases; 10 - proteases.

11 - número de bandas em eletroforese isoenzimática (esterases).

12 - porcentagem de sobrevivência para a mesma dose de luz ultravioleta.

Também é importante, além de verificar e conservar a variabilidade já existente, ver se ela se mantém, ou seja, se é estável e se transmite aos descendentes. Um exemplo de estudo desse tipo pode ser encontrado em *M. anisopliae* para atividade proteolítica encontrada pela capacidade de degradar caseína e elastina por filtrados de cultura dos isolados. Constatou-se no caso uma alta herdabilidade para a característica estudada, indicando que ganhos substanciais podem ser conseguidos por seleção e reprodução clonal (Braga *et al.*, 1994).

Uma maneira de se fazer o isolamento para explorar a variabilidade natural no caso de microrganismos entomopatogênicos é coletar insetos atacados de diferentes regiões, e mesmo a partir de insetos não-alvos. Assim, eles podem atacar insetos de outras regiões às vezes com maior eficiência. É claro que se eles já existem em regiões onde o inseto está causando danos, as linhagens lá existentes não são tão eficientes, pois não estão conseguindo debelar a praga. Um exemplo interessante é o do fungo *Entomophaga maimaga*, um patógeno do lepidóptero *Lymantria dispar*, que isolado no Japão, foi introduzido nos Estados Unidos por volta de 1910. Em 1989 esse fungo iniciou uma epizootia, e no ano seguinte já atacava larvas de insetos-pragas de 10 estados norte-americanos. A partir daí tem sido introduzido, com sucesso, em outras áreas (Hajek *et al.*, 1990).

## Mutação

Uma vez explorada e praticamente esgotada a variabilidade natural, e isoladas e conservadas as linhagens mais apropriadas, pode-se pensar em um processo para aumentar a variabilidade por meio de mutações induzidas. Vários são os agentes mutagênicos que têm sido empregados para induzir mutantes tais como a luz ultravioleta, os raios gama, agentes químicos como a nitrosoguanidina, o ácido nitroso, os análogos de bases nitrogenadas e muitos outros (para revisão, ver Azevedo, 1985, 1998). Pela facilidade de ser encontrada em laboratórios, eficiência, simplicidade e segurança no uso, a luz ultravioleta é recomendada para indução de mutações. Assim, se for necessário obter um fungo entomopatogênico resistente a um fungicida como o benomil, por exemplo, a irradiação com doses apropriadas de luz ultravioleta e semeadura dos conídios irradiados em meio com o fungicida, aumenta e facilita a obtenção dos mutantes requeridos. Também o mesmo procedimento pode ser usado para se obter bactérias resistentes a antibióticos, onde a irradiação de células e semeadura em meio com o agente seletivo, no caso um antibiótico, vai, com certeza, resultar no crescimento de mutantes resistentes. A grande maioria dos mutantes para diferentes características como coloração, resistência e auxotrofia em *M. anisopliae* que permitiram a detecção do ciclo parassexual e outras particularidades genéticas da espécie, foram conseguidas com indução de mutantes com luz ultravioleta (Messias & Azevedo, 1980; Azevedo *et al.*, 1986; Kava-Cordeiro *et al.*, 1995). Já em *Beauveria bassiana* a luz ultravioleta não foi apropriada, sendo substituída pelos raios gama como indutores de mutação (Paccola-Meirelles & Azevedo, 1991). A nitrosoguanidina é também um excelente mutagênico, mas possui alguns defeitos como ser extremamente tóxico e, portanto, perigoso para se manipular e ser tão potente que, além da mutação que se quer, podem ser introduzidas outras indesejáveis (Heale *et al.*, 1989).

É interessante que, algumas vezes, perca-se tempo com técnicas sofisticadas para se obter um resultado que seria facilmente obtido por mutação espontânea ou induzida. Goettel *et al.* (1989), por exemplo, para obter linhagens de *M. anisopliae* resistentes ao fungicida benomil, introduziram por transformação o gene de benomil retirado de outro fungo, o *Aspergillus nidulans*. Muito mais apropriado seria isolar mutantes diretamente do próprio fungo, ou espontaneamente, ou por

indução com agentes mutagênicos, como já havia sido feito com facilidade para o mesmo *M. anisopliae* (Santos & Azevedo, 1982).

Atualmente, as técnicas de obtenção de mutantes foram enriquecidas pela “mutação sítio-dirigida”. Nesse caso, o gene que se deseja modificar é sintetizado ou isolado de um microrganismo e nele introduzidas, *in vitro*, as modificações dos nucleotídios que necessitam ser trocados para codificar a cadeia polipeptídica que se deseja. A introdução desse gene modificado, substituindo-se o original, vai produzir um microrganismo mutado de acordo com o que se quer. Este processo transforma um processo empírico de obtenção de mutantes em outro muito mais racional e dirigido. Infelizmente o processo é trabalhoso e requer que o gene a ser modificado seja conhecido, isolado ou sintetizado, manipulado e retornado com sucesso ao hospedeiro que se quer modificar, o que ainda nem sempre é possível. Para mais detalhes sobre a técnica, recomenda-se o livro de Primrose (1987).

## RECOMBINAÇÃO: CICLO SEXUAL E PARASSEXUALIDADE

### Recombinação Sexual

A existência de linhagens coletadas da natureza e conservadas em um banco de germoplasma, além de mutantes obtidos espontaneamente ou induzidos, constitui um valioso material que pode ser usado para combinar características favoráveis encontradas em diferentes linhagens, em uma única. Para que isso seja possível, torna-se necessária a existência de um sistema de recombinação. Em microrganismos, processos sexuais são encontrados tanto em bactérias (conjugação) como em fungos (ciclo sexual). Esses processos existem em alguns microrganismos entomopatogênicos. As características dos processos sexuais em fungos e bactérias podem ser encontradas em várias revisões, inclusive em português (Azevedo, 1985, 1987, 1998). Infelizmente, entretanto, é apenas uma minoria de fungos usados no controle biológico que possui o ciclo sexual. Nesses casos, processos parassexuais têm que ser utilizados.

### Processos Parassexuais

Alternativas do sexo, como transformação e transdução, ocorrem em bactérias. Também os fungos possuem uma alternativa do sexo, o ciclo parassexual, e esse ciclo é de grande utilidade no melhoramento

dos chamados deuteromicetos ou fungos imperfeitos. As mesmas revisões citadas acima na recombinação sexual podem também ser consultadas para se ter maiores detalhes destas alternativas do sexo em microrganismos. Assim, a descoberta do ciclo parassexual em *M. anisopliae* foi feita no Brasil por Messias (1979) e Messias & Azevedo (1980), bem como em *B. bassiana* por Paccola-Meirelles & Azevedo (1991, 1994). Isto tem permitido a obtenção de recombinantes com utilidade no controle biológico para essas espécies. Entretanto, podem haver dificuldades quando se pretende combinar duas características desejáveis em um mesmo fungo, como por exemplo, perda de patogenicidade devido ao rompimento de agregados gênicos importantes (Heale *et al.*, 1989). Essa perda de patogenicidade pode, entretanto, ser recuperada por novos ciclos de recombinação e seleção.

Uma importante característica descrita tanto em *M. anisopliae* como em *B. bassiana* é de que diplóides, típicos do ciclo parassexual, não são encontrados, embora conídios recombinantes ocorram em heterocários. O fenômeno já havia sido constatado em outros fungos como o *Aspergillus niger* e recebeu o nome de parameiose (Bonatelli Jr. *et al.*, 1983). Em *M. anisopliae* a parameiose é detectada tanto *in vitro* (Azevedo, 1985; Bagalhi *et al.*, 1991) como no interior dos insetos, quando linhagens auxotróficas liberam conídios prototróficos (Heale *et al.*, 1989). Foi também constatado que heterocários entre linhagens de *M. anisopliae* resultaram em conídios recombinantes com maior eficiência de atacar insetos (Bagalhi, 1986).

Outro processo que permite recombinação tanto em fungos como em bactérias entomopatogênicas é o da transformação. Nesse caso, o DNA extraído de uma linhagem pode ser introduzido em outra, levando uma ou mais características genéticas que são então introduzidas na segunda linhagem. Exemplos de transformação em *M. anisopliae* são encontrados em vários trabalhos como os de Goettel *et al.* (1989) e especialmente em Bogo *et al.* (1996b), que ensaiaram vários processos de transformação na introdução do gene para resistência ao benomil, concluindo que a transformação por biolística é a mais eficiente, produzindo de 32 até 201 transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA e obtendo até 90% de estabilidade do gene introduzido nos recombinantes. Mais recentemente, Bogo *et al.* (1996a) detectaram vírus de RNA em linhagens patogênicas de *M. anisopliae*. Isto pode abrir alguma possibilidade de transferência de características genéticas via micovírus.

## FUSÃO DE PROTOPLASTOS

Entre os vários processos de recombinação descritos em microrganismos nos anos 70, um deles foi o da fusão de protoplastos. Embora protoplastos, isto é, células desprovidas de parede celular sejam conhecidas há mais tempo, sua regeneração e fusão em larga escala só foi conseguida após o uso de uma droga fusogênica, o polietilenoglicol ou PEG. Atualmente é fácil produzir e fundir protoplastos pelo uso de PEG ou de eletrofusão. Entre as revisões sobre fusão de protoplastos e sua utilização no melhoramento genético podem ser citadas as de Peberdy & Ferenczy (1985) ou em português a de Azevedo (1998). Foi usando essa técnica que Silveira & Azevedo (1987) foram capazes de mostrar a possibilidade de cruzar linhagens incompatíveis de *M. anisopliae* e demonstrar a alta variabilidade conseguida entre os recombinantes instáveis derivados dos produtos de fusão. Recombinantes também foram obtidos do mesmo modo em *B. bassiana* (Paccola-Meirelles & Azevedo, 1994).

Uma técnica usada com sucesso empregando-se fusão de protoplastos foi a do “doador morto”, onde uma linhagem selvagem pode ser inativada pelo calor e cruzada com linhagem auxotrófica. A linhagem inativada pode transferir DNA para a outra e recombinantes podem ser selecionados em meio mínimo. Outras marcas, como de resistência a fungicidas, podem também ser empregadas (Heale *et al.*, 1989).

A fusão de protoplastos é um processo de melhoramento que deve ser empregado quando existem linhagens incompatíveis e que, portanto, não podem ser recombinadas pelo ciclo sexual, se existente, ou pelo ciclo parassexual. É também um processo que permite a fusão e recombinação de espécies ou até gêneros distintos de fungos com possibilidade de recuperação de recombinantes.

## A TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE (TDR)

Também chamada popularmente de Engenharia Genética, esta é uma técnica que permite a manipulação *in vitro* do DNA, quebrando barreiras de incompatibilidade e permitindo que genes de uma espécie e até de um Reino diferente sejam introduzidos em hospedeiros, incluindo aí microrganismos entomopatogênicos. São muitas as revi-

sões sobre os detalhes da tecnologia do DNA recombinante (ver por exemplo Astolfi Filho *et al.*, 1985; e capítulo 7 deste volume). Dessa maneira, serão mencionados apenas alguns exemplos ilustrativos da tecnologia para demonstrar sua potencialidade no melhoramento genético de microrganismos usados no controle biológico de insetos.

## Exemplos da TDR no Melhoramento de Bactérias Entomopatogênicas

Até o momento, os principais exemplos da utilização dessa tecnologia encontram-se na bactéria *B. thuringiensis*. Vários genes de produção das toxinas responsáveis pela morte de insetos, localizados na maioria em elementos extracromossômicos, os plasmídeos já foram clonados em *B. thuringiensis*, inclusive a partir de linhagens brasileiras (Arantes *et al.*, 1990) e muitos já foram também seqüenciados. A partir destes dados, foi possível a tentativa de transferir genes de produção de toxina para outras bactérias como *Pseudomonas fluorescens* que, colocada no solo, foi usada para eliminar insetos aí existentes. Em seguida, tentativas foram e continuam a ser realizadas para controlar insetos transferindo gene produtor de toxina, do *B. thuringiensis* para bactérias endofíticas, isto é, aquelas que existem no interior de plantas. A transferência destes genes para uma bactéria endofítica de milho, a *Clavibacter xylii* deu resultados promissores no controle de insetos, embora a quantidade de toxina produzida ainda seja insuficiente para permitir um controle eficiente. Resultados de alto valor aplicado têm sido, entretanto, conseguidos pela transferência de genes de toxinas de *B. thuringiensis* diretamente para a planta, o que já foi conseguido em batata, fumo, algodão, tomate e muitos outros vegetais (ver capítulo 7 deste volume). Outra bactéria que vem sendo usada em termos de novas tecnologias é o *Bacillus sphaericus*, que também produz proteínas tóxicas para insetos, cujos genes estão em plasmídeos ou no cromossomo. Transferência de seus genes de toxinas para uma bactéria aquática, a *Caulobacter crescentus*, foi empregada visando controle biológico de larvas de insetos, como mosquitos (Thanabalu *et al.*, 1992).

De modo geral, pode-se dizer que destes estudos, alguns resultados interessantes vêm sendo obtidos com a descoberta de que, se certos genes de produção de toxinas são colocados na mesma bactéria, ocorrem sinergismos surgindo propriedades novas nas toxinas

(Tabashnik, 1992). Estudos têm também indicado que certos genes de produção de proteínas tipo chaperonas protegem as endotoxinas de degradação dentro de bactérias. Mais detalhes sobre os estudos de tecnologia do DNA recombinante em bactérias podem ser encontrados na revisão de Pietrantonio *et al.* (1996). De modo geral, entretanto, pode-se concluir que as novas tecnologias estão contribuindo para produzir microrganismos potencialmente úteis no controle biológico. Especialmente o processo de melhoramento genético, visando produção de plantas transgênicas resistentes a insetos pela transferência de genes codificadores de toxinas provenientes de bactérias já resultou em variedades comerciáveis, embora surjam problemas de resistência dos insetos às toxinas, o que, porém, pode ser contornado de várias maneiras (ver Azevedo, 1998a). De qualquer modo, essas tecnologias estão contribuindo para obtenção de produtos de controle biológico que poderão reduzir o uso de agroquímicos.

### **Exemplos da TDR no Melhoramento de Vírus Entomopatogênicos**

Os vírus, devido ao pequeno tamanho de seu genoma, são muito apropriados à manipulação pelas novas tecnologias. Uma das dificuldades do emprego de vírus no controle de insetos é a lentidão com que se processa a morte dos insetos atacados. Um programa de melhoramento de vírus, de tal modo que o período de tempo decorrido entre a infecção até a morte do inseto fosse reduzido, seria muito importante. Em *Baculovirus* certos genes como os de toxinas, alguns hormônios ou enzimas que afetam o inseto atacado têm produzido resultados animadores. Em *Baculovirus* da poliedrose nuclear *Autographa californica* a introdução de um gene de veneno de escorpião causou modificações no ataque de insetos, reduzindo o tempo de mortalidade (Stewart *et al.*, 1991; Cory *et al.*, 1994). Enquanto os controles (vírus sem o gene do escorpião) inoculados em *Aedes aegypti* foram ineficientes, a inoculação do vírus modificado deu 100% de mortalidade em 96 horas (ver revisão de Carlson *et al.*, 1995). Além do gene de veneno de escorpião, outros genes como de ecdisona ou de hormônio juvenil, carregado por vírus, podem bloquear o desenvolvimento do inseto. Outra estratégia que está sendo buscada é a de usar transposons que se espalham em populações de insetos, como acontece com o elemento transponível P de *Drosophila*

*melanogaster*. Se esse transposon levar um gene que inativa insetos, ele poderá ser útil no controle biológico. Mais detalhes podem ser encontrados na revisão de Pfeifer & Grigliatti (1996).

## Exemplos da TDR no Melhoramento de Fungos Entomopatogênicos

Infelizmente, em comparação com os vírus e bactérias, o progresso no melhoramento de fungos entomopatogênicos tem sido bem menos acentuado, o que é compreensível considerando-se o tamanho e a complexidade do material genético dos fungos em relação ao de vírus e bactérias. Técnicas de transformação em fungos entomopatogênicos têm sido melhoradas constantemente (Bogo *et al.*, 1996b) e genes têm sido clonados nestes fungos, desde o início desta década por St. Leger *et al.* (1992); Barreto *et al.*, 1995; Valadares & Peberdy (1995); Valadares *et al.* (1997), entre outros. Mais recentemente, St. Leger *et al.* (1996a) tentaram aumentar a velocidade de mortalidade de insetos atacados por *M. anisopliae* colocando cópias adicionais de um gene, o Pr1, que codifica uma protease que degrada a cutícula de insetos. Assim, essa proteína foi superproduzida constitutivamente na hemolinfa de *Manduca sexta* ativando o sistema de profenol oxidase. A combinação dos efeitos causou redução de 25% do tempo de morte dos insetos e redução de 40% na quantidade de alimento ingerido em relação ao controle. Outro gene estudado em *M. anisopliae* foi o Pr2, que produz uma proteinase envolvida na patogenicidade (St. Leger *et al.*, 1996c). Também quitinases extracelulares são sugeridas como fatores de virulência em fungos entomopatogênicos. Novamente, St. Leger *et al.* (1996b) estudaram a produção de quitinases de 3 fungos, frente a diferentes substratos. Puderam assim constatar os níveis de produção das enzimas durante a penetração do fungo no hospedeiro. Esses níveis parecem aumentar, dependendo do acesso ao substrato. Todos esses dados podem levar a estratégias positivas para o melhoramento genético de fungos para um controle biológico mais efetivo.

Entretanto, na penetração do fungo no inseto e patogenicidade são muitos os genes atuantes, além dos já citados, como os que produzem carboxipeptidases, N-acetilglucosaminidase, cisteína endoprotease e muitos outros. Assim, qualquer tentativa de melhoramento é bastante complexa e de resultados ainda limitados. Para uma revisão do assunto sugere-se consultar Clarkson & Charnley (1996).

## Outras Aplicações da TDR e Técnicas Dela Derivadas no Controle Biológico

Além da tecnologia do DNA recombinante, outras técnicas que resultaram do notável avanço da biologia molecular podem ser empregadas na identificação, caracterização, mapeamento genético e estimativa da biodiversidade existente dentro de espécies de interesse no controle biológico. Todas elas são de inegável valor também para o melhoramento genético.

Uma dessas técnicas é a de caracterização de linhagens por padrões eletroforéticos, isoenzimáticos ou zimogramas como utilizado por De Conti *et al.* (1980) e Sosa Gomes & Alves (1983) para *M. anisopliae*. Entretanto, os resultados obtidos apresentam variações com modificações do meio-ambiente, idade da cultura analisada, tipo de estrutura que está sendo analisada, entre outros fatores (Penalva da Silva & Azevedo, 1983). Existem atualmente diferentes técnicas de análise direta do DNA que são conhecidas por siglas tais como RFLP e RAPD, que são as mais comumente usadas. Detalhes dessas técnicas e seus empregos podem ser encontradas em Maurer *et al.* (1996); Fungaro & Vieira (1998) e Azevedo (1998a). Foi por meio da técnica de RFLP que Walsh *et al.* (1990) e Hajek *et al.* (1990) puderam concluir que a linhagem de *Entomophaga maimaga* encontrada nos Estados Unidos atacando o inseto *Lymantria dispar* era proveniente de linhagem japonesa introduzida em 1910 nos Estados Unidos. Essa técnica permitiu também a análise de DNA mitocondrial de *Metarhizium* caracterizando-se isolados tanto de *M. anisopliae* como *M. flavoviride*. Bridge *et al.* (1993) e Typas *et al.* (1992) por meio dessa técnica puderam distinguir entre *Verticillium lecanii* entomopatogênicos e fitopatogênicos. Por sua vez, com a técnica de RAPD, Stringman & Mackay (1993) distinguiram duas variedades do fungo entomopatogênico *Hirsutella*, a *H. longicolla* e *H. cornuta*. No Brasil, Fungaro *et al.* (1996) utilizaram RAPD para demonstrar que *M. anisopliae* isolados de diferentes regiões possuem padrões de RAPD semelhantes se provenientes da mesma espécie de inseto, mostrando que existe provável correlação entre determinados genótipos do patógeno que são hospedeiro-específicos.

Finalmente, uma outra técnica que utiliza o DNA para caracterização de isolados, linhagens, raças e espécies é a da separação de cromossomos por eletroforese em campo pulsado. Detalhes da mesma

podem ser encontrados em Pizzirani-Kleiner & Azevedo (1989). Ela já foi empregada com sucesso em alguns fungos usados no controle de insetos como *M. anisopliae* (Kava-Cordeiro *et al.*, 1993), demonstrando no caso alta variabilidade cromossômica na espécie.

Todas essas técnicas, além de caracterizar bem os isolados e linhagens ou mesmo variedades dentro de espécies, são importantes auxiliares do melhoramento genético, pois permitem que em cruzamentos, linhagens mais ou menos variáveis sejam empregadas, conforme o que se quer obter. Também como as linhagens possuem padrões bem definidos identificados por essas técnicas, elas podem ser aplicadas em campo e recuperadas de insetos atacados, sendo assim possível distinguir linhagens aplicadas deliberadamente em uma área, de outras já naturalmente existentes ali. Finalmente, esses marcadores são de valor óbvio em caso de patentes e disputas forenses.

## PERSPECTIVAS DO MELHORAMENTO GENÉTICO NO CONTROLE BIOLÓGICO

O melhoramento genético de microrganismos empregados no controle biológico de insetos, como visto, tem utilizado técnicas desde as mais simples como busca e seleção de isolados mais apropriados, até as modernas tecnologias. De modo geral, as técnicas mais naturais têm-se prestado melhor a esse tipo de melhoramento pois, como já citado, o microrganismo melhorado é, no caso de biocontrole, utilizado em espaço aberto, competindo ferozmente com outros lá existentes. Assim, como esperado, se ele não for altamente adaptado a essas condições, ele fatalmente lá não permanecerá. Um exemplo típico é o dado por St. Leger *et al.* (1996a) que produziram por tecnologia do DNA recombinante uma linhagem de *M. anisopliae* mais eficiente no ataque aos insetos, reduzindo seu tempo de morte, mas que era incapaz de se disseminar a partir de insetos infectados. Os autores tentam valorizar essa modificação indesejável salientando que ela seria vantajosa por impedir que um agente manipulado geneticamente fosse espalhado no ambiente. Fica evidente, entretanto, que nesse caso, a manipulação genética em *M. anisopliae* retirou de um fungo usado no biocontrole uma das vantagens mais importantes desse tipo de controle, qual seja, a disseminação e manutenção de esporos de fungos no

ambiente. Por outro lado, Bagalhi (1986) chegou a obter linhagens de *M. anisopliae* com redução do tempo de mortalidade de insetos atacados, pelo menos em bioensaios, com um método muito menos sofisticado e menos dispendioso, qual seja, o de realizar cruzamentos entre linhagens e infectar com um conjunto de recombinantes (composto) os insetos dos quais os isolados de fungos mais aptos eram selecionados. Esse exemplo apenas indica que métodos tradicionais não podem ser esquecidos no melhoramento genético mas, por outro lado, não significa também que resultados favoráveis não sejam obtidos com os processos mais sofisticados de melhoramento, como aliás exemplos citados acima estão a demonstrar. Entretanto, para caracteres multi-gênicos, como é o caso de patogenicidade, a técnica do DNA recombinante ainda está longe de produzir resultados de aplicação imediata, embora estudos nesse sentido possam levar a um maior conhecimento dos processos de infecção, como já salientavam Heale *et al.* em 1989. Seguramente essas metodologias estão em constante desenvolvimento, e é de se esperar que problemas menores possam ser sobrepujados. Possivelmente após a virada do século já deverão existir diversos produtos oriundos das novas tecnologias disponíveis no mercado.

Por fim, alguns pontos de ataque no melhoramento genético de microrganismos entomopatogênicos podem ser mencionados. Em primeiro lugar, o processo de adesão do fungo ao inseto tem que ser melhor estudado e suas particularidades esclarecidas, pois sabe-se que linhagens pouco ativas têm pouca adesão. Outras características que podem ser melhoradas são: alta porcentagem de germinação de conídios de fungos entomopatogênicos, maior atividade de enzimas que degradam a cutícula dos insetos, maior produção de toxinas pelos microrganismos usados no controle biológico, maior tolerância a condições de estresse pelos microrganismos empregados, maior taxa de esporulação e dispersão do patógeno dos insetos e muitas outras características que, se bem conhecidas, poderão ser passíveis de melhoramento por técnicas convencionais ou modernas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluindo, o controle microbiano de pragas agrícolas representa um processo que pode substituir, pelo menos em parte, outros tipos

de controle, especialmente o químico, com vantagens econômicas e de preservação do ambiente. Em países de clima tropical e com vastas áreas plantadas como é o caso do Brasil, sua importância é ainda mais acentuada. Felizmente o Brasil tem um bom contingente de pesquisadores envolvidos em controle biológico e detém quase que uma supremacia no setor tanto em termos de pesquisa básica como principalmente aplicada. Pode ser notado que das referências citadas na presente revisão, cerca de 75% delas envolvem pesquisadores brasileiros, e isso sem que se esgotassem as muitas outras contribuições oferecidas pelos brasileiros nesta área. É de se esperar, portanto, que nos próximos anos o controle biológico se encontre ainda mais difundido e que novos processos e produtos de valor econômico e principalmente ecológico venham a ser desenvolvidos em nosso país.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B. **Controle Microbiano de insetos**. São Paulo, Editora Manole, 1986, 407p.
- ALVES, S.B. Controle Microbiano de Insetos. In: CROCOMO, W.B. **Manejo integrado de pragas**. p.147-176. São Paulo, Editora Unesp 1990.
- ALVES, S.B. Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.27, p.77-86, 1992.
- ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, Editora da Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998, p.
- ALVES, S.B.; LECUONA, R.E. Utilización de hongos entomopatógenos. In: LECUONA, R.E. **Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga**. p.241-254. Buenos Aires, Edição do autor, 1996.
- ARANTES, O.M.N.; AZEVEDO, J.L. A Biotecnologia na Agropecuária. **Semina** v.7 p.62-87, 1986.
- ARANTES, O.M.N.; MENO, G.; SANCHIS, V.; AZEVEDO, J.L.; LERECLUS, D. Cloning of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. **Revista Brasileira de Genética**, v.13, p.645-652, 1990.
- ASTOLFI FILHO, S.; AZEVEDO, J.L.; AZEVEDO, M.O. Novas técnicas de recombinação em microrganismos: A engenharia genética pela tecnologia do DNA recombinante. In: AZEVEDO, J.L. **Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética**. Piracicaba, Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1985, p.43-59.
- AZEVEDO, J.L. **Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética**. Piracicaba. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1985, 173 p.
- AZEVEDO, J.L. Recombinação em fungos filamentosos. In: COSTA, S.O.P. **Genética Molecular e de Microrganismos**. São Paulo, Editora Manole, 1987, p.393-407.
- AZEVEDO, J.L. Melhoramento genético de fungos utilizados no controle biológico de insetos: Utilização do processo paramiótico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.27-29, 1989.
- AZEVEDO, J.L. Engenharia genética aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. p. Piracicaba, Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998a.
- AZEVEDO, J.L. **Genética de microrganismos**. Goiânia, Editora Universidade Federal de Goiás, 1998b. p
- AZEVEDO, J.L.; MESSIAS, C.L. Aspectos genéticos do controle biológico de insetos por fungos. In: AZEVEDO, J.L. **Genética de microrganismos em Biotecnologia e Engenharia Genética** p.111-114, Piracicaba, Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1985.
- AZEVEDO, J.L.; MESSIAS, C.L.; SILVEIRA, W.D. Genetics and breeding of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: Parasexuality and protoplast fusion. p.305-318. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; BRAVO, J.F.; TAVARES, F.C.A.; PADDOCK, E.F. **Biotechnology of plants and microorganisms**, Columbus, Ohio State University Press, 1986.
- BAGALHI, E. Pameiose em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, Piracicaba, 1986, 123p. Tese de Mestrado. ESALQ/USP
- BAGALHI, E.; VALADARES, M.C.C.; AZEVEDO, J.L. Pameiosis in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Revista Brasileira de Genética**, v.14, p.261-271, 1991

- BARRETO, C.C.; PINTO JR., H.; PINTO, A.S.; AUGUSTIN, C.; VARGAS, E.V.; ULHOA, C.; VAINSTEIN, M.V.; SCHRANK, A. Clonagem do gene de quitinase em *Metarhizium anisopliae*. In: ANAIS DA XX REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICROORGANISMOS, Piracicaba v.20, p.131, 1995.
- BATISTA FILHO, A.; LEITE, L.G.; MACHADO, L.A. O que é o controle biológico. In: ALVARENGA, O.M. **Manual de Controle Biológico** p.4-5, Sociedade Nacional de Agricultura, Rio de Janeiro, p.6. 1992.
- BOGO, M.R.; QUEIROZ, M.V.; SILVA, D.M.; AZEVEDO, J.L.; SCHRANK, A. Double strand RNA and isometrical virus particles isolated from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research** v.199, p.1468-1472. 1996a.
- BOGO, M.R.; VAINSTEIN, M.H.; ARAGÃO, F.J.L.; RECH, E.; SCHRANK, A. High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**. v.142, p.123-127, 1996b.
- BONATELLI JR., R.; AZEVEDO, J.L.; VALENT, G.U. Parasexuality in a citric acid strain of *Aspergillus niger*. **Revista Brasileira de Genética** v.6, p.399-405, 1983.
- BRAGA, G.U.L.; MESSIAS, C.L.; VENCOSKY, R. Estimates of genetic parameters related to protease production by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.64, p.6-12. 1994.
- BRIDGE, P.D.; WILLIAMS, M.A.J.; PRIOR, C.; PATERSON, R.R.M. Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. **Journal General Microbiology** v.139, p.1163-1169, 1993.
- CARLSON, J.; OLSON, K.; HIGGS, S.; BEATY, B. Molecular genetic manipulation of mosquito vectors. **Annual Review of Entomology**. v.40, p.369-388, 1995.
- CLARKSON, J.M.; CHARNLEY, A.K. New insights in the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends In Microbiology**, v.4, p.197-203, 1996.
- CORY, J.S.; HIRST, M.L.; WILLIAMS, T.; HAILS, R.S.; GOULSON, D.; GREEN, B.M.; CARTY, T.M.; POSSEE, R.D.; CAYLEY, P.J.; BISHOP, D.H.L. Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. **Nature** v.370, p.138-140, 1994.
- COUTINHO, H.L.C. Diversidade Microbiana e Agricultura sustentável. WORKSHOP BIODIVERSIDADE: PERSPECTIVAS E OPORTUNIDADES TECNOLÓGICAS, 1996, Campinas, 17p.
- CROCOMO, W.B. **Manejo Integrado de Pragas**. São Paulo, 1990, Editora UNESP, 358p. 1990.
- DE CONTI, E.; MESSIAS, C.L.; SOUZA, H.M.L.; AZEVEDO, J.L. Electrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarhizium anisopliae*. **Experientia, Basel** v.36, p.293-294, 1980.
- DIAS, J.M.; PIRES, C.S.S.; MAGALHÃES, B.P.; FONTES, E.M.G. Distribuição regional, força de trabalho e atividades principais dos laboratórios que trabalham em controle biológico de insetos no Brasil. In: **Control Biológico en el Cone Sur**, p.111-137 Pelotas, EMBRAPA/CPACT, 1994.
- FERNANDES, P.M.; ALVES, S.B. Controle de *Comitermes cumulans* (Koller) Isoptera: Teratidae com *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., em condições de campo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** v.20, p.45-49, 1991.
- FLORES, M.X.; SÁ, L.A.N.; MORAES, G.J. Controle Biológico: Importância Econômica e Social. In: ALVARENGA, O.M. **Manual de Controle Biológico** p.6-9 Sociedade Nacional de Agricultura, Rio de Janeiro, 1992.
- FONTES, E.G. Fungo é o inimigo natural. In: ALVARENGA, O.M. **Manual de Controle Biológico**. p.27-28. Sociedade Nacional de Agricultura, Rio de Janeiro, 1992.
- FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* detected by RAPD. **Letters in Applied Microbiology**. v. 22, p.389-392, 1996.
- FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Aplicações da PCR em ecologia microbiana. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (eds.). **Ecologia Microbiana**. EMBRAPA-CNPMA, 1998. (em impressão).
- GOETTEL, M.S.; ST. LEGER, R.J.; BHAIRI, S.; JUNG, M.K.; OAKLEY, B.R.; STAPLES, R.C. Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using *Aspergillus nidulans* *benA3* gene. **Current Genetics** v.17, p.129-132, 1989.
- HAJEK, A.N.; HUMBER, R.A.; ELKINTON, J.S.; MAY, B.; WALSH, S.R.A.; SILVA, J.C. Allozyme and restriction fragment polymorphism analysis confirm *Entomophaga maimaga* responsible by 1989 epizootics in North American gypsy moth populations. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**. v.87, p.6979-6982, 1990.
- HEALE, J.B.; ISAAC, J.E.; CHANDLER, D. Prospects for strain improvement in entomopathogenic fungi. **Pesticide Science** v.26, p.79-92, 1989.
- KAVA-CORDEIRO, V.; ALVES-LIMA, E.A.L.; AZEVEDO, J.L. Survival and mutant production induced by mutagenic agents in *Metarhizium anisopliae*. **Scientia Agricola** v.52, p.548-554, 1995.
- KAVA-CORDEIRO, V.; QUEIROZ, M.V.; AZEVEDO, J.L. Cariótipos eletroforéticos de *Metarhizium anisopliae*. **Revista Brasileira de Genética**, v.13 (suplemento), p.200, 1993.
- LECUONA, R.E. **Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga**. 1996 Buenos Aires. Editora Autor, 338p., 1996.
- MARQUES, E.J. Controle microbiano de cigarrinhas (Hemiptera: Cercopidae) com *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Eficiência e limitações. In: SINCOBIOL III, p.73-78, Águas de Lindoia, 1992.
- MARQUES, E.J.; VILLAS-BOAS, A.M.; PEREIRA, C.E.F. Orientações técnicas para a produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em laboratórios setoriais. Piracicaba, PLANALSUCAR, Boletim técnico 3, p.5-23, 1981.

- MAURER, P.; COUREADIER, Y.; NEUVEGLISE, C.; RIBA, G. Caracterización molecular de los hongos entomopatógenos. In: LEUCONA, R.E. **Microrganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga** p.313-318, Buenos Aires, Edición do autor, 1996.
- MEEKER, D. What pests costs Floridians. **Research-87** Institute of Food and Agricultural Research, University of Florida. p.11, 1987.
- MESSIAS, C.L. Parasssexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1979, 73p. Tese de Doutorado, ESALQ/USP.
- MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L. Parasexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.75, p.473-477, 1980.
- MIRANDA, A. Fungo revela-se eficiente no controle. In: ALVARENGA, O.A. **Manual de Controle Biológico**. p.17-18, Sociedade Nacional de Agricultura, Rio de Janeiro, 1992.
- NATIONAL RESEARCH INSTITUTE. Integrated pest management **Resource Newsletter**, v.5, p.1-16, 1992.
- PACCOLA MEIRELLES, L.D.; AZEVEDO, J.L. Parasexuality in *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.57, p.172-176, 1991.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; AZEVEDO, J.L. Genetic recombination by protoplast fusion in the Deuteromycete *Beauveria bassiana*. **Revista Brasileira de Genética**, v.17, p.15-18, 1994.
- PEBERDY, J.F.; FERENCZY, L. **Fungal protoplasts: Applications in biochemistry and genetics**. New York, Marcel Dekker, Inc. 1985, 354p.
- PECORARO, R.A.; SCHMITT, A.T. Bioinseticida eficaz e econômico. In: ALVARENGA, O.M. p.29-30. **Manual de Controle Biológico**, Sociedade Nacional de Agricultura, Rio de Janeiro, 1992.
- PENALVA DA SILVA, F.; AZEVEDO, J.L. Esterase pattern of a morphological mutant of the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.81, p.161-163, 1983.
- PFEIFER, T.A.; GRIGLIATTI, T.A. Future perspectives on insect pest management: Engineering the pest. **Journal of Invertebrate Pathology** v.67, p.109-119, 1996.
- PIETRANTONIO, P.V.; COWLES, E.A.; GILL, S.S. Avances moleculares en bacterias entomopatógenas. In: LEUCONA, R.R. **Microrganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga**, p.319-330. Buenos Aires, Edición do autor, 1996.
- PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. **Técnicas eletroforéticas para separação de cromossomos de microrganismos**. Piracicaba, Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1989, 31p.
- PRIMROSE, S.B. **Modern Biotechnology**, Oxford, Blakwell Sci. Public. 1987, 176 p.
- SANTOS, A.L.L.; AZEVEDO, J.L. Resistência do fungo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* em relação a três fungicidas. **Revista de Microbiologia**, v.13, p.272-278, 1982.
- SILVEIRA, W.D.; AZEVEDO, J.L. Protoplast fusion and genetic recombination in *Metarhizium anisopliae*. **Enzyme and Microbial Technology** v. 9, p.149-152, 1987.
- SOSA GOMES, D.R.; ALVES, S.B. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. I- Estandarización, virulencia y actividad enzimática. **CIRPON, Revista de Investigación** v.1, p.83-102, 1983.
- ST. LEGER, R.J.; FRANK, D.C.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **European Journal of Biochemistry** v.204, p.991-1001, 1992.
- ST. LEGER, R.J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.93, p.6349-6354, 1996a.
- ST. LEGER, R.J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.J.; RIZZO, N.W.; ROBERTS, D.W. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviridae* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.907-912, 1996b.
- ST. LEGER, R.J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.J.; RIZZO, N.W.; ROBERTS, D.W. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsin produced by *Metarhizium anisopliae* in infect insects cuticles. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.1257-1264, 1996c.
- STEWART, L.M.D.; HIRST, M.; FERBER, M.L.; MERRYWEATHER, A.T.; CAYLEY, P.S.; FOSSE, R.D.; LOPES-FERBER, M. Construction of an improved Baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. **Nature**, v.352, p.85-88, 1991.
- STRINGMAN, D.B.; MACKAY, R.M. Discrimination between *Hirsutella longicolla* var. *longicolla* and *Hirsutella longicolla* var. *cornuta* using random amplified polymorphic DNA fingerprints. **Mycologia**, v.85, p.65-70, 1993.
- TABASHNIK, B.E. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied and Environmental Microbiology** v.58, p.3343-3346, 1992.
- THANABALU, T.; HINDLEY, J.; BRENNER, S.; OEI, C.; BERRY, C. Expression of the mosquitoicidal toxins of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* by recombinant *Caulobacter crescentus* a vehicle for biological control of aquatic insect larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.905-910, 1992.
- TYPAS, M.A.; GRIFFOCU, A.M.; BAINBRIDGE, B.W.; HEALE, J.B. Restriction fragment length polymorphism in mitochondrial DNA and ribosomal RNA gene complexes as an aid to the characterization of species and subspecies populations in the genus *Verticillium*. **FEMS microbiology Letters**, v.95, p.157-172, 1992.
- USDA - Evicting the boll weevil. **Agricultural Research**, v.42, p4 10, 1994.

## ESTRATÉGIAS DE CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS COM FITOPATÓGENOS

Atualmente, existem duas principais modalidades de estratégias estabelecidas de controle biológico por meio de fitopatógenos: a estratégia clássica, que consiste na importação e liberação de patógenos da região de origem de plantas daninhas, e a estratégia inundativa ou do bioherbicida, baseada na multiplicação massal e aplicações periódicas do patógeno, à semelhança dos herbicidas químicos (Schroeder, 1983; Mortensen, 1986; Charudattan, 1993a). Como os agentes utilizados nesta estratégia têm sido sempre fungos, o produto desenvolvido é chamado micoherbicida.

Existe ainda uma terceira modalidade de estratégia, menos utilizada, denominada aumentativa, que requer o periódico restabelecimento do agente de controle, porém com menor intensidade e frequência do que os micoherbicidas (Hasan & Ayres, 1990).

### Estratégia Clássica

Teoricamente, uma planta que passa a desenvolver-se na ausência do patógeno, após várias gerações tende a ser mais vulnerável, se restabelecido o contato com o mesmo (Charudattan, 1988). Na estratégia clássica de controle biológico, busca-se não a erradicação de espécies de plantas daninhas, mas a estabilização permanente de populações dessas espécies em níveis aceitáveis (Zwoelfer, 1973; Schroeder, 1983; Watson, 1991). A partir de uma única liberação em pontos determinados, o agente de biocontrole deve ser capaz de se estabelecer e autoperpetuar na nova área, sem nenhuma manipulação após a inoculação inicial. Por ser a quantidade de doença determinada pela capacidade de sobrevivência, multiplicação e disseminação do patógeno, podem decorrer meses ou até anos até que se atinja um nível significativo de controle. É impossível prever o aumento ou o decréscimo da eficácia de um agente, após a liberação no ambiente. Também é praticamente impossível parar a atividade desse agente, depois de liberado, sem uma campanha de erradicação maciça (Charudattan, 1988; Charudattan, 1993a).

O sucesso do estabelecimento do agente introduzido depende em grande parte do grau de semelhança do novo ambiente com seu ambi-

ente de origem. Entretanto, não apenas as características físicas do ambiente são importantes. Mesmo que o clima do novo ambiente lembre o ambiente de origem do agente, este pode falhar devido à falta, na área, de um hospedeiro alternativo, não-adaptação ao biotipo da planta-alvo ou presença de hiperparasitas nativos que podem adaptar-se a ele e limitar sua eficiência. Assim, um completo entendimento da etiologia da doença, conhecimento das condições ótimas de ambiente para completa infecção e a disponibilidade de material hospedeiro suscetível são essenciais para otimizar a liberação do inóculo no controle biológico clássico (Van den Bosch *et al.*, 1982; Watson, 1991).

Devido ao seu custo relativamente baixo, a estratégia clássica é geralmente preferível em áreas extensas com baixos rendimentos ou de retorno econômico incerto (Evans, 1987; Charudattan, 1988; Charudattan, 1990a; Charudattan, 1990b). Os agentes selecionados são usualmente fungos, cujos esporos são disseminados pelo vento e que caracteristicamente apresentam rapidez de esporulação, desenvolvimento de doença e disseminação (Charudattan, 1985; Mortensen, 1986).

### **Estratégia Inundativa**

Um controle biológico de plantas daninhas bem sucedido é dependente dos três fundamentos da epidemiologia: inóculo inicial ( $X_0$ ), taxa de reprodução ( $r$ ) e tempo ( $t$ ) (TeBeest, 1991). As epidemias desenvolvem-se tão rápido quanto maior for a quantidade inicial de inóculo para começar a infecção e a velocidade de multiplicação do patógeno, incrementando a quantidade de doença no tempo. A maioria dos patógenos sobrevive de uma estação de cultivo a outra em restos de cultura deixados no solo. Entretanto, em culturas anuais, as práticas culturais normalmente adotadas destroem ou removem muito do material vegetal, restando pouco inóculo para o desenvolvimento de uma epidemia na estação seguinte. Portanto, o cultivo massal e liberações de inóculo adicionais, de modo a utilizar efetivamente os curtos períodos de tempo durante os quais o hospedeiro é suscetível e as condições ambientais são favoráveis à infecção (janelas de infecção), podem promover o desenvolvimento de epidemia capaz de eliminar uma população de plantas de maneira idêntica aos herbicidas químicos (Mortensen, 1986; TeBeest, 1991).

Diversos são os mecanismos pelos quais o homem pode superar as limitações do desenvolvimento de doença: pelo incremento da quantidade de inóculo, pelo aproveitamento de curtos períodos de tempo durante os quais o hospedeiro é suscetível e as condições ambientais são favoráveis à infecção (janelas de infecção), pela formulação de propágulos infectivos ou pelo suprimento de irrigação para superar obstáculos ambientais (Watson, 1991). Os efeitos são restritos à área de aplicação, uma vez que, geralmente, os organismos utilizados apresentam limitado potencial de dispersão e sobrevivência.

Embora tanto organismos exóticos como nativos tenham potencial para bioherbicidas, a maioria das pesquisas tem envolvido patógenos fúngicos nativos (Templeton & TeBeest, 1979; Evans, 1987). Um grau mais elevado de especificidade é exigido para organismos introduzidos. Entretanto, os patógenos considerados para uso como bioherbicidas devem ser suficientemente específicos para não prejudicar as culturas nas quais a planta-alvo vai ser controlada. Além disso, os agentes para herbicidas microbianos, ao contrário do controle clássico, não devem disseminar-se rapidamente e não devem causar epidemias na estação seguinte (Mortensen, 1986).

O agente inundativo é cultivado em larga escala, formulado, padronizado, empacotado e registrado como um vírus. Sua comercialização fundamenta-se na periodicidade de aplicação, à semelhança dos herbicidas convencionais. Essa estratégia, ao contrário do que foi exposto em relação à estratégia clássica, enfatiza a manipulação do patógeno no tocante ao seu estabelecimento, controlando a quantidade de doença causada na população específica de hospedeiro (TeBeest *et al.*, 1992).

## Estratégia Aumentativa

A estratégia aumentativa é uma abordagem que vem sendo pesquisada para patógenos nativos não-cultiváveis em meio de cultura, como ferrugens e carvões. O potencial de inóculo é periodicamente aumentado pela reintrodução do fungo em pontos determinados, visando atingir níveis significativos de doença a partir de um número de plantas infectadas. Um exemplo de aplicação dessa alternativa é o controle da tiririca amarela (*Cyperus esculentus*) utilizando *Puccinia canaliculata* (Phatak *et al.*, 1987), onde o inóculo coletado de plantas infectadas é concentrado e reaplicado. Na década de 1980 foi registra-

do nos Estados Unidos um produto à base desta ferrugem, sob o nome de Dr. BioSedge, não despertando, entretanto, interesse para a produção comercial (Charudattan, 1996).

A estratégia aumentativa é similar à estratégia inundativa, quanto ao aspecto da intervenção humana na distribuição de inóculo. Porém, neste caso, o inóculo não é produzido artificialmente nem aplicado maciçamente sobre populações de plantas (Charudattan, 1991).

## CONSIDERAÇÕES BÁSICAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM PROGRAMA DE CONTROLE BIOLÓGICO COM FITOPATÓGENOS

O controle biológico de plantas daninhas no passado era considerado como um último recurso, quando os métodos convencionais de controle não podiam ser aplicados, tinham falhado ou eram anti-econômicos. Hoje, após inúmeras experiências passadas e devido a considerações científicas e econômicas, é geralmente aceito que esse método de controle pode ter aplicação mais ampla, e que o início de um projeto deve ser precedido de uma análise cuidadosa e cientificamente fundamentada do problema (Andres *et al.*, 1976; Schroeder, 1983; Watson, 1991).

O ponto crucial para o início de um projeto de controle biológico, com utilização de fitopatógenos, é a escolha da estratégia a ser adotada. Em geral, existe um consenso de que o uso de bioherbicidas desenvolvidos à base de patógenos nativos é o método mais indicado para situações em que a liberação de organismos exóticos possa gerar conflitos de interesse. Entretanto, um argumento em favor do controle biológico clássico tem sido a constatação de que ele, ao contrário dos métodos mecânico e químico, provoca uma redução gradual no número de plantas daninhas e a erradicação dificilmente ocorreria. Portanto, se a planta benéfica puder ser mantida a um nível mais baixo de abundância e como parte de uma comunidade mais diversificada, o conflito de interesses estará resolvido (Andres *et al.*, 1976).

O valor do uso do controle biológico clássico para controle de plantas daninhas em áreas perturbadas tem sido questionado (Andres *et al.*, 1976). Entretanto, o controle de *C. juncea* na cultura de trigo na Austrália (Cullen *et al.*, 1973) e de *Senecio vulgaris* nos Estados Unidos

e na Austrália (Paul *et al.*, 1993) mostram que essa estratégia pode também ser aplicada como um componente do manejo integrado em sistemas de cultivo intensivo (Watson, 1991).

Os passos seguidos no desenvolvimento de programas de controle biológico com fitopatógenos foram revistos por Hasan (1980) e são essencialmente idênticos aos descritos por Harris (1971), para insetos: 1) determinar a planta daninha alvo para o controle; 2) conduzir levantamento de inimigos naturais no centro de origem da espécie-alvo; 3) selecionar os inimigos naturais mais efetivos; 4) estudar a especificidade desses organismos para determinar a segurança de introdução na área de controle; 5) introduzir e estabelecer os organismos selecionados; 6) avaliar os efeitos do organismo introduzido na população da espécie-alvo.

## **Definição da Espécie Daninha Alvo**

O processo de definição da espécie-alvo deve envolver a sua identificação correta, distribuição geográfica, informações sobre a sua biologia, ecologia e interações com a flora e fauna nativas e características das áreas colonizadas. Estudos ecológicos são importantes para determinar as condições que favorecem o seu crescimento. A distribuição ecológica da planta daninha na área introduzida deve ser comparada com sua distribuição no centro de origem para determinar a região em que a procura de inimigos naturais deve ser iniciada. Na coleta de dados climáticos, os valores extremos são mais importantes do que valores médios, pois determinam a habilidade de um agente sobreviver e multiplicar-se em uma localidade particular (Harley & Forno, 1992).

O primeiro ponto a ser considerado na seleção de espécie-alvo é a estimativa de perdas econômicas e valor de eventuais propriedades benéficas a ela associado. O custo do controle convencional é geralmente melhor conhecido e pode servir de base para estimar a taxa de custos-benefícios para o controle biológico (Harris & Cranston, 1979; Schroeder, 1983).

## **Levantamento de Agentes de Controle Biológico**

Embora teoricamente todos os tipos de patógenos de planta, incluindo vírus, bactérias, nematóides e outros que adversamente afetam o crescimento e a reprodução de uma planta daninha, possam ser consi-

derados como agentes de biocontrole, a maioria dos projetos de pesquisa vem sendo conduzida com fungos (Leonard, 1982; Schroeder, 1983; Phatak *et al.*, 1987). Estes são encontrados em maior abundância na natureza, apresentam maior facilidade de identificação e têm posição taxonômica melhor definida. Outras características dos fungos relacionadas à facilidade de cultivo em meios artificiais para produção massal, formulação e aplicação em larga escala tornam-nos mais atraivos para uso como bioherbicida (Schroeder, 1983; Charudattan, 1985).

No controle biológico clássico, da mesma forma que no método aumentativo, os fungos causadores de ferrugem têm sido os agentes escolhidos quase de forma exclusiva porque, além de particularmente danosos a seus hospedeiros, são com facilidade disseminados pelo vento, usualmente apresentam grau elevado de especialização e são em geral bem conhecidos e documentados na literatura (Watson, 1991). Dentre as ferrugens, as autoécias são usualmente preferíveis às heteroécias, porque estas últimas podem envolver plantas úteis ou plantas ausentes da área-alvo, como hospedeiros alternativos. Além disso, os testes de especificidade de hospedeiro com ferrugens heteroécias são dificultados pela necessidade de conduzirem também testes com hospedeiros alternativos (Hasan, 1980).

Antes do início dos levantamentos de campo, é imprescindível um amplo levantamento de literatura, para obter informações sobre as regiões de ocorrência da espécie daninha alvo, seu centro de origem e doenças a ela associadas (Hasan, 1980). Esse levantamento bibliográfico serve de base para indicação de possíveis agentes candidatos e para a seleção de áreas de coletas de patógenos (Watson, 1991).

Os levantamentos de inimigos naturais devem ter início no centro de origem da planta daninha alvo, onde são maiores as possibilidades de se encontrar em organismos com as características desejadas: segurança para espécies não-alvo, efetividade e virulência. Além disso, o ideal é que a área de levantamento tenha características ecológicas análogas às verificadas nas regiões onde a planta daninha ocorre em níveis danosos. Entretanto, o centro de origem pode ser incerto ou inacessível e áreas climáticas homólogas podem não existir. Para situações como essas, sugere-se uma pesquisa ao acaso nas regiões de ocorrência da planta daninha em questão ou levantamento de inimigos naturais de espécies daninhas relacionadas que são ecologicamente homólogas à espécie-alvo (Schroeder, 1983).

## Seleção dos Agentes Efetivos de Controle

A escolha ou seleção de agentes de biocontrole é teoricamente baseada em dois critérios: eficiência e segurança (Schroeder, 1983). As abordagens propostas atualmente baseiam-se primariamente na biologia e na ecologia do agente, porém uma clara indicação dos seus efeitos adversos sobre a planta-alvo é também exigida (Watson, 1991).

Fatores climáticos e geográficos afetam a virulência, intensidade de doença, infectividade e capacidade de disseminação do patógeno de uma planta a outra. Se o patógeno apresenta alta virulência e ampla disseminação em áreas do ambiente nativo, quando introduzido em região de clima análogo, pode-se esperar efeito semelhante após a introdução (Wapshere, 1970).

Em alguns casos, a eficiência do patógeno já é constatada no ambiente nativo da espécie daninha, como ocorreu antes da introdução de *P. chondrillina* na Austrália para controle de *C. juncea*. Entretanto, dificuldade de acesso e limitação de recursos no ambiente nativo da planta-alvo freqüentemente levam à necessidade de realização de experimentos para avaliação da eficiência dos patógenos selecionados sob quarentena (Watson, 1991).

As pesquisas dentro de condições controladas apresentam certas limitações, por exemplo: a morfologia e anatomia de plantas que se desenvolvem sob estas condições podem diferir das desenvolvidas sob condição natural. Por outro lado, os estudos da influência de fatores abióticos na infecção, geralmente, são mais rápidos, comparados com experimentos de campo, onde usualmente ocorre uma única oportunidade de conduzir tais experimentos durante um ano (Watson, 1991).

## Determinação da Especificidade de Hospedeiro

A introdução de patógenos exóticos requer especificidade restrita do agente candidato. Extensivos testes devem ser realizados, nas regiões de origem do organismo a ser introduzido ou dentro de quarentenas especializadas, para se ter segurança de que ele não irá causar danos a plantas benéficas no país onde será introduzido ou em países vizinhos (Watson, 1991). Os experimentos devem ser conduzidos sob condições controladas, onde o patógeno é testado contra um grupo selecionado de espécies selvagens e cultivadas, sob condições ótimas

para o desenvolvimento da doença, previamente determinadas. Usando essa técnica, um número de plantas selecionadas é exposto ao patógeno. Uma planta é considerada imune quando não desenvolve sintomas da doença (Hasan, 1980).

A maioria dos testes de especificidade segue o método centrífugo filogenético proposto por Wapshere (1974), que consiste em delimitar a extensão do círculo de hospedeiro do agente de biocontrole, testando espécies filogeneticamente relacionadas e outras espécies de risco. As espécies consideradas de risco incluem: 1) as filogeneticamente relacionadas à espécie daninha alvo; 2) as não-expostas previamente ao agente de biocontrole; 3) as com limitadas informações acerca de seus inimigos naturais; 4) as que têm compostos secundários semelhantes ou que apresentam similaridades morfológicas com a espécie-alvo; 5) as que são atacadas por organismos relacionados e 6) as relatadas como hospedeiras do agente candidato (Watson, 1991). Estudos sobre abrangência de hospedeiros e testes de especificidade de patógenos foram desenvolvidos por diversos autores, incluindo Hasan (1972), Trujillo & Norman (1995), Yang & Jong (1995a) e Yang & Jong (1995b).

No caso de patógenos nativos usados como micoherbicidas, a especificidade restrita não é exigida, pois ao longo do tempo de coevolução, plantas invasoras e seus patógenos desenvolveram mecanismos de equilíbrio de populações (Shrum, 1982). Além disso, os micoherbicidas, do mesmo modo que os herbicidas químicos, podem ser direcionados para áreas específicas, evitando riscos para espécies não-alvo. Uma epidemia iniciada pela aplicação de inóculo pode ser facilmente alterada ou reduzida pela interrupção das aplicações, possibilitando, desse modo, o uso de patógenos nativos com estreito círculo de hospedeiro (Charudattan, 1988).

## **Liberação e Estabelecimento de Agentes Selecionados**

A introdução de agentes de controle biológico requer a permissão da autoridade quarentenária competente (Schroeder, 1983). A liberação, uma vez autorizada, é feita em sítios relativamente não perturbados, preservados, onde a planta daninha ocorre em densidades relativamente altas. Os focos de introdução devem ser escolhidos com base nos fatores climáticos, para que o organismo encontre condições favo-

ráveis ao seu estabelecimento. As inoculações devem ser feitas em épocas e horários apropriados. Também devem ser tomados cuidados para a não introdução simultânea de hiperparasitas do agente de controle (Hasan, 1980; Watson, 1991), os quais iriam certamente interferir no seu estabelecimento e eficiência.

## **Avaliação do Efeito do Agente Introduzido na População da Planta-Alvo**

As avaliações técnicas dos resultados de um projeto de controle biológico são muito úteis, pois servem de base para implementação de novos projetos (Watson, 1991). Estudos conduzidos com *P. chondrillina* em *C. juncea* (Cullen *et al.*, 1973) e com *P. lagenophorae* em *S. vulgaris* (Paul *et al.*, 1993) evidenciaram o efeito da ferrugem em reduzir a capacidade competitiva do hospedeiro, sendo o impacto da doença mais pronunciado em altas densidades de população e condições de seca e frio intenso, porém reduzido por deficiência de nutrientes. Avaliações de ferrugens em programas de controle biológico devem, portanto, ser baseadas no rendimento das culturas mais do que em função de injúrias ou mortalidade da planta daninha alvo, que não levam em conta a competitividade (Paul & Ayres, 1987).

*P. chondrillina* foi liberado inicialmente em oito focos diferentes de infecção na população de *C. juncea* no sul da Austrália. O propósito inicial era restabelecer o ataque da ferrugem em outros pontos de inoculação, na primavera seguinte. A dispersão da doença foi monitorada, verificando-se rápida dispersão do patógeno, fato que tornou desnecessária a realização de novas liberações. Nessas circunstâncias, a rápida destruição da planta daninha pode ser mostrada por uma seqüência de fotografias feitas antes e depois do ataque da ferrugem (Hasan, 1980).

Os aspectos econômicos são de difícil avaliação, mas importantes para a determinação dos custos e benefícios do controle biológico. Entretanto, a decisão de se iniciar um projeto de controle biológico nem sempre é tomada com base em custos, porque os benefícios de um projeto bem sucedido, em muitos casos, são de difícil expressão em termos monetários, embora isso seja altamente desejável, quando apropriado (Schroeder, 1983).

## EXEMPLOS DE APLICAÇÃO DE PATÓGENOS EM CONTROLE BIOLÓGICO CLÁSSICO

Os diversos exemplos de introdução intencional de patógenos exóticos para o controle de plantas daninhas encontrados na literatura provêm uma idéia da importância desses organismos como agentes de biocontrole clássico. Alguns dos exemplos serão comentados a seguir.

### Controle de *C. juncea* por *P. chondrillina*

*P. chondrillina* Bubak and Syd., uma ferrugem autoécia macrocíclica foi introduzida na Austrália, em 1971, para controle da *C. juncea* L., uma espécie daninha acidentalmente introduzida naquele país, onde se tornou importante invasora em cultivos de trigo (TeBeest *et al.*, 1992). Estudos realizados na Europa mostraram ser o fungo constituído de estirpes que reagem diferentemente com três biotipos morfológicamente distintos da planta. Os testes de virulência e de especificidade realizados com um isolado italiano, envolvendo 56 espécies de plantas em 30 famílias botânicas, foram decisivos para a introdução do patógeno na Austrália (Hasan, 1972). Condições climáticas favoráveis, elevada densidade de plantas e alta virulência ao biotipo dominante da invasora (folha estreita) determinaram a rápida disseminação da ferrugem. Assim, após 12 gerações o fungo havia atingido uma distância de 320 km (Hasan, 1980).

Nos Estados Unidos, onde *C. juncea* infesta áreas montanhosas, ecologicamente diferentes das encontradas na Austrália ou nas regiões do Mediterrâneo, duas estirpes do fungo foram introduzidas. Nos dois anos que se seguiram, o fungo disseminou-se e causou severas infecções em várias populações da planta daninha nos estados da Califórnia e Oregon e, posteriormente, em todos os estados do Pacífico (TeBeest *et al.*, 1992). Entretanto, a variabilidade da planta é ainda incerta nos Estados Unidos (TeBeest *et al.*, 1992), embora tenham sido encontrados quatro padrões de virulência em sete populações do patógeno (Emge *et al.*, 1981). Esse fato, na medida em que inviabiliza a seleção dos isolados mais virulentos a cada biotipo da planta, impede que sejam atingidos em níveis mais adequados de controle.

## Controle de *Rubus constrictus* e *R. ulmifolius* por *Phragmidium violaceum*

*R. constrictus* Lefreve & Mueller e *R. ulmifolius* Schott são invasoras da família Rosaceae de origem européia, que se tornaram importantes no Chile e outras partes do mundo. A ferrugem *P. violaceum* (Schultz) Winter, encontrada causando severos danos a *R. ulmifolius*, foi introduzida no Chile com resultados encorajadores, controlando as duas espécies daninhas (Hasan, 1980). O ataque foi menos danoso em *R. ulmifolius*, mas nenhuma outra planta, além dessas duas, tem sido atacada pelo fungo na área de introdução. Os resultados obtidos no Chile têm motivado outros países, como a Austrália, a considerar a introdução de *P. violaceum*. Estudos vêm sendo conduzidos na França, com o fim de delimitar o círculo de hospedeiro do fungo, especialmente com relação às rosáceas existentes na Austrália (TeBeest *et al.*, 1992).

## Controle de *Ageratina riparia* por *Entyloma compositarum*

O exemplo a seguir ilustra a utilização de um fungo saprófita facultativo disseminado pelo vento, como agente de controle biológico clássico.

Em 1975, o fungo *Cercospora ageratinae* foi introduzido no Havaí, provavelmente da Jamaica em 1974, para o controle de *A. riparia*, séria invasora de florestas e áreas não-cultivadas. O fungo reduziu consideravelmente a densidade da planta daninha, nas áreas com 500 a 2.200 m de altitude (Schroeder, 1983).

Estudos de abrangência de hospedeiro, envolvendo 40 espécies pertencentes a 29 famílias botânicas, indicaram a especificidade do fungo para *A. riparia*. As liberações do fungo foram acompanhadas de novembro de 1975 a maio de 1976 e resultaram na devastação dessa invasora nas áreas em que as condições climáticas favoreceram o patógeno (TeBeest *et al.*, 1992).

Além desses exemplos, existem numerosos outros em que patógenos vêm sendo estudados para determinação do potencial na aplicação de controle biológico clássico de plantas daninhas. Embora os organismos exóticos venham recebendo maior atenção para a abordagem clássica, é amplamente aceito que parasitas obrigatórios endêmicos podem ser efetivos, como no caso de *P. canaliculata*, desde que a epidemiologia da doença seja mais claramente entendida. A incapacidade

dade de sobrevivência de uma estação a outra ou hospedeira alternativa não presente na área são limitações que podem ser superadas pela adoção da estratégia aumentativa (TeBeest, 1984).

## EXEMPLOS DE APLICAÇÃO DE FUNGOS COMO MICOHERBICIDAS

Dois micoherbicidas foram simultaneamente desenvolvidos nos Estados Unidos: DeVine<sup>®</sup> e Collego<sup>®</sup>, para controle de *Morrenia odorata* (H. & A) Lindl., em pomares cítricos na Flórida e *Aeschynomene virginica* (L) B.S.P., em arroz e soja em Arkansas, respectivamente (Charudattan, 1981; TeBeest & Templeton, 1985; Charudattan, 1985; Smith, 1986; Figueiredo, 1995).

DeVine<sup>®</sup>, registrado em 1981 e comercializado pela Abbott Inc., é uma formulação líquida de clamidiosporos de *Phytophthora palmivora* (Butler). É aplicado em pós-emergência no solo, em volta da planta, e infecta através das raízes. Chuva ou irrigação, antes e após o tratamento, são importantes para que a infecção se estabeleça. Foi observado nível de controle acima de 90%, que se estendeu por dois anos, com a persistência do fungo no solo (Ridings, 1986; Charudattan, 1991). Além de ser persistente no solo, esse micoherbicida é também inequivocamente inespecífico, infectando espécies nas famílias Solanaceae e Liliaceae, além de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *Poncirus trifoliata* L. (Sands & Miller, 1993). Embora diversas espécies de interesse econômico tenham se mostrado suscetíveis ao fungo, durante estudos de faixa de hospedeiros (Ridings, 1986), o registro do produto foi concedido para uso em áreas da Flórida onde ele já ocorria endemicamente (TeBeest *et al.*, 1992). Os argumentos técnicos para o registro basearam-se no fato de que a mortalidade de plantas somente ocorre quando as mesmas são diretamente expostas a altas dosagens do patógeno. Apesar do reduzido mercado e do uso praticamente restrito a áreas localizadas na Flórida, o produto representou a primeira introdução comercial de um herbicida microbiológico (Mitchell *et al.*, 1994).

Collego<sup>®</sup> é um herbicida microbiano constituído de esporos secos de *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* (Penz.) Penz & Sacc. Esse fungo, causador de antracnose em *A. virginica* foi registrado em 1982 e comercializado pela Ecogen Inc. (Charudattan, 1985). O

produto comercial consiste de uma formulação de esporos secos (15%) e ingredientes inertes (85%), acompanhado de um reidratante inerte. Ambos os componentes são embalados separadamente e misturados momentos antes da aplicação (TeBeest & Templeton, 1985; Boyette *et al.*, 1991). Testes de campo realizados em pequena escala revelaram controle próximo a 100%, quando aplicado sobre plântulas (Daniel *et al.*, 1973). O fungo não é tão específico como originalmente descrito, infectando, conforme se relatou, diversas espécies distribuídas em nove gêneros da família Leguminosae, subfamília Papilionoideae. Entretanto, sintomas severos, como morte de plântulas, foram verificados apenas em *A. virginica*. Nas demais espécies suscetíveis, os sintomas apresentaram intensidades variáveis, desde pequenas lesões necróticas não-esporulantes até lesões com vários centímetros de comprimento, esporulantes (TeBeest & Templeton, 1985; TeBeest, 1988; TeBeest *et al.*, 1992).

BioMall® é um micoherbicida à base de *C. gloeosporioides* f.sp. *malvae* desenvolvido pela PhilomBios Corp., no Canadá. O produto mostrou-se altamente eficiente para o controle da *Malva pusilla* Sm., uma espécie daninha de difícil controle por meio de herbicidas químicos (Charudattan, 1990b). O registro ocorreu em 1992 (Figueiredo, 1995).

CASST é um micoherbicida à base de *Alternaria cassiae*, Jurair & Khan, desenvolvido nos Estados Unidos pela Mycogen Corp. (Charudattan 1990b, Mitchell *et al.*, 1994). O fungo mostrou-se efetivo contra *Senna obtusifolia* (L.) Irwin & Barnaby em diversas condições ambientais (Walker, 1982; Walker & Boyette, 1986; Charudattan, 1986). Apresentou faixa restrita de hospedeiro sendo, entretanto, capaz de controlar outras duas espécies economicamente importantes, *Cassia occidentalis* L. e *Crotalaria spectabilis* Roth (Charudattan, 1990b).

*Colletotrichum orbiculare* (Berk et Mont.) v. Arx está sendo reavaliado como agente de controle biológico para *Xanthium spinosum* halst., na Austrália. Esse fungo foi previamente identificado como *C. xanthii* Halst. e avaliado em 1951 na abordagem clássica. Quando aplicado como bioherbicida, controlou 50 a 100% de plântulas (TeBeest *et al.*, 1992).

Vários outros fungos encontram-se em estudos como micoherbicidas, alguns já em fase de registro e outros sendo comercializados sem registro, como por exemplo *Cephalosporium diospyri*, fungo causador de murcha, usado contra *Diospyros virginica*, nos Estados Uni-

dos, e *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *cuscutae*, usado contra *Cuscuta* spp. sob o nome de LUBOA II, na cultura da soja, na China (TeBeest, 1984; Charudattan, 1990b; TeBeest *et al.*, 1992; Figueiredo, 1995).

Existem ainda inúmeros candidatos a micoherbicidas sendo testados para desenvolvimento comercial, que incluem *Cercospora rodmanii* para aguapé (*Eichhornia crassipes*) (Freeman & Charudattan, 1984; Charudattan *et al.*, 1985; Charudattan *et al.*, 1990); *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *jussiaeae* para *Jussiaea decurrens* (Boyette *et al.*, 1979), *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* para *Cucurbita texana* (Boyette *et al.*, 1984). No Brasil, estão sendo avaliados um isolado brasileiro de *A. cassiae* para *S. obtusifolia* (Figueiredo *et al.*, 1992) e *Cercospora* sp. para *Cyperus rotundus* (Figueiredo *et al.*, 1993), dentre outros.

## EPIDEMIOLOGIA DO CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS

O conhecimento dos fatores epidemiológicos e ecológicos requeridos pelos patógenos envolvidos desempenha papel-chave na determinação do sucesso de agentes de biocontrole, em qualquer das estratégias consideradas. Muitas das informações teóricas a respeito da dinâmica de patógenos no controle de plantas daninhas derivam da epidemiologia de doenças de culturas. Entretanto, a maior preocupação dos fitopatologistas tem sido a prevenção de doenças, enquanto o controle biológico de plantas daninhas requer indução de doenças (Shrum, 1982).

As regras que governam a sobrevivência, disseminação e desenvolvimento de patógenos de plantas não-cultivadas não são muito diferentes das regras estabelecidas para patógenos de plantas cultivadas. A maior diferença, sem dúvida, está na homogeneidade genética das plantas hospedeiras. Plantas não-cultivadas são geralmente mais diversas do que suas semelhantes cultivadas (TeBeest, 1991).

Com relação às plantas daninhas aquáticas, a epidemiologia de doenças fúngicas nas partes aéreas da vegetação emergente é similar à epidemiologia de plantas terrestres. Por outro lado, as informações disponíveis sobre patologia e epidemiologia afetando plantas submersas são muito limitadas, fazendo-se necessária a realização de pesquisas

para elucidar os possíveis mecanismos de controle microbiano para essas espécies (Charudattan, 1990a).

A variabilidade genética e a distribuição espacial das populações de plantas daninhas alvos são a chave dos fatores relacionados ao hospedeiro no desenvolvimento de doença (TeBeest, 1991). McDonald & Ayala (1974) sugeriram que existe relação entre níveis de variação genética e heterogeneidade ambiental. Burdon *et al.* (1980) relacionaram baixa taxa de recombinação com maior uniformidade genética e suscetibilidade a doenças. Burdon & Marshall (1981) demonstraram que espécies com reprodução assexuada foram controladas mais frequente e eficientemente do que as que se reproduzem sexualmente. Presumivelmente, o biocontrole é favorecido por uma baixa variação genética na população de plantas daninhas. Nesse caso, plantas aquáticas que se reproduzem por propagação clonal, como *E. crassipes*, *Elodea canadensis*, *Pistia stratiotes*, *Salvinia molesta*, *Hydrilla verticillata* e *Alternanthera philoxeroides*, seriam excelentes alvos para o controle biológico. Entretanto, é possível que a quantidade de variação genética não seja tão importante quanto a natureza da variação genética presente na população (Barrett, 1982).

O patógeno é o aspecto mais intensivamente estudado no complexo doença, abordando-se os seguintes aspectos: dispersão, sobrevivência, reprodução e virulência. Cada um desses aspectos difere em importância, dependendo da estratégia de biocontrole em consideração. Por exemplo, dispersão e sobrevivência são mais críticos para o controle clássico do que na estratégia do micoherbicida (TeBeest *et al.*, 1992).

A dispersão tem sido considerada um dos fatores mais importantes em ambas as estratégias, porém os mecanismos são diferentes em cada uma. Patógenos promovidos como agentes de biocontrole na estratégia clássica são tipicamente disseminados pelo ar, a exemplo de *P. canaliculata*, estudado no controle de tiririca amarela (Phatak *et al.*, 1983) e *P. chondrillina*, introduzido na Austrália para o controle de *C. juncea* (Hasan & Wapshere, 1973; Cullen *et al.*, 1973). Na estratégia inundativa, pelo contrário, os patógenos são geralmente disseminados através de chuvas de vento ou são patógenos de solo, invariavelmente apresentando limitada capacidade de dispersão, em ambos os casos. A matriz mucilaginosa dos conídios dispostos em acérvulos das várias espécies de *Colletotrichum*, por exemplo, requer suspensão em água

para dispersar-se pelo vento. Assim, a dispersão entre plantas, dependente de água livre, avança poucos metros por evento de chuva, enquanto na planta pode ser também acompanhada por gotas de água ou orvalho (Templeton & TeBeest, 1979; TeBeest, 1991; Yang & TeBeest, 1992).

A reduzida capacidade de sobrevivência de uma estação a outra de propágulos infectivos determina, em parte, os níveis relativamente baixos de doenças causadas por vários agentes de biocontrole. Por outro lado, a sobrevivência parece depender em grande parte da quantidade de inóculo e estruturas especializadas que cada patógeno possui. Patógenos com estruturas de frutificação, tais como teliósporos, oósporos, ascósporos ou escleródios, geralmente têm maior facilidade de sobrevivência (TeBeest, 1991).

A reprodução do patógeno tem implicações nas taxas de infecção secundária, durante a estação de crescimento da planta daninha hospedeira. Organismos de ciclo reprodutivo rápido garantem grandes populações em pouco tempo e podem ser agentes de controle efetivos, em condições favoráveis, superando a vantagem seletiva do rápido ciclo de vida das plantas daninhas (Shrum, 1982).

A virulência tem dois principais efeitos na população da hospedeira: aumentando a sua mortalidade ou diminuindo a sua reprodutividade. Patógenos usados como micoherbicidas geralmente aumentam a mortalidade, enquanto patógenos usados na estratégia clássica reduzem a taxa de reprodução (TeBeest *et al.*, 1992).

Fatores ambientais, como temperatura, umidade, luz, níveis nutricionais e pH, afetam diretamente as interações entre hospedeira e patógeno e a presença, ausência, quantidade e duração desses fatores podem atuar, promovendo ou prevenindo a infecção e o desenvolvimento de doenças. Indiretamente, condições ambientais podem alterar a resistência do hospedeiro, efeito referido como predisposição (Bell, 1982).

A eficiência do controle biológico de plantas daninhas inclui dois componentes. O primeiro é o estabelecimento da infecção primária pela aplicação do inóculo. O segundo é a infecção secundária pós-aplicação. Ambos são influenciados pelo ambiente (Yang & TeBeest, 1993).

Os efeitos de umidade e temperatura no número de infecções primárias têm sido relatados em muitos testes com micoherbicidas (TeBeest

*et al.*, 1978; Walker, 1981; TeBeest & Templeton, 1985; Makowski & Mortensen, 1990; Cartwright & Templeton, 1992; Yang & Jong, 1995). No decorrer do ciclo da cultura existe um número limitado de dias com condições climáticas ótimas para a infecção (Yang & TeBeest, 1993). Assim, a idade da planta hospedeira, na qual se torna mais suscetível, bem como as faixas de temperatura e tempo de molhamento mais favoráveis à germinação de esporos e estabelecimento de infecção, devem ser definidos para cada associação patógeno/hospedeira. Agentes de biocontrole bem sucedidos geralmente requerem períodos de umidade curtos e faixas de temperatura mais amplas para rápido desenvolvimento de doença. No caso do micoherbicida, pulverizações aquosas realizadas em épocas e horas adequadas, a possível oportunidade de uso de irrigação e a utilização de formulações apropriadas são meios para atenuar os efeitos adversos de umidade e temperatura (TeBeest, 1991).

A importância de infecções secundárias tem sido negligenciada na estratégia inundativa, em face dos micoherbicidas serem geralmente tratados como os herbicidas químicos. Entretanto, muitos patógenos estudados nessa estratégia de controle apresentam ciclos sucessivos de doença após aplicação, até que níveis epidêmicos letais sejam atingidos, evidenciando a importância deste componente epidemiológico como determinante do sucesso ou fracasso do patógeno em suprimir uma população de planta daninha. Quanto mais informações houver acerca dos fatores envolvidos (processo de infecção, período de incubação, esporulação e dispersão), melhores estratégias podem ser desenvolvidas para reduzir a dependência de eventos climáticos dos micoherbicidas (Yang & TeBeest, 1993).

As interações entre planta daninha hospedeira, patógeno e seu respectivo ambiente foram discutidas por Shrum (1982). A interação entre hospedeira e patógeno torna-se codependente, respondendo cada um deles ao ambiente pelos estímulos físicos que trocam entre si. Como a resposta é determinada pelo tamanho dos vários estímulos, a influência de qualquer atividade de manejo pode ser avaliada julgando sua contribuição aos vários aspectos do ambiente funcional de cada organismo. Pesquisas realizadas por Paul *et al.* (1993) em ecofisiologia de *S. vulgaris*, infectada por *P. lagenophorae* Cooke, revelaram o quanto os efeitos da infecção podem ser dependentes de fatores ambientais. Os danos causados pela ferrugem são maiores sob condições secas,

durante inverno rigoroso e pela competição entre plantas, mas são reduzidos pela deficiência de nutrientes.

## VARIAÇÃO GENÉTICA E SEUS EFEITOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS

A heterogeneidade genética permite a obtenção de cultivares resistentes a doenças e também de novas raças virulentas de patógenos. Essas características devem ser consideradas ao se utilizar fitopatógenos para o controle de plantas daninhas, em que a preocupação é promover epidemia (Leonard, 1982).

### Variação Genética em Plantas Invasoras

Embora espécies de plantas daninhas tenham evoluído independentemente em diversos grupos taxonômicos, elas compartilham frequentemente locais de adaptação similares ou história de vida (Barrett, 1982). Baker (1974) listou várias características comuns de plantas daninhas, entre as quais: dormência, germinação assincrônica, desenvolvimento rápido, plasticidade fenotípica, reprodução clonal, apomítica ou autógama, alta capacidade reprodutiva, sementes pequenas e de fácil dispersão, formação de raças fisiológicas e poliploidia.

A sobrevivência e a evolução de plantas daninhas vêm de longos anos. Muitas delas estão espalhadas e são bem sucedidas em diversas áreas agrícolas, onde ao longo do tempo evoluíram e desenvolveram características favoráveis à perpetuação em áreas perturbadas.

Certas técnicas agrícolas, introdução de novas culturas, alterações no uso de fertilizantes e/ou herbicidas e época de semeadura exercem pressão de seleção sobre as plantas daninhas. No caso do controle biológico, a pressão de seleção é bastante específica, por ser o agente de controle patogênico a uma espécie em particular (Huffaker, 1971). Algumas espécies são incapazes de adaptar-se e são substituídas por outras mais agressivas. Entretanto, se há variação genética apropriada, populações podem responder com o surgimento de formas adaptadas, como tem ocorrido com plantas daninhas submetidas à aplicação de herbicidas (Barrett, 1982). Gressel & Kleifeld (1994) relataram que plantas da espécie *Brachypodium distachyon*, que se tornaram resistentes a

s-triazinas, desenvolveram uma monocultura, deslocando as outras espécies que mais tarde também desenvolveram resistência ao herbicida e voltaram a competir. Resistência de plantas daninhas a s-triazinas (Atrazine e Simazina) foi também relatada para *Amaranthus retroflexus* (Radosevich, 1977), *Senecio vulgaris* (Holliday & Putwain, 1977) e *Senecio* spp. (Paul *et al.*, 1993).

Algumas plantas daninhas desenvolvem resistência a patógenos nativos, mas muitos patógenos têm potencial genético para ser tão bem sucedidos quanto os exóticos (Shrum, 1982). O desenvolvimento de resistência à doença, após liberação de patógenos ou repetidas aplicações de bioherbicidas é abordado por Barrett (1982). Resistência sistêmica induzida devido à infecção localizada em plantas de fedegoso (*S. obtusifolia*) pelo fungo *A. cassiae* foi verificada por Weete (1992).

Segundo Barrett (1982), variações adaptativamente importantes em plantas daninhas podem ser conseqüência de plasticidade fenotípica, mediante mudanças em fatores ambientais. Diferenciações genéticas dentro e entre espécies variam muito em plantas daninhas, gerando grupos diferenciados, que são taxonomicamente tratados como sub-espécies, variedades, ecotipos ou raças ecológicas. Exemplos específicos de formação de raças em plantas daninhas foram descritos em Holm *et al.* (1977).

## Variação Genética em Fungos Utilizados como Agentes de Biocontrole

Fitopatógenos podem apresentar diferentes graus de especificidade. Alguns organismos são patogênicos a uma ampla faixa de hospedeiras, enquanto outros são limitados a certas espécies (Tepper & Anderson, 1984). Isolados de uma mesma espécie patogênica que diferem quanto à infectividade a espécies hospedeiras, são usualmente designadas de *formae speciales* (f.sp.) (Bell, 1982). Raça fisiológica refere-se a isolados apresentando interação diferenciada com variedades da hospedeira.

Variabilidade, devido à heterogeneidade genética, ocorrendo naturalmente ou em conseqüência de trocas de material genético no meio ambiente, é uma preocupação quando se deseja implementar um programa de controle biológico. Portanto, é de extrema importância a seleção para introdução de raças geneticamente estáveis de patógenos exóticos específicos. No caso de organismos endêmicos, usados na

estratégia inundativa, é aceitável um menor rigor quanto à especificidade (Leonard, 1982; Watson, 1985), embora seja recomendada a avaliação da segurança de cada isolado selecionado (Charudattan, 1990c).

Diferentes reações em espécies hospedeiras a isolados de *P. xanthi*, em várias regiões do mundo, sugerem a existência de variabilidade genética na população dessa ferrugem (Morin *et al.*, 1993a). Um isolado do fungo foi denominado *Puccinia xanthi* sp. *trifidae*, nos Estados Unidos, com base na capacidade de infectar somente *Ambrosia trifida* (Batra, 1981). Reação diferencial de isolados do fungo *P. chondrillina*, em relação a biotipos de *C. juncea*, foi também demonstrada. Três tipos morfológicamente distintos da planta daninha ocorrem na Austrália, mas apenas o mais comum se mostrou suscetível ao isolado introduzido (Hasan, 1972; Bruckart & Peterson, 1991).

A estabilidade genética de fungos usados como agentes de biocontrole de plantas daninhas pode ser verificada através de evidências históricas e por meio de dados experimentais (Charudattan, 1990c). *Cercospora rodmanii*, *Entyloma compositarum*, *Puccinia chondrillina* e *C. gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene*, entre outros, permaneceram geneticamente estáveis, após vários anos de uso no campo (TeBeest & Templeton, 1985; Trujillo, 1985). Também não há relatos de pesquisa, sugerindo o aparecimento de novas variantes desses patógenos.

## Benefícios e Prejuízos da Variação Genética

O risco do uso de fitopatógenos para controle de plantas daninhas deve ser muito bem avaliado para qualquer das estratégias de biocontrole. Na estratégia clássica, o patógeno utilizado, além de altamente virulento, capaz de multiplicar-se e dispersar, é importado de outra região e liberado em ecossistemas, que possivelmente não possuem mecanismos de controle da população, produzindo assim epidemia e redução da espécie daninha alvo (Leonard, 1982). Na estratégia inundativa, bioherbicidas são aplicados em altas doses em populações jovens de plantas daninhas, ocorrendo em áreas cultivadas. Nesse caso, podem ser usados patógenos endêmicos, que não sejam necessariamente capazes de devastar populações de hospedeiras, sob condições naturais (Leonard, 1982). É importante, no entanto, que o patógeno apresente características que propiciem a produção de inóculo viável e suficiente para controle da espécie-alvo.

Antes da liberação de um patógeno exótico, uma rigorosa avaliação de sua especificidade deve ser feita, tanto em relação a plantas cultivadas como nativas. De acordo com Leonard (1982), entre os fungos parasitas obrigatórios, o caso de *P. chondrillina*, uma ferrugem importada da Itália para controlar *C. juncea* na Austrália, mostrou que ocorre variabilidade genética tanto na planta como no patógeno. Extensivas coletas do fungo, na área do Mediterrâneo, foram feitas até ser encontrado um isolado altamente virulento para a forma da planta mais comum na Austrália. Em fitopatógenos parasitas não-obrigatórios a adaptação a novos hospedeiros pode ocorrer mais prontamente, não sendo aconselhável a introdução de patógenos de baixa virulência ou parasitas facultativos para o controle clássico, sem extensivos testes de especificidade e do potencial de adaptação do agente a novos hospedeiros.

Os riscos do controle biológico clássico podem ser evitados através do controle inundativo, uma vez que são utilizados patógenos já endêmicos na área, aplicados em altas doses na estação de cultivo para produção de epidemia local, quando as plantas daninhas ainda não estão maduras. Os efeitos serão restritos à área onde o agente de controle foi aplicado, se organismos de limitado potencial de dispersão e sobrevivência forem utilizados, reduzindo o impacto em plantas não-alvo. Assim, os riscos dos bioherbicidas podem derivar mais da duração e intensidade de inoculação do que de variações genéticas do patógeno. As mutações que poderão ocorrer no inóculo de um herbicida biológico, provavelmente, não serão diferentes das que ocorrem naturalmente na população do patógeno. Além disso, a seleção natural do patógeno a uma espécie de planta não-alvo é limitada, porque o inóculo terá a mesma origem. Dessa forma, os riscos de bioherbicidas são provavelmente provenientes de disseminação mais abrangente, que podem levar o produto a regiões onde o patógeno não ocorre naturalmente (Leonard, 1982).

A existência de variação genética em populações de patógenos permite a seleção de isolados mais virulentos, através de recombinação dos genes existentes. Na estratégia clássica a vantagem principal da heterogeneidade, havendo extensa área geográfica de ocorrência do patógeno, é ser maior a possibilidade de existência de diferentes populações do patógeno adaptadas a várias condições ambientais (Leonard, 1982).

No caso dos bioherbicidas, o organismo pode ser melhorado e adaptado para propósitos especiais, sem se preocupar com sua sobrevivência em ecossistemas naturais. Um problema que pode ocorrer é a resistência de plantas daninhas pela seleção natural. Entretanto, isso pode ser solucionado pelo aumento da dosagem aplicada ou pela seleção de isolado, periodicamente, para aumento da virulência, na população da invasora-alvo (Leonard, 1982).

## INTEGRAÇÃO COM OUTROS MÉTODOS DE CONTROLE

A integração do controle biológico a sistemas de manejo de plantas daninhas foi discutida por Smith Jr. (1982); Charudattan (1985); Phatak *et al.* (1987); Charudattan & DeLoach Jr. (1988); Watson & Wymore (1990); Hasan & Ayres (1990); Charudattan (1990); Morin *et al.* (1993b); Charudattan (1993b) e Figueiredo (1995).

O uso de fungos endêmicos como micoherbicidas pode ser integrado com outros métodos de controle de plantas daninhas, em áreas agrícolas onde se desenvolve um complexo de espécies (Boyette *et al.*, 1979; Smith Jr., 1982; Watson & Wymore, 1990).

Dois ou mais bioherbicidas podem ser combinados como misturas em tanques ou usados seqüencialmente para controle de várias espécies daninhas, superando o problema da especificidade de hospedeiro. *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* e *C. gloeosporioides* f.sp. *jussiaeae*, para controle de *A. virginica* e *Jussiae decurrens* em cultura de arroz e *C. gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* e *C. malvarum* para controle de *A. virginica* e *Sida spinosa*, em cultura de soja, foram usados com sucesso em combinação ou seqüencialmente (Boyette *et al.*, 1979; Smith Jr., 1982; Watson & Wymore, 1990).

Forte efeito sinérgico foi observado quando *Puccinia xanthii* e *C. orbiculare* foram aplicados, seqüencialmente, para controle de *X. spinosum*, resultando em severos sintomas que levaram as plantas à morte (Morin *et al.*, 1993b). Também a interação entre *P. lagenophorae* e patógenos secundários em plantas de *S. vulgaris* foi considerada por Paul *et al.* (1993). Os danos causados pela ferrugem são intensificados pela infecção secundária das pústulas por fungos necrotróficos, que podem matar a planta, reduzindo a dose efetiva de inóculo dos fungos envolvidos.

A integração de uso de herbicidas químicos e fitopatógenos no controle de plantas daninhas pode ter efeitos sinérgicos ou antagônicos. Produtos químicos podem interferir com a infecção e o desenvolvimento de doença, alterando o sítio de infecção, fisiologia e sistema de defesa do hospedeiro, propágulos do patógeno e aumentando a colonização do hospedeiro pelo patógeno, mas alguns podem apresentar incompatibilidade com agentes de controle biológico de plantas daninhas (Charudattan, 1993b). O autor destaca que mais fungicidas do que inseticidas ou herbicidas apresentam problemas, quando em uso combinado com fungos, devendo as associações serem analisadas caso a caso. Entretanto, ele enumera muitos exemplos práticos e experimentais, e afirma que os mesmos demonstram a possibilidade de sucesso do uso integrado de pesticidas químicos e agentes de biocontrole, na obtenção de maior eficácia e espectro de controle, redução da necessidade de herbicidas e melhoramento do sistema de manejo integrado de pragas. O uso de fungicida e inseticida reduziu a ação de *C. gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene*, devendo-se ajustar a seqüência de aplicação de defensivos, para que não ocorra interferência na ação do patógeno (Smith Jr., 1982; Watson & Wymore, 1990). Charudattan (1993b) salienta a necessidade de entender as interações que ocorrem entre pesticidas químicos e agentes de biocontrole, para evitar falhas e melhorar a efetividade destes últimos.

Holmström-Ruddick & Mortensen (1995) avaliaram os efeitos da aplicação de *C. gloeosporioides* f.sp. *malvae* no controle de *M. pusilla*, em combinação com benomil, utilizando uma estirpe resistente ao fungicida. Eles verificaram que a aplicação prévia ou simultânea do benomil causava decréscimo de infecção, enquanto em pós-inoculação, 24 horas após o patógeno, nenhum efeito foi observado.

O controle de aguapé (*E. crassipes*) tem sido obtido, nos Estados Unidos, com a integração de *C. rodmanii*, insetos e herbicidas (Charudattan, 1986). Testes conduzidos mostraram que o patógeno ou insetos, isoladamente, não controlaram completamente o aguapé, tendo o uso associado dos agentes afetado as plantas mais severamente, levando-as à morte 6 meses após a primeira aplicação. Os ferimentos causados pelos insetos facilitavam a infecção pelo fungo. Combinações do patógeno e baixas taxas de herbicidas apresentaram possibilidade de seu uso em condições de campo, particularmente a seqüência patógeno-2,4-D, que causou danos de 49%, aos 49 dias após aplicação

do patógeno. No entanto, o uso de herbicidas não deve impedir a infecção pelo patógeno pela destruição da área foliar da planta, ou interferindo na suscetibilidade do hospedeiro ou virulência do patógeno.

De acordo com Paul *et al.* (1993), o entendimento das interações entre plantas daninhas, patógenos e o ambiente é muito limitado para oferecer qualquer retorno rápido. Segundo esses autores, tais interações serão melhor exploradas em estratégias de controle baseadas no manejo de populações do que naquelas em que ocorre completa eliminação das plantas daninhas.

## CONFLITOS NO USO DE FITOPATÓGENOS PARA CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS

O uso de fitopatógenos no controle de plantas daninhas traz benefícios, mas requer precauções. Quimby Jr. (1982) discute algumas epidemias historicamente significantes e os fatores que aparentemente favoreceram a sua ocorrência, visando prover informações sobre a capacidade de os fitopatógenos alterarem populações de plantas e dar suporte à necessidade de cuidados na aplicação do controle biológico de plantas daninhas. Na maioria dos casos das epidemias discutidas houve interferência do homem na introdução do patógeno ou do hospedeiro em novos locais, onde a ocorrência de doença em grande escala foi propiciada.

A requeima da batata, causada por *Phytophthora infestans*, se espalhou na maioria das áreas cultivadas com essa Solanaceae no mundo e, ainda hoje, apesar dos métodos de controle disponíveis, apresenta grande importância. A ferrugem do café, causada por *Hemileia vastatrix*, teve origem na África e tem tido profundo efeito sobre a cultura humana, tendo se espalhado rapidamente na América do Sul. *Endothia parasitica*, agente da queima em *Castanea dentata*, teve origem na China e levou à extinção a espécie que era dominante em grandes áreas de florestas na América do Norte. *Ceratocystis ulmi*, que causa a doença do olmo holandês, foi descoberto em 1930 nos Estados Unidos e disseminado para Europa, China e América, causando grandes prejuízos. *Phytophthora cinnamomi* é aparentemente o agente causal de *Jarrah dieback* em *Eucalyptus marginata* na Austrália, que foi registrado pela primeira vez em 1928, e afeta plantas de várias

famílias na floresta Jarrah, tendo causado destruição da comunidade. A substituição da vegetação pode incluir espécies menos desejáveis de *Eucalyptus*. Além disso, o patógeno infecta mais de 190 espécies de plantas e causa muitas doenças em todo o mundo. *Botryosphaeria tamaricis* causou destruição em plantios de *Tamarix* na faixa de 1,5-2 anos de idade na Argentina. O patógeno tem sido apontado como um fungo a ser manipulado para controle de espécies desse gênero, que foram introduzidas nos Estados Unidos e causaram deslocamento da flora nativa.

O uso de fitopatógenos para o controle de plantas daninhas, embora possa ser considerado seguro com base nas experiências passadas, ainda está sujeito a debate. Especula-se que, como em qualquer sistema biológico, organismos exógenos liberados no ambiente podem alterar drasticamente o equilíbrio do ecossistema (Freeman & Charudattan, 1995).

Vários agentes de biocontrole foram incluídos em um programa de controle de *C. juncea*, na Austrália, tendo sido destacado o impacto de *P. chondrillina*, que se espalhou e causou epidemia rapidamente (Cullen *et al.*, 1973). O sucesso no estabelecimento do fungo causou redução na densidade do biotipo da invasora predominante à época da liberação, acompanhado de um aumento na densidade de dois outros biotipos, menos suscetíveis ao patógeno (Cullen, 1978; Wapshere, 1978; Freeman & Charudattan, 1985). Essa mudança na distribuição, frequência e abundância das três formas de *C. juncea* no sudeste da Austrália foi documentada para o período de 1968-1980, por Burdon *et al.* (1981). *Puccinia chondrillina* causou redução da habilidade de competição da forma mais abundante e expansão das formas menos competitivas.

Um conflito de interesses pode originar-se quando uma planta daninha alvo é considerada útil em alguma situação ou para determinado segmento da sociedade (Julien, 1989). Os conflitos podem ser classificados em três categorias: econômicos, ecológicos e estéticos (Andres, 1981).

A solução de conflitos de natureza econômica ou estética cabe aos governantes. Entretanto, é indispensável a cooperação dos pesquisadores para a solução de conflitos ecológicos, tais como os referentes a possíveis danos a plantas nativas relacionadas à espécie-alvo, principalmente espécies raras. Os pesquisadores responsáveis por tais proje-

tos devem, juntamente com ecologistas e taxonomistas, analisar criteriosamente as conseqüências da abundância e disseminação da planta daninha e os efeitos das aplicações de herbicidas químicos em larga escala sobre a diversidade da flora nativa, considerando-se a possibilidade de que o organismo de controle biológico possa ocasionalmente atacar plantas nativas (Schroeder, 1983).

Segundo Freeman & Charudattan (1985), duas são as abordagens para minimizar a possibilidade de conflitos na utilização de patógenos exóticos, cada uma apresentando limitações. O enfoque da Austrália tem sido direcionado para determinação da faixa de hospedeiro e potencial de biocontrole do organismo no seu centro de origem. Essa abordagem é a mais econômica, mas pode não possibilitar a realização dos testes com as espécies, biotipos e variedades da espécie hospedeira ocorrendo na área onde o organismo será utilizado. Nos Estados Unidos, o patógeno é introduzido em quarentena, onde são avaliados sua especificidade e seu potencial de biocontrole. O método facilita a realização dos testes com plantas nativas para a área-alvo, mas apresenta a desvantagem de possibilitar escapes de organismos, devido a erro humano ou instalações danificadas.

A aplicação do controle biológico inundativo, utilizando-se patógenos endêmicos, alternativamente ao controle biológico clássico, reduz o impacto em plantas não-alvo, pois os efeitos se restringem à área onde o agente de controle foi aplicado. Entretanto, permanece o risco decorrente da pressão de seleção exercida pelo elevado número de propágulos liberados no ambiente, embora a experiência com o uso de micoherbicidas indique que as possibilidades de aparecimento de mutantes com patogenicidade e gama de hospedeiras alteradas sejam raras (Freeman & Charudattan, 1985).

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

As estratégias de controle biológico de plantas daninhas, através de fitopatógenos, diferem basicamente quanto à resposta ecológica, e são utilizadas de acordo com cada situação particular. Ambas as estratégias exigem avaliação prévia cuidadosa do impacto sobre plantas não-alvo, representando o controle clássico um enfoque mais ecológico do uso dos agentes de biocontrole.

Em geral, o controle clássico de plantas daninhas com patógenos exóticos é considerado mais adequado para espécies perenes introduzidas em áreas extensas e pouco perturbadas, como pastagens e florestas, e em ambientes aquáticos, onde o emprego de herbicidas seria difícil, antieconômico ou causaria prejuízo ao meio ambiente. Entretanto, o controle de *C. juncea* em campos de trigo na Austrália mediante a liberação de *P. chondrillina* é um exemplo de utilização bem sucedida desse método em culturas anuais. A importação de estirpes de patógenos de espécies hospedeiras botanicamente relacionadas e ecologicamente homólogas à espécie-alvo pode ser considerada, na inexistência de inimigos naturais associados à planta-alvo no seu centro de origem.

A estratégia inundativa pode ser utilizada com patógenos tanto exóticos como nativos endêmicos. Estes últimos têm sido os mais utilizados até o momento. A estratégia enfatiza a manipulação dos patógenos e sua utilização de modo semelhante aos herbicidas químicos, envolvendo fortemente o aspecto comercial.

O uso de patógenos de plantas daninhas associados a outras práticas de controle permite ao agricultor reduzir as perdas de produção e ao mesmo tempo minimizar os danos causados ao meio ambiente.

O sucesso do controle biológico depende em grande parte do entendimento dos componentes epidemiológicos envolvidos, embora os mecanismos de cada um desses componentes sejam diferentes para cada uma das estratégias. Quanto mais informações existirem acerca das interações entre patógeno, hospedeiro e meio-ambiente, maiores serão as oportunidades de utilização adequada desse método de controle.

## AGRADECIMENTOS

Às pesquisadoras Eliana Gouveia Fontes, do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, e Alice Maria Quezado-Soares, do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, pela revisão do texto e sugestões.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRES, L.A.; DAVIS, C.J.; HARRIS, P., WAPSHERE, A.J. Biological control of weeds. In: HUFFAKER, C.B. **Theory and practice of biological control**. New York: Academic Press, 1976. p.481-499.
- ANDRES, L. Conflicting interests in the biological control of weeds. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS, 5., 1980, Brisbane. **Proceedings**. Melbourne: CSIRO, 1981. p.11-20.
- BAKER, H.G. The evolution of weeds. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.5, p.1-24, 1974.
- BARRETT, S.C.H. Genetic variation on weeds. In: CHARUDATTAN, R.; WALKER, H.L. ed. **Biological control of weeds with plant pathogens**. New York: John Wiley & Sons, 1982. p.73-98.
- BATRA, S.W.T. *Puccinia xanthii* forma specialis *ambrosia-trifidae*; a microcyclic rust for the biological control of giant ragweed, *Ambrosia trifida* (Compositae). **Mycopathologia**, v.73, p.61-64, 1981.
- BELL, A.A. Plant pest interaction with environmental stress and breeding for pest resistance. In: CRISTIANSEN, M.N.; SEWIS, C.F. **Breeding plants for less favorable environments**. [s.l.], [s.n.], 1982. p.335-353.
- BOYETTE, C.D.; QUIMBY JR., P.C.; CONNICK JR.; W.J., DAIGLE, D.J.; FULGHAM, F.E. Progress in the production, formulation and application of mycoherbicides. In: TEBEEST, D.O. ed. **Microbial control of weeds**. New York: Chapman & Hall, 1991. p.209-222.
- BOYETTE, C.D.; TEMPLETON, G.E.; OLIVER, L.R. Texas gourd (*Cucurbita texana*) control with *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae*. **Weed Science**, v.32, n.5, p.649-655, 1984.
- BOYETTE, C.D.; TEMPLETON, G.E.; SMITH JR., R.J. Control of winged waterprimrose (*Jussiaea decurrens*) and northern jointvetch (*Aeschynomene virginica*) with fungal pathogens. **Weed Science**, v.27, n.5, p.497-501, 1979.
- BURDON, J.J.; MARSHALL, D.R. Biological control and reproductive mode of weeds. **Journal of Applied Ecology**, v.18, p.649-658, 1981.
- BURDON, J.J.; ROELFS, A.P. Isozyme and virulence variation in asexually reproducing populations of *Puccinia graminis* and *P. recondita* on wheat. **Phytopathology**, v.75, n.8, p.907-13, 1985.
- BURDON, J.J.; GROVES, R.H.; CULLEN, J.M. The impact of biological control on the distribution and abundance of *Chondrilla juncea* in south-eastern Australia. **Journal of Applied Ecology**, v.18, p.957-966, 1981.
- BURDON, J.J.; MARSHALL, D.R.; GROVES, R.H. Aspects of weed biology important to biological control. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS, 5., Canberra, 1980. **Proceedings**. Melbourne: CSIRO, 1981. p.21-29.
- CARTWRIGHT, D.K.; TEMPLETON, G.E. Preliminary assessment of *Colletotrichum capsicii* as a potential mycoherbicide for control of pitted morningglory. **Plant Disease**, v.76, n.10, p.995-998, 1992.
- CHARUDATTAN, R. The mycoherbicide approach with plant pathogens. In: TEBEEST, D.O. ed. **Microbial control of weeds**. New York: Chapman and Hall, 1991. p.24-57.
- CHARUDATTAN, R.; DELOACH JR., J. Management of pathogens and insects for weed control in agroecosystems. In: ALTIERI, M.A.; LIEBMAN, M. eds. **Weed management in agroecosystems: ecological approaches**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.245-264.
- CHARUDATTAN, R. Biological control of aquatic weeds by means of fungi. In: PIETERSE, A.H.; MURPHY, K.J. ed. **Aquatic weeds: the ecology and management of nuisance aquatic vegetation**. New York: Oxford University Press, 1990a. p.186-201.
- CHARUDATTAN, R. Biological control of weeds: an international overview. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., Foz do Iguaçu, PR, 1996. **Anais**. Curitiba: PJ Comunicação & Eventos Editora, 1996. p.270-282.
- CHARUDATTAN, R. **Controle biológico de plantas daninhas através de fitopatógenos**. Jaboticabal: UNESP-FCAVJ, 1993a. 34p.
- CHARUDATTAN, R. Integrated control of waterhyacinth (*Eichhornia crassipes*) with a pathogen, insects, and herbicides. **Weed Science**, v.34, suppl.1, p.26-30, 1986.
- CHARUDATTAN, R. Inundative control of weeds with indigenous fungal pathogens. In: BURGE, M.N. ed. **Fungi in biological control systems**. New York: Manchester University Press, 1988. 254p.
- CHARUDATTAN, R. Pathogens with potential for weed control. In: HOAGLAND, R.E. ed. **Microbes and microbial products as herbicides**. Washington, DC: American Chemical Society, 1990b. p.132-154.
- CHARUDATTAN, R. Release of fungi: Large-scale use of fungi as biological weed control agents. In: MAROIS, J.J.; BRUENING, G. **Risk assessment in agricultural biotechnology** proceedings of the international conference. Oakland: University of California, 1990c. p.70-84. (University of California Publication, 1928).
- CHARUDATTAN, R. The role of pesticides in altering biocontrol efficacy. In: ALTMAN, J. ed. **Pesticide interactions in crop production: beneficial and deleterious effects**. Boca Raton: CRC Press, 1993b, p.421-432.
- CHARUDATTAN, R. The use of natural and genetically altered strains of pathogens for weed control. In: HOY, A.M.; DONALD, C. ed. **Biological control in agricultural IPM systems**. Orlando: Academic Press, 1985, p.347-372.
- CHARUDATTAN, R.; WALKER, H.L.; BOYETTE, C.D.; RIDINGS, W.H.; TEBEEST, D.O.; VAN DYKE, C.G.; WORSHAM, A.D. Evaluation of *Alternaria cassiae* as a mycoherbicide for sicklepod (*Cassia obtusifolia*) in regional field tests. Auburn: Agricultural Experiment Station, 1986. (Southern Cooperative Series Bulletin, 317).
- CHARUDATTAN, R.; DEVALERIO, J.T.; PRANGE, V.J. Special problems associated with aquatic weed control. In: **New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases**. (s.l.): A.R. Liss, 1990, p.287-303.
- CHARUDATTAN, R.; LINDA, S.B.; KLUEPFEL, M.; OSMAN, Y.A. Biocontrol Efficacy of *Cercospora rodmanii* on waterhyacinth. **Phytopathology**, v.75, n.11, p.263-269, 1985.

- CULLEN, J.M. Evaluating the success of the programme for biological control of *Chondrilla juncea* L. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS, 4., Gainesville, 1976. **Proceedings**, Gainesville, 1978. p.117-121.
- CULLEN, J.M.; KABLE, P.F.; CATT, M. Epidemic spread of rust imported for biological control. **Nature**, v.244, p.462-464, 1973.
- DANIEL, J.T.; TEMPLETON, G.E.; SMITH JR., R.J.; FOX, W.T. Biological control of northern jointvetch in rice with an endemic fungal disease. **Weed Science**, v.21, n.4, p.303-307, 1973.
- EMGE, R.G.; MELCHING, J.S.; KINGSOLVER, C.H. Epidemiology of *Puccinia chondrillina*, a rust pathogen for the biological control of rush skeleton weed in the United States. **Phytopathology**, v.71, n.8, p.839-843, 1981.
- EVANS, H.C. Fungal pathogens of some subtropical and tropical weeds and the possibilities and tropical weeds and the possibilities for biological control. **Biocontrol News and Information**, v.8, n.1, p.7-30, 1987.
- FIGUEIREDO, G.de; FONTES, E.G.; TEIXEIRA, C.A.D.; PAIS, J.S.O. Levantamento e seleção de patógenos para o controle biológico de fedegoso (*Senna obtusifolia*, Leguminosae). **Fitopatologia brasileira**, v.17, n.2, p.169, 1992. (Resumo).
- FIGUEIREDO, G.de; FONTES, E.G.; PAIS, J.S.O.; LOBÃO, A.; ANDRADE, R.M.A. Avaliação preliminar do potencial de *Cercospora* sp. como agente de controle biológico da tiririca roxa (*Cyperus rotundus*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 19., Londrina, PR, 1993. **Anais**. Londrina: SBHD, 1993. p.18-20.
- FIGUEIREDO, G.de. Herbicidas microbiológicos empregados no controle de plantas daninhas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.3, p.111-132, 1995.
- FREEMAN, T.E.; CHARUDATTAN, R. *Cercospora rodmanii* Conway a biological agent for waterhyacinth. Gainesville: Agricultural Experimental Station, 1984. 18p. (Bulletin 842).
- FREEMAN, T.E.; CHARUDATTAN, R. Conflicts in the use of planta pathogens as biocontrol agents for weeds. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS, Vancouver, Canada, 1984. **Proceedings** Ottawa: Agriculture of Canada, 1985. p.351-357.
- GAZZIERO, D.L.P.; YORINORI, J.T. Experiência sobre controle biológico de *Euphorbia heterophylla* no Brasil. Jaboticabal: UNESP/FCAVJ, 1993, 11p.
- GRESSEL, J.; KLEIFELD, Y. Can wild species become problem weeds because of herbicide resistance? *Brachypodium distachyon*: a case study. **Crop Protection**, v.13, n.8, p.563-566, 1994.
- HARLEY, K.L.S.; FORNO, I.W. Biological Control of weeds. Brisbane: Inkata Press, 1992, 74p.
- HARRIS, P.; CRANSTON, R. An economic evaluation of control methods for diffuse and spotted knapweed in western Canada. **Canadian Journal of Plant Science**, v.59, n.2, p.375-382, 1979.
- HARRIS, P. Current approaches to biological control of weeds. Wallingford: CAB - Institute of Biological Control, 1971, p.69-76. (Technical Communication, 4.)
- HASAN, S.; AYRES, P.G. The control of weeds through Fungi Principles and Prospects. **New Phytologist**, v.115, n.23, p.201-222, 1990.
- HASAN, S.; WAPSHERE, A.J. The biology of *Puccinia chondrillina* a potential biological control agent of skeleton weed. **Annals of Applied Biology**, v.74, p.325-332, 1973.
- HASAN, S.; WAPSHERE, A.J. The biology of *Puccinia chondrillina* a potential biological control agent of skeleton weed. **Annals of applied Biology**, v.74, p.325-332, 1973.
- HASAN, S. Plant pathogens and biological control of weeds. **Review of Plant Pathology**, v.59, n.8, p.349-356, 1980.
- HASAN, S. Specificity and host socialization of *Puccinia chondrillina*. **Annals of Applied Biology**, v.72, p.257-263, 1972.
- HOLLIDAY, R.J.; PUTWAIN, P.D. Evolution of resistance to simazine in *Senecio vulgaris* L. **Weed Research**, v.17, p.291-296, 1977.
- HOLM, L.G.; PLUCKNETT, D.L.; PANCHO, J.V.; HERBERGER, H.P. The world's worst weeds: distribution and biology. Honolulu: The University Press of Hawaii, 1977. 609p.
- HOLMSTRÖM-RUDDICK, B.; MORTENSEN, K. Factors affecting pathogenicity of a benomyl-resistant strain of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae*. **Mycology Research**, v.99, n.9, p.1108-1112, 1995.
- HUFFAKER, C.B. **Biological control**. New York: Plenum Press, 1971. 511p
- JULIEN, M.H. Biological control of weeds worldwide: trends, rates of success and the future. **Biocontrol News and Information**, v.10, n.4, p.299-306, 1989.
- LEONARD, K.J. The benefits and potential hazards of genetic heterogeneity in plant pathogens. In: CHARUDATTAN, R.; WALKER, H.L. ed. Biological control of weeds with plant pathogens. New York, John Wiley & Sons, 1982. 293p.
- MAKOWSKI, R.M.D.; MORTENSEN, K. *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* as a bioherbicide for round-leaved mallow (*Malva pusilla*): Conditions for successful control in the field. pp.513-522. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS, 7., Rome, 1988. **Proceedings**. Rome, 1990, p.513-522.
- MCDONALD, J.F.; AYALA, F.J. Genetic response to environmental heterogeneity. **Nature**, v.250, p.572-574, 1974.
- MITCHELL, D.J.; MARTIN, F.N.; CHARUDATTAN, R. Biological control of plant pathogens and weeds in Florida. In: ROSEN, D.; BENNETT, F.D.; CAPINEIRA, J.L. ed.. **Pest Management in the subtropics: biological control - a Florida perspective**. Andover: Intercept, 1994.
- MORIN, L.; AULD, B.A.; BROWN, J.F. Host range of *Puccinia xanthii* and postpenetration development on *Xanthium occidentale*. **Canadian Journal of Botany**, v.71, p.959-965, 1993a.
- MORIN, L.; AULD, B.A.; BROWN, J.F. Synergy between *Puccinia xanthii* and *Colletotrichum orbiculare* on *Xanthium occidentale*. **Biological Control**, v.3, p.296-310, 1993b.
- MORTENSEN, K. Biological control of weeds with plant pathogens. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.8, p.229-231, 1986.

- PAUL, N.D.; AYRES, P.G. Effects of rust infection of *Senecio vulgaris* on competition with lettuce. **Weed Research**, v.37, p.431-441, 1987.
- PAUL, N.D.; AYRES, P.G.; HALLETT, S.G. Mycoherbicides and other biocontrol agents for *Senecio* spp. **Pesticide Science**, v.37, p.323-329, 1993.
- PHATAK, S.C.; SUMMER, D.R.; WELLS, H.D.; BELL, D.K.; GLAZE, N.C. Biological control of yellow nutsedge with the indigenous rust fungus *Puccinia canaliculata*. **Science**, v.219, p.1446-1447, 1983.
- PHATAK, S.C.; CALLAWAY, M.B.; VAVRINA, C.S. Biological control and its integration in weed management system for purple and yellow nutsedge (*Cyperus rotundus* e *C. esculentus*). **Weed Technology**, v.1, p.84-91, 1987.
- QUIMBY JR., P.C. Impact of diseases on plant populations. In: CHARUDATTAN, R.; WALKER, H.L., ed. **Biological control of weeds with plant pathogens**. New York: John Wiley & Sons, 1982, p.47-60.
- RADOSEVICH, S.R. Mechanism of atrazine resistance in lambsquarters and pigweed. **Weed Science**, v.25, p.316-318, 1977.
- RIDINGS, W.H. Biological control of strangler vine in citrus - a researcher's view. **Weed Science**, v.34, suppl.1, p.31-32, 1986.
- SANDS, D.C.; MILLER, V. Evolving strategies for biological control of weeds with plant pathogens. **Pesticide Science**, v.37, p.399-403, 1993.
- SCHROEDER, D. Biological control of weeds. In: FLETCHER, W.W. ed. **Recent advances in weed research**. Kew: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1983. p.41-78.
- SCHROEDER, D. Biological control of weeds: a review of principles and trends. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, p.191-212, 1992.
- SHRUM, R.D. Creating epiphytotics. In: CHARUDATTAN, R.; WALKER, H.L. ed. **Biological control of weeds with plant pathogens**. New York: John Wiley & Sons, 1982. p.113-136.
- SMITH JR., R.J. Integration of microbial herbicides with existing pest management programs. In: CHARUDATTAN, R.; WALKER, H.L. ed. **Biological control of weeds with plant pathogens**. New York: John Wiley & Sons, 1982. p.189-203.
- SMITH JR., R.J. Biological control of northern jointvetch (*Aeschynomene virginica*) in rice (*Oryza sativa*) and soybean (*Glycine max*) - a researcher's view. **Weed Science**, v.34, suppl.1, p.17-23, 1986.
- TEBEEST, D.O.; TEMPLETON, G.E. Mycoherbicides: progress in biological control of weeds. **Plant Disease**, v.69, p.6-10, 1985.
- TEBEEST, D.O. Additions to host range of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene*. **Plant Disease**, v.72, n.1, p.16-18, 1988.
- TEBEEST, D.O. Biological control of weeds with microbial herbicides. **Fitopatologia Brasileira**, v.9, p.443-453, 1984.
- TEBEEST, D.O. Ecology and epidemiology of fungal plant pathogens studied as biological control agents of weeds. In: TEBEEST, D.O. ed. **Microbial control of weeds**. New York: Chapman and Hall, 1991. p.97-114.
- TEBEEST, D.O.; TEMPLETON, G.E.; SMITH JR., R.J. Temperature and moisture requirements for development of antracnose on northern jointvetch. **Phytopathology**, v.68, p.389-393, 1978.
- TEBEEST, D.O.; YANG, X.B.; CISAR, C.R. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.637-657, 1992.
- TEMPLETON, G.E.; TEBEEST, D.O. Biological weed control with mycoherbicides. **Annual Review Phytopathology**, v.17, p.301-310, 1979.
- TEPPER, C.S.; ANDERSON, A.J. The genetic basis of plant-pathogen interaction. **Phytopathology**, v.74, n.10, p.1143-1144, 1984.
- TRUJILLO, E.E.; NORMAN, D.J. Septoria leaf spot of lantana from Ecuador: a potential biological control for bush lantana in forests of Hawaii. **Plant Disease**, v.79, n.8, p.819-821, 1995.
- VAN DEN BOSH, R.; MESSENGER, P.S.; GUTIERREZ, A. **An introduction to biological control**. New York, Plenum Press, 1982. 247p.
- WALKER, H.L.; BOYETTE, C.D. Influence of sequential dew periods on biocontrol of sicklepod (*Cassia obtusifolia*) by *Alternaria cassiae*. **Plant Disease**, v.70, p.962-963, 1986.
- WALKER, H.L. Factors affecting biological control of spurred anoda (*Anoda cristata*) with *Alternaria macrospora*. **Weed Science**, v.29, p.505-507, 1981.
- WALKER, H.L. Seedling blight of sicklepod caused by *Alternaria cassiae*. **Plant Disease**, v.66, p.426-428, 1982.
- WAPSHERE, A.J. A Strategy for evaluating the safety of organisms for biological weed control. **Annals of Applied Biology**, v.77, p.201-211, 1974.
- WAPSHERE, A.J. Effectiveness: a comparison of prediction and results, during the biological control of *Chondrilla*. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS**, 4., 1976. Gainesville, Florida. **Proceedings**. Gainesville, Florida, 1976, p.124-127.
- WATSON, A.K.; WIMORE, L.A. Biological control, a component of integrated weed management. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS**, 7., 1988. Rome, Italy. **Proceedings**. Rome, 1990, p.101-106.
- WATSON, A.K. The classical approach with plant pathogens. In: TEBEEST, D.O. ed. **Microbial control of weeds**. London: Chapman and Hall, 1991. p.3-23.
- WEETE, J.D. Induced systemic resistance to *Alternaria cassiae* in sicklepod. **Physiologic and Molecular Plant Pathology**, v.40, p.437-445, 1992.

- WILSON, F. A review of the biological control of insects and weeds in Australia and Australian New Guinea. Wallingford: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1960. 102p.
- YANG, S.M.; JONG, J.C. Host range determination of *Myrothecium verrucaria* isolated from, leafy spurge. **Plant Disease**, v.79, n.10, p.994-997, 1995a.
- YANG, S.M.; JONG, S.C. Factores influencing pathogenicity of *Myrothecium verrucaria* isolated from *Euphorbia esula* on species of *Euphorbia*. **Plant Disease**, v.79, n.10, p.998-1002, 1995b.
- YANG, S.M.; TEBEEST, D.O. Rain dispersal of *Colletotrichum gloeosporioides* in simulated rice field conditions. **Phytopathology**, v.82, n.10, p.1219-1222, 1992.
- YANG, X.B.; TEBEEST, D.O. Epidemiological mechanisms of mycoherbicide effectiveness. **Phytopathology**, v.83, n.9, p.891-893, 1993.
- ZWOELFER, H. Possibilities and limitation in biological control of weeds. **OEPP/EPPO Bulletin**, v.3, n.3, p.19-30, 1973.

# 4

## CONTROLE MICROBIANO DE VETORES TRANSMISSORES DE DOENÇA DE CHAGAS

**Claudio Luiz Messias**

**Vera Lúcia Correa C. Rodrigues**

**Antenor Nascimento Ferraz Filho**

**Ricardo Henri Rodrigues Destefano**

**Aquiles Eugênio Piedrabuena**

### INTRODUÇÃO

Os vetores de Doença de Chagas pertencem a vários gêneros com várias espécies de importância em diferentes países, desde os Estados Unidos até a Argentina (Barreto,1979). A doença causada pelo *Trypanosoma cruzi*, particularmente nos países sul-americanos, é prevalente na área rural, mas, pela vasta distribuição neste meio, tem se expandido para áreas urbanas, ocasionada pelo êxodo rural, mostrando que está muito associada aos níveis econômicos da população.

O *T. cruzi* é transmitido para o homem a partir de picadas dos vetores, conhecidos por vários nomes populares, entre eles os mais comuns, barbeiro, no Brasil, "kissing bug" nos Estados Unidos. Os níveis atuais da doença no Brasil e América do Sul e a prevalência de infecção para *T. cruzi* é de aproximadamente 10.934.000 de infectados. A Tabela 1 mostra a distribuição por países. No Brasil, atualmente os problemas maiores são ainda com o *T. infestans* e as áreas mais afetadas são norte de Minas Gerais, região do São Francisco à Bahia, o distrito de Santa Rosa no Rio Grande do Sul e o norte de Goiás. Segun-

do Tonn (1988), mais de 115 espécies de triatomíneos têm sido encontradas infectadas. No entanto, poucas são importantes do ponto de vista de infectarem o homem, dada a sua ocorrência fora de áreas domiciliares, assim como outras espécies pouco estudadas pertencentes aos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*, e ainda triatomíneos silvestres cujos adultos invadem ocasionalmente os domicílios e anexos, podendo trazer a infecção para o homem e para os animais domésticos e sinantrópicos. Merecem atenção especial os reservatórios naturais onde várias ordens com várias famílias ocorrem. Extensa revisão sobre este assunto é apresentada por Barreto (1979), particularmente para os hospedeiros silvestres como os gambás (*Didelphis*) e os tatus, citados como os principais, enquanto que para os domésticos e peridomiciliares, têm-se cachorros, gatos e roedores.

TABELA 1. Prevalência de Doença de Chagas em vários países da América do Sul.

País	Número de infectados*
Argentina	2.640.000
Bolívia	1.333.000
Brasil	6.340.000
Chile	187.000
Paraguai	397.000
Uruguai	37.000
Total	10.934.000

\*Dados obtidos da Organización Panamericana de la Salud (OPS), encontro realizado de 22 a 24 de março de 1995, em Assunção, Paraguai.

O controle destes vetores nos diferentes países é realizado por várias instituições, em sua maioria governamentais. A Tabela 2 apresenta algumas destas instituições, que utilizam basicamente produtos químicos para o controle destes vetores. No ano de 1995, segundo documento da *Organización Panamericana de La Salud*, OPS, mais de sessenta milhões de dólares têm sido despendidos na tentativa de eliminação de *T. infestans* e na interrupção da transmissão transfusional de *T. cruzi*. Mais recentemente, a literatura tem trazido contribuições de vários autores quanto à possibilidade de controle biológico utilizando-se parasitas, predadores e microrganismos.

Neste capítulo será examinada a distribuição de vetores, apresentando-se uma possibilidade de controle microbiano a partir de resultados de pesquisa de campo utilizando-se o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para o controle de *Panstrongylus megistus*.

TABELA 2. Instituições sul-americanas envolvidas no controle de vetores de Doença de Chagas e dispêndios aproximados em dólares americanos para o combate.

País	Instituição	Dispêndios aproximados em US\$
Argentina	Ministerio de Salud y Acción Social-Serviço Nacional de Drogas	18,000,000
Bolívia	Ministerio de Desarrollo Humano/Secretaria Nacional de Salud Dirección Nacional de Vigilancia y Control de Enfermedades Y Riesgos da Secr.Nacional de Sallud	717,035
Brasil	Superintendência de Controle de Endemias "SUCEN" no Estado de São Paulo Fundação Nacional de Saúde-FNS Federativo exceto São Paulo	50,000,000
Chile	Ministerio de Salud Programa de Vetores	300,000
Paraguai	Ministerio de Salud Publica y Bienestar Social	1,250,000
Uruguai	Ministerio de Salud Programa de Chagas	73,000

Fonte: Informações parcialmente obtidas de "Iniciativa del Cono Sur IV Reunión de la Comisión Intergubernamental para la Eliminación del Triatoma Infestans y la Interrupción de la Tripanosomiasis Americana Transfusional". Publicação da Organización Panamericana de la Salud (OPS), encontro realizado de 22 a 24 de março de 1995, em Assunção, Paraguai.

## ECOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO

Os triatomíneos têm ampla distribuição geográfica no Novo Mundo, desde os Estados Unidos até o sul do Chile e Argentina, existindo espécies que são tipicamente silvestres; e das 118 espécies conhecidas, 105 são do Novo Mundo. Todas as espécies são vetoras em potencial para o *Trypanosoma cruzi*, mas seis têm importância epidemiológica na América do Sul: *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *P. megistus* e *Rhodnius prolixus*. A espécie vetora mais importante, devido ao seu hábito quase que estritamente doméstico e também com a mais extensa área de distribuição, é o *T. infestans*, encon-

trado na Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai, Peru e Uruguai. Em algumas localidades do sul do Brasil (Rio Grande do Sul), sul do Peru, Bolívia e algumas localidades do noroeste da Argentina, *T. infestans* também tem hábito peridoméstico, ocupando galinheiros, currais etc. As colônias em ecótopos artificiais têm tendência a se concentrarem nas partes mais altas da parede. Neste gênero, *Triatoma*, um exemplo típico é dado pelo *T. arthurneivai* que habita fendas de pedras e está associado a lagartos e roedores. É encontrado no Brasil nos estados da Bahia, Minas Gerais e São Paulo. No estado de São Paulo, Rodrigues *et al.* (1992) encontraram adultos da referida espécie em ecótopos artificiais e com infecção natural pelo *T. cruzi*. Ainda no Brasil, no estado do Rio Grande do Sul, no Uruguai e no norte da Argentina encontra-se outra espécie *T. rubrovaria*, tipicamente silvestre que convive com roedores em ambientes pedregosos. Apresenta alto índice de infecção natural e invade os domicílios principalmente no verão. Na Argentina temos mais duas espécies deste grupo que são *T. eratyrusiformis* e *T. patagônica*: criam-se em lugares pedregosos e alimentam-se de pequenos roedores, mas atacam o homem e os animais domésticos à noite. *T. brasiliensis* com altas taxas de infecção pelo *T. cruzi* é o vetor mais importante no nordeste do Brasil, e pode ser encontrado com alguma frequência em domicílios. Tem hábitos silvestres e peridomiciliares, onde está associado com abrigo de cabras, galinheiros e ecótopos rochosos; no peridomicílio e domicílio tem as aves como principal fonte alimentar, seguidas por humanos.

A segunda espécie vetora é *P. megistus*, sendo domiciliada em algumas regiões, peridomiciliar e silvestre em outras. Também tem vasta distribuição geográfica, distribuiu-se desde as Guianas até a Argentina. É a espécie responsável pelos focos mais intensos da endemia chagásica em Minas Gerais e Bahia (Brasil). Tem hábito silvestre no centro do Brasil e leste do Paraguai e está associado a *Didelphideos*, motivo pelo qual os índices de infecção para *T. cruzi* são elevados. Invadem ocasionalmente domicílios e peridomicílios onde se colonizam com facilidade. *P. geniculatus*, espécie silvestre que também invade ocasionalmente ecótopos artificiais e tem ampla distribuição geográfica, está associada a animais com hábitos terrestres (buracos), como é o caso dos tatus. Pode-se citar ainda o *P. diasi* com distribuição na Bolívia e Brasil nos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Bahia, ocorrendo neste último estado na região da caatinga. *P. lutzi* no nor-

deste brasileiro e *P. tupynambai* no Rio Grande do Sul e Uruguai são espécies que nos últimos anos têm sido encontradas com frequência nas habitações humanas.

*T. sordida* geralmente é encontrada em ecótopos silvestres e no peridomicílio, invade com frequência o domicílio, mas é considerada espécie secundária. Tem distribuição no Brasil Central (cerrado), partes do Paraguai, noroeste da Argentina, Uruguai e Bolívia. Tem sido encontrada com baixa taxa de infecção natural, a qual está associada a roedores. *T. dimidiata* frequenta o domicílio e é encontrada em diversas tocas silvestres, tais como rocas, grutas ocupadas por morcegos e ocos de árvores, sendo um importante vetor da América Central, México, Colômbia, Equador e norte do Peru.

Outro gênero que pertence a este grupo, cujos adultos invadem ecótopos artificiais, são algumas espécies de *Rhodnius*, principalmente *R. domesticus*, que é encontrado na região litorânea do Brasil, *R. pictipes* nas regiões norte e centro-oeste do Brasil e o *R. brethesi*, com distribuição no norte do Brasil e Venezuela, tem hábitos silvestres e habita palmeiras de piaçaba (*Leopoldinia piassaba*), ataca o homem com avidez e, nos últimos anos, tem invadido com frequência ecótopos artificiais.

*R. prolixus* é a espécie vetora mais importante da Colômbia e Venezuela, onde tem hábito doméstico, sendo responsável pela transmissão natural da Doença de Chagas. Também é importante em algumas partes da América Central, particularmente em El Salvador, Guatemala e Honduras. No ambiente domiciliar, *R. prolixus* alimenta-se principalmente de sangue humano e de aves, embora utilize também, como fonte alimentar, cães e gatos. No ambiente silvestre, faz uso de marsupiais e roedores como fonte de alimento. *R. pallescens* é importante vetora no Panamá, invade casas com frequência formando colônias e é encontrada também no peridomicílio e em ambientes silvestres em palmeiras. As populações domésticas na área central do Panamá têm como fonte alimentar o homem (59%), seguido por marsupiais e aves domésticas.

No Velho Mundo, são 13 as espécies descritas, necessitando de esclarecimentos epidemiológicos. Não se encontrou nenhuma infectada pelo *T. cruzi*. A espécie mais conhecida dentre estas é *Triatoma rubrofasciata*, que é cosmopolita e encontrada em regiões portuárias.

Dada a importância dos gêneros e espécies silvestres de ocorrência em toda a América do Sul, e particularmente em um país como o Brasil, onde além de uma vasta área de matas há uma grande expansão de áreas agrícolas, com retorno de populações para áreas rurais, somando-se a isto o desmatamento que ocorre predatoriamente em toda a América do Sul, torna-se extremamente necessária a consideração destas espécies. Entre as tipicamente silvestres temos espécies do gênero *Psammolestes*, particularmente *P. arthuri*, com distribuição na Venezuela, *P. coreodes* ocorre na Argentina, Bolívia, Paraguai e oeste do Brasil e *P. tertius* tem distribuição limitada ao Brasil (Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco e São Paulo). Outro gênero tipicamente silvestre é o *Cavernícola* com as espécies *C. lenti* e *C. pilosa*, que está associado a morcegos e como ciclo silvestre de transmissão do *Tripanosoma cruzi* entre morcegos. *C. pilosa* foi encontrada em domicílios na região de Araçatuba, oeste do estado de São Paulo (Rodrigues, comunicação pessoal). Entre o gênero *Triatoma*, encontra-se na Argentina, *T. delpontei* e *T. garciabecei* ambos habitando ninhos de pássaros e no Panamá *T. dispar*, que tem hábitos arborícolas e está associado a *Choloepus hoffmanni* (preguiça). Ainda como estritamente silvestres podem ser citados os gêneros *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Microtriatoma*, *Parabelminus* e algumas espécies do gênero *Rhodnius*.

## CONTROLE DO VETOR

A Doença de Chagas, segundo Tonn (1988), é uma das poucas doenças onde o controle efetivo é possível, e este não depende somente da ação de produtos químicos ou biológicos, mas também de forte ação governamental sobre o aumento populacional e o desenvolvimento econômico, que deve estar associado a uma melhoria em moradia, investindo nas condições sanitárias que são componentes fundamentais para uma revolução na saúde pública, e que ainda não foram atingidos nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento.

Os piretróides sintéticos têm sido aplicados desde 1980. Um dos mais utilizados é a deltametrina em pó molhável ou suspensão concentrada em doses de 25-50 mg/m<sup>2</sup> ou cipermetrina e piretrina em líquido ou em pó em doses de 100-200 mg/m<sup>2</sup>.

O controle químico em programa de controle tem sido executado na Argentina, Brasil e Venezuela. Em grandes áreas destes países, o programa encontra-se na fase de vigilância, caracterizada por monitoramento de infestação nas casas e onde for necessário faz-se pulverização (ou borrifação).

Com relação aos vetores do peridomicílio que merecem especial atenção, o controle destas espécies pode ser através da combinação de borrifação química, manejo do ambiente e controle biológico.

Vários produtos químicos foram utilizados no Controle de Vetores. Zerba (1988) cita Malathion, Fenitrothion, DDVP, Pirimiphos methyl, Bendicarb. No entanto, devido ao impacto que causaram, atualmente os piretróides são os mais utilizados.

No controle biológico podem ser utilizados parasitas, predadores e simbiontes (Ryckman & Blankenship, 1984). No Brasil, *Rhodnius neglectus* têm sido infectados por *Telenomus* sp. no estado de Minas Gerais. O gênero *Rasahus* é citado por Coscaron (1983) como um importante grupo de predadores. Na Argentina, *Anastratus charitos* é citado como um importante grupo de parasitas ao *T. infestans*. Ainda em controle biológico tem-se a utilização de feromônios e o microbiano. O controle microbiano vem sendo potencializado com a utilização do fungo *Metarbizium anisopliae* (Messias *et al.*, 1986).

Em todos os tipos de controle, a distribuição dos vetores deve ser fortemente considerada sob o aspecto epidemiológico, quanto às características domiciliar, peridomiciliar e silvestre. Com a invasão de áreas de florestas para formação de fazendas ou retirada de madeira, ou pela devastação de áreas de preservação nas adjacências de regiões urbanas, as áreas rurais são as primeiras a desalojarem os vetores de seus ambientes naturais, quebrando o seu equilíbrio com a floresta e os animais, passando então ao homem primeiramente em suas adjacências, em seus animais domésticos como galinhas e patos entre outros, e em seguida passando para a casa. Em muitas propriedades agrícolas, os proprietários proíbem a criação de galinhas, ou recomendam a construção de galinheiros em locais afastados, nos moldes recomendados pelas Instituições de Combate, mantendo-os desta forma longe dos domicílios, servindo praticamente como uma barreira, tendo em vista o desenvolvimento do vetor, apesar de não haver a possibilidade de multiplicação do protozoário. Não é raro o número de galinhas vistas em estado de inani-

ção por terem sido sugadas por um número razoável de triatomíneos, conforme foi observado em uma propriedade rural no município de Alvorada do Norte, estado de Goiás, 200 km ao norte de Brasília (comunicação dos autores).

O controle de vetores da Doença de Chagas é feito por órgãos governamentais, e tem pouca eficiência dadas as distâncias e áreas a serem cobertas. O sinal para o controle é dado pela população que verifica a ocorrência desses vetores, solicitando, então, a intervenção do órgão competente. O controle é feito periodicamente no interior da residência com aplicação de produtos químicos. Devido ao comportamento peculiar do inseto, as áreas peridomiciliares que não forem pulverizadas adequadamente podem servir de reintrodução do vetor. Assim, um controle mais efetivo seria aquele em que fossem tratadas não só as áreas domiciliares como também as peridomiciliares, o que é possível com agentes biológicos como o fungo *Metarhizium anisopliae*. O fungo, por não ter ação sobre animais de sangue quente e nem sobre o homem, pode ser aplicado sobre animais e ninhos das aves (galinhas) ao redor do domicílio e, assim, exercer um controle microbiológico mais eficiente e duradouro na redução populacional de vetores.

O tratamento com fungos, no caso *M. anisopliae*, tem sido feito com aplicação de esporos em concentrações  $10^8$  con/ml e com esta preparação tem-se obtido controle de 35 a 40% com as aplicações no interior de residências, aos moldes dos produtos químicos, com uma persistência que pode ser maior que 45 dias (Messias *et al.*, em preparação).

## Formas de Utilização do Controle Microbiano

Em controle microbiano, o entomopatógeno pode ser utilizado de várias maneiras, a saber: a) colonização; b) inseticida microbiano; c) inoculativo (Roberts *et al.*, 1991); d) ou ainda em sinergismo com produtos químicos. No entanto, estes métodos devem ser considerados em relação às características biológicas e abióticas que influenciam a distribuição dos vetores, e no caso particular quanto ao hábito doméstico, peridomiciliar e silvestre.

**Domiciliar.** Neste caso, a utilização deve ser feita nos moldes dos produtos químicos, repetindo-a com a devida periodicidade, empregando-se o entomopatógeno como inseticida microbiológico. No entanto, a velocidade com que o patógeno mata o hospedeiro é lenta e

pode levar até 3 a 4 dias em condições de bioensaios (Messias *et al.*, 1986), o que em condições de campo pode ocorrer em torno de 10 a 15 dias (Messias *et al.*, em publicação).

Esta forma de controle tem apresentado redução populacional de 30 a 45% em tempos longos, ao redor de cem dias após a aplicação, mas que provavelmente podem ser reduzidos em condições de temperaturas mais elevadas, sendo que as condições em que foram obtidos os resultados foram intencionalmente as mais críticas possíveis, ou seja, com temperatura em torno de 20 a 25°C e umidade relativa em torno de 70% e, mesmo nestas condições, a sobrevivência residual dos esporos nas paredes tratadas foi superior a 45 dias. A Fig. 1 mostra estes resultados.

A utilização deste tipo de controle para vetores domiciliados deixa a desejar pelo baixo nível de controle de impacto. Entretanto, poderia ser empregado em conjunto com inseticidas tradicionais como os piretróides e outros, o que poderia abreviar o período de morte dos hospedeiros, dado que populações estressadas ficam mais sensíveis à ação de doenças, mas este tipo de utilização deve ser estudada.

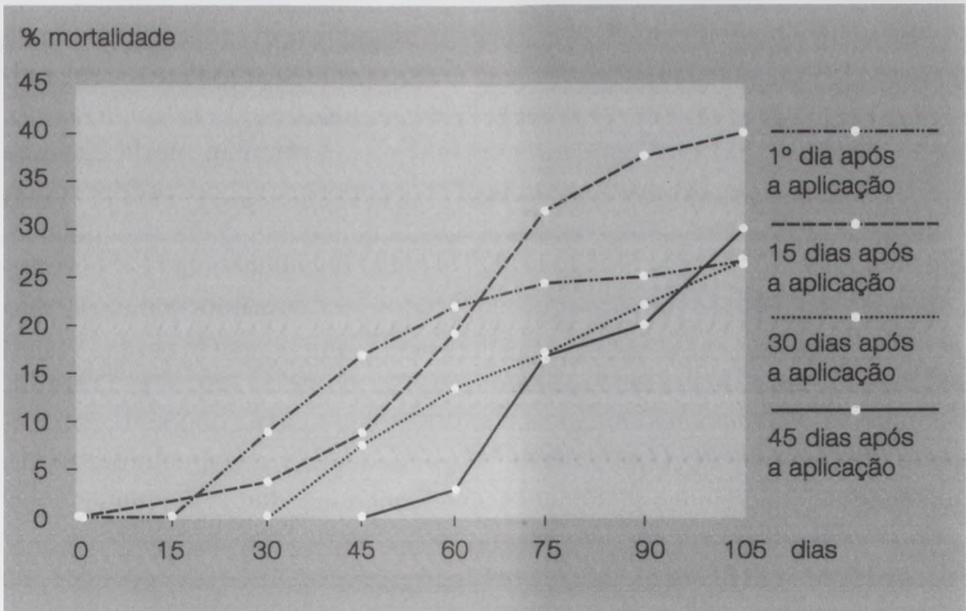


FIGURA 1. Mortalidade acumulada durante os 105 dias de experimentos com 3 introduções de insetos.

**Peridomiciliar.** A ocorrência do vetor se dá também além da residência, principalmente nas cercanias desta, onde tem-se a criação de aves e outros animais domésticos como caprinos, ovinos e suínos, e ainda a ocorrência de pequenos animais silvestres, como por exemplo o gambá, que pode ser um reservatório do protozoário, e neste caso também seriam recomendadas aplicações periódicas, empregando-se o entomopatógeno como inseticida microbiano.

O controle dentro de área peridomiciliar deve ser rigoroso por tratar-se de áreas transitórias ao hábito doméstico dos vetores. Bos (1988) cita o exemplo muito conhecido de *Rhodnius prolixus*, muitas vezes introduzidos em ambiente doméstico juntamente com folhas de palmeiras usadas para cobertura. Segundo Zeledon (1981), tem-se o caso de *Triatoma dimilata* que é trazido de regiões silvestres juntamente com lenhas que são mantidas próximas à casa. O controle nestas áreas muitas vezes não pode ser feito por produtos químicos devido ao tipo do impacto ambiental, podendo intoxicar e até mesmo levar à morte animais domésticos e contaminar os mananciais hídricos. Os fungos, por não apresentarem estes efeitos indesejáveis, podem ser aplicados amplamente nestes locais. Forattini *et al.* (1979) já enfatizavam o cuidado com populações triatomínicas em ambiente extradomiciliar, que devem ser devidamente consideradas pela vigilância.

**Silvestre.** Estas populações são difíceis de serem tratadas por causa do local de ocorrência, como por exemplo ninhos de pássaros em palmeiras verivas, e, se usados, devem ser como inseticida microbiano, com aplicações contínuas e periódicas. Neste particular, ainda citou-se as observações de Forattini *et al.* (1979) que permanecem válidas, dada a contínua expansão da atividade agropecuária, bolsões de matas e restingas que são, de uma forma inequívoca, reservatórios, por permitirem a sobrevivência de populações. Este fato tem permitido a expansão de alguns tipos de ecótopos, representados por árvores secas, o que facilitou a distribuição de *T. sordida*. Apesar da persistência e da multiplicação de esporos sobre o cadáver dos hospedeiros, não se recomendaria uma utilização do tipo colonização, dado o comportamento do hospedeiro de poder migrar de acordo com sua fonte alimentar.

## Obtenção do Inseticida Microbiológico

A obtenção passa inicialmente pelo desenvolvimento de uma matriz que compreende várias fases, até que se tenha obtido seu real

valor quanto à eficiência e expressão ambiental, considerando-se os fatores abióticos do ambiente, particularmente temperatura e umidade, juntamente com os resultados de bioensaios onde os fatores bióticos de hospedeiro e patógeno são avaliados. Vários hospedeiros, diferentes espécies de triatomíneos e estágios de desenvolvimento devem ser avaliados em bioensaios (Messias *et al.*, 1986), assim como várias linhagens do entomopatógeno, passando-se a seguir a uma avaliação de pré-campo onde as melhores linhagens obtidas em bioensaios são avaliadas. Essa condição de pré-campo nada mais é que uma forma de menor escala em relação à utilização em larga escala para que se possa determinar as dosagens.

Aqui no caso será citada uma forma de obtenção do inseticida microbiológico que tem aplicação para ambos, utilizando-se uma forma pura de esporos sem formulações.

## **Seleção em Bioensaios de Matrizes**

Denomina-se matriz a linhagem selecionada em bioensaio quanto a Tempo Letal 50 (LT50) e Dose Letal 50 (DL50) e outras características culturais, bióticos de espécie pela reinoculação de insetos sadios com esporos de cadáveres dos hospedeiros vindos do campo. No bioensaio, esporos do fungo são produzidos em meios de cultivo e inoculados com matriz previamente selecionada em meio de cultivo constituído de arroz cozido em autoclave. Após o crescimento micelial ocorre a esporulação, cujo ciclo se completa em 15 dias em condições de temperatura ambiente de  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ . Os esporos são então removidos por via aquosa, por exemplo obtendo-se uma pasta de conídios que pode ser mantida por longo tempo em congelador  $-20^{\circ}\text{C}$ , em suspensão de glicerol (Destefano, 1993).

## **Aplicação em Área Rural**

A aplicação dos esporos é feita sobre as paredes de residências, móveis, madeiras ou outro suporte, e nas áreas peridomiciliares. O vetor, caminhando sobre as superfícies tratadas, adquire os esporos, que se fixam em seu corpo, e ao germinarem penetram na cutícula através de um processo químico e mecânico (fase de penetração), indo então se desenvolver numa forma leveduriforme já na hemocela com produção de toxinas (fase de colonização), e levando o hospedeiro à morte (Mes-

sias, 1992). Sobre o cadáver são produzidos novamente esporos, unidades infectivas, que poderão infectar outros insetos na população de vetores, e assim completar o ciclo de doença. Para *Panstrongylus megistus*, o ciclo está em torno de 15 dias, para uma linhagem isolada em laboratório, *M. anisopliae* 157P, obtida de seleção genética de mutantes da linhagem denominada E9, isolada de cigarrinha-das-pastagens. A Fig. 2 mostra o ciclo de evolução da doença.

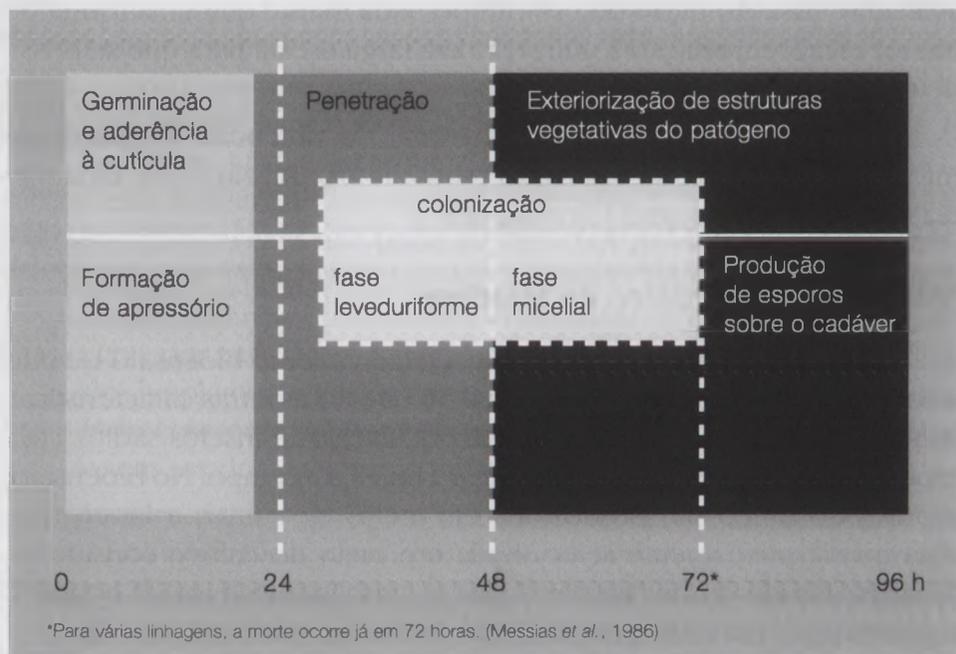


FIGURA 2. Ciclo de infecção causada por *Metarhizium anisopliae* em *Panstrongylus megistus*.

Nas áreas tratadas tem sido observada uma resistência dos esporos em torno de 45 dias, o que poderá ser maior, recomendando-se então a periodicidade de aplicações.

## CONCLUSÃO

O controle de vetores por agentes microbianos como os fungos, particularmente *Metarhizium anisopliae*, apresenta-se com grande potencialidade e os resultados até agora obtidos para *P. megistus* recomendariam sua utilização, principalmente em áreas peridomiciliares,

uma vez que não apresenta o impacto dos produtos químicos tradicionalmente utilizados e, nestas áreas, poderá servir como um cordão e ser aplicado sobre diferentes superfícies e locais. Por outro lado, ainda nestes locais, o efeito poderá se tornar aditivo pela contaminação dentro da própria população. Junta-se a estes motivos a importância social, dados os dispêndios econômicos que poderiam ser carreados para outras atividades da saúde e da educação, dadas as condições dos países que mais sofrem desse mal.

Deve ser reiterada ainda na utilização destes entomopatógenos a sua interação ambiental, o que nas condições abióticas reinantes na América do Sul são altamente recomendáveis. São recomendáveis também estudos ao nível epiziotológico, onde a relação patógeno/hospedeiro e a interação com o ambiente são consideradas, procurando-se linhagens mais eficientes.

Ainda pela facilidade de produção de fungos entomopatogênicos, pelo baixo custo de obtenção e desenvolvimento, é recomendável o estímulo aos projetos envolvidos em identificação de novos gêneros e espécies que possam ter potencial como agentes de controle microbiano de vetores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRETO, M.P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. ed. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Koogan, 1979. Rio de Janeiro: Guanabara. p.89-174.
- BOS, C. The importance of peridomestic environmental management for the control of the vectors of Chagas' Disease. *Revista Argentina de Microbiologia*, v.20, p.58-62, 1988.
- COSCARON, M.C. Revisión del género *Rasahus* (Insecta, Heteroptera, Reduviidae) *Revista del Museo La Plata*, v.13, p.75-138, 1983.
- DESTEFANO, R.R.H. Evolução de  $O_2$ , viabilidade e virulência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, durante armazenamento. Piracicaba: ESALQ/USP, 1993. 86p. Dissertação, Mestrado.
- FORATTINI, O.P.; FERREIRA, O.A.; ROCHA e SILVA, E. O.; RABELLO, E. S. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. XIV - persistência e potencial de domiciliação de populações triatomínicas silvestres em região de intensa atividade agropecuária. *Revista de Saúde Pública*, v.13, p.123-146, 1979.
- MESSIAS, C.L.; DAOUST, R.A.; ROBERTS, D.W. Virulence of a natural isolate, Auxotrophic mutants and a Diploid of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* to *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.47, p.231-233, 1986.
- MESSIAS, C.L. Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle biológico das pragas agrícolas. In: CRUZ, B.P.B.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L.G. ed. *II Ciclo de Palestras Sobre Controle Biológico de Pragas*. Campinas: Fundação Cargil, 1992. p.111-125.
- MESSIAS, C.L.; FERREIRA, A.N.; RODRIGUES, V.L.C.C.; DESTEFANO, R.H.R.; PIETRABUENA, A.E. Potencial of Control of Chagas' vector disease by the fungus *Metarhizium anisopliae* (in press), 1997.
- ROBERTS, D.W.; FUXA, I.R.; GAVGLER, R.; GOETTEL, M.; JACQUES, R.; MADOX, J. Use of pathogens in insect control, 1991. In: PIMENTEL, D. ed. *Handbook of pest management in agriculture*. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1991. v.2., p.243-278.
- RODRIGUES, V.L.C.C.; FERRAS, F.A.N.; ROCHA e SILVA, E.O.; COSTA de LIMA, V.L. Prevalência, índices de infecção e hábitos alimentares de triatomíneos capturados em uma área de vigilância epidemiológica. *Revista da Sociedade de Brasileira de Medicina Tropical*, v.25, n.3, 183-190, 1992.

- RYCKMAN, R.E.; BLANKENSHIG, C.M. The parasites, predators and symbionts of the triatominae (Himiptera: Reduviidae: Triatominae). **Bulletin of the Society for Vector Ecologists**, v.9, p84-111, 1984.
- TOON, R.J. Potencial for research on vectors Chagas'Disease. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.20, supl., p.4-24, 1988.
- ZELEDON, R.; RAABINOVCH, J.E. Chagas'Disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vector. **Annual Review of Entomology**, v.26, p.101-133, 1988.
- ZERBA, E.N. Conventional insecticides: mechanism of action resistance and bioassay in Chagas'Disease Vectors. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.20, supl., p.32-38, 1988.

# 5

## CONTROLE MICROBIANO DE ARTRÓPODOS ASSOCIADOS A DOENÇAS DE PLANTAS

**Sergio Batista Alves**

**João Roberto Spotti Lopes**

**Luiz Francisco Angeli Alves**

**Alcides Moino Jr.**

### INTRODUÇÃO

Diversas doenças de plantas de expressão econômica estão associadas direta ou indiretamente a artrópodos, representados por insetos e ácaros. Na maioria dos casos, esses artrópodos têm importância indireta, atuando como vetores de microrganismos fitopatogênicos, como vírus e alguns grupos de procariotos, fungos e protozoários. Neste tipo de associação, os fitopatógenos geralmente dependem dos vetores para sua disseminação na natureza e penetração em plantas hospedeiras. Existem também artrópodos que, embora não transmitam fitopatógenos, são importantes por injetarem substâncias tóxicas nas plantas, causando fitotoxemias. Esses organismos se destacam por seus hábitos alimentares e a grande capacidade de multiplicação e dispersão.

O controle químico de artrópodos vetores e/ou toxicogênicos tem resultado em problemas sérios de resistência, levando os agricultores a utilizarem dosagens cada vez maiores de pesticidas. Isso tem como consequência quase que imediata a poluição ambiental, aumento de

resíduos tóxicos nos alimentos e, principalmente, desequilíbrios na balança biológica, resultando na ressurgência de pragas e no aparecimento de pragas secundárias.

Assim, há necessidade de pesquisas sobre o desenvolvimento de métodos alternativos de controle desses artrópodos. Apesar de ser possível a utilização de parasitóides e predadores, os entomopatógenos, por serem facilmente produzidos e por se assemelharem mais ao uso dos pesticidas, representam alternativas práticas e viáveis para o controle de vetores, associados ou não ao uso de pesticidas químicos. A utilização de entomopatógenos deve ser feita dentro de estratégias cuidadosamente estudadas, tendo em vista as características da praga e do entomopatógeno, além daquelas relacionadas ao ambiente, cultura etc.

Em alguns casos, a transmissão de fitopatógenos por vetores é muito rápida, bastando uma única picada de prova do vetor para que ocorra a inoculação da planta sadia. Nessa categoria enquadra-se a transmissão estiletar (não-persistente) de vírus de plantas por pulgões. Em contraste, os entomopatógenos mais rápidos colonizam vetores em períodos de, no mínimo, 24 horas. Desta forma, o estabelecimento de uma estratégia adequada de utilização de microrganismos, visando ao controle de vetores, exige uma análise detalhada das características temporais da transmissão por esses artrópodos.

Apesar da ocorrência de todos os grandes grupos de microrganismos sobre os diversos tipos de artrópodos associados a enfermidades de plantas, a supremacia dos fungos, que têm como principal via de penetração o tegumento dos insetos, é um fato incontestável. Ocorrendo enzoótica ou epizooticamente, dentro dos diferentes agroecossistemas, esses agentes devem ser considerados como um fator natural de grande importância na redução da população desses artrópodos. Assim, a proteção desses fungos entomopatogênicos através da estratégia de conservação, evitando-se o uso de agrotóxicos incompatíveis e utilizando-se técnicas culturais adequadas, é procedimento eficaz, muito desejável e economicamente viável (Alves, 1992).

O principal objetivo deste capítulo é descrever o potencial de microrganismos entomopatogênicos no controle de vetores de fitopatógenos e de artrópodos com ação toxicogênica.

## ARTRÓPODOS ASSOCIADOS A DOENÇAS DE PLANTAS

Os artrópodos podem estar associados a doenças de plantas na forma direta, pela ação toxicogênica; a doença é resultante do efeito de toxinas introduzidas na planta, geralmente via saliva, durante o processo de alimentação. Fitotoxemias têm sido observadas em um grande número de plantas cultivadas, em associação com insetos sugadores da ordem Hemiptera e com ácaros. Entre os hemípteros, têm sido relatadas inúmeras espécies toxicogênicas nas famílias Miridae, Pentatomidae e Coreidae da subordem Heteroptera, e nas famílias Cicadellidae, Cercopidae, Aphididae, Psyllidae, Coccidae e Aleyrodidae da subordem Homoptera (Costa, 1973; Gallo *et al.*, 1988). Entre os ácaros, um exemplo típico de fitotoxemia é o avermelhamento de grãos de milho, causado por fitotoxinas salivares de *Eriophyes tulipae* (Nault *et al.*, 1967). Esta doença foi considerada por muito tempo como sendo de etiologia viral.

Com relação a vetores, existem vários tipos de fitopatógenos transmitidos por insetos e ácaros, incluindo vírus, procariotos, protozoários e alguns fungos. Os vírus de plantas constituem o grupo mais importante, sendo a maioria deles dependente de algum tipo de vetor para transporte entre plantas hospedeiras e inoculação em tecido vegetal suscetível. Os homópteros, particularmente os afídeos, são os principais vetores de fitovírus, seguidos de coleópteros, tripses e ácaros (Tabela 1).

Alguns grupos de procariotos fitopatogênicos, como bactérias fastidiosas e mollicutes (*Phytoplasma* e *Spiroplasma*), são obrigatoriamente transmitidos por homópteros, em sua maioria cigarrinhas (divisão Auchenorrhyncha), com exceção das bactérias *Erwinia tracheiphila* e *E. stewartii*, que são transmitidas por besouros crisomelídeos (Tabela 2). As poucas espécies de protozoários fitopatogênicos pertencem ao gênero *Phytomonas* e são todas transmitidas por percevejos (Hemiptera-Heteroptera) das famílias Pentatomidae, Lygaeidae e Coreidae (Leach, 1940; Bedendo, 1995).

Diversos grupos de artrópodos têm sido identificados como vetores de fungos fitopatogênicos, incluindo ácaros tetraniquídeos e insetos das ordens Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera e Diptera (Tabela 3). A maioria desses fungos não depende obrigatoriamente dos vetores para sua disseminação, podendo penetrar ativamente nas plantas hospedeiras, através de aberturas naturais e ferimentos. Mesmo assim, a associação de fungos com artrópodos vetores é ecologicamente relevante, pois facilita o transporte desses patógenos a distâncias mais longas.

TABELA 1. Grupos de insetos e ácaros vetores de vírus de plantas (Matthews, 1991; Hiruki, 1992; Nault, 1996).

Ordem		Família	Número de vírus transmitidos	
Insetos	Hemiptera	Aphididae	275	
		Aleyrodidae	43	
		Pseudococcidae	10	
		Cicadellidae	31	
		Membracidae	1	
		Delphacidae	24	
		Miridae	4	
		Piesmatidae	1	
		Thysanoptera	Thripidae	8
		Coleoptera	Chrysomelidae	30
	Coccinellidae		7	
	Cursulionidae		4	
	Meloidae		1	
	Ácaros	Eriophyidae	6	
Tetranychidae		1		
Tenuipalpidae		2		

TABELA 2. Grupos de insetos vetores de procariotos fitopatogênicos.

Procariotos <sup>1</sup>	Grupos de Vetores <sup>2</sup>	
	Ordem	Família
Mollicutes		
<i>Phytoplasma</i>	Hemiptera	Cicadellidae, Delphacidae Psyllidae, Cixiidae
<i>Spiroplasma</i>	Hemiptera	Cicadellidae
Bactérias fastidiosas		
Limitadas ao xilema	Hemiptera	Cicadellidae, Machaerotidae, Cercopidae
Limitadas ao floema	Hemiptera	Cicadellidae, Psyllidae
Bactérias		
<i>Erwinia tracheiphila</i>	Coleoptera	Chrysomelidae
<i>Erwinia stewartii</i>	Coleoptera	Chrysomelidae

<sup>1</sup> Listados apenas procariotos cuja transmissão por vetores é obrigatória.<sup>2</sup> Referências: Tsai (1979); Purcell (1982); Kennedy & Lacy (1982); Purcell (1994)

TABELA 3. Artrópodos vetores de fungos fitopatogênicos.

Artrópodo vetor	Fungo	Referência
Ácaros		
<i>Tetranychus</i>	<i>Uromyces</i> sp.	Batra & Stavely, 1994
Hemiptera – Heteroptera		
<i>Dysdercus</i> sp.	<i>Nematospora coryli</i> e <i>N. gossypii</i>	Frazer, 1944
<i>Dysdercus</i> sp.	<i>Fusarium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Alternaria</i> e <i>Nigrospora</i>	Martin <i>et al.</i> , 1987
<i>Oebalus pugnax</i>	<i>Fusarium</i> , <i>Alternaria</i> e <i>Curvalaria</i>	Lee <i>et al.</i> , 1993
Thysanoptera		
<i>Frankliniella</i> sp. e <i>Thrips tabaci</i>	<i>Puccinia</i> sp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Alternaria</i> ssp., <i>H. vastatrix</i> e <i>Ustilago maydis</i>	Ananthakrishnan, 1980
<i>Taeniothrips</i> <i>incosequens</i>	<i>Discula campestris</i>	Nash <i>et al.</i> , 1981
<i>Thrips obscuratus</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Fermaud <i>et al.</i> , 1994
Coleoptera		
<i>Hypocryphalus</i> <i>magiferae</i>	<i>C. fimbriatus</i>	Abraão & Wegniiller, 1947
<i>Xyleborus ferrugineus</i>	<i>C. fimbriata</i>	Valarini & Tokeshi, 1980
<i>Hylaste nigrinuss</i>	<i>Hylastes wagneri</i>	Witcoski, 1986
<i>Ips sexdentatus</i>	<i>Ophiostoma</i>	Levieux <i>et al.</i> , 1989
Diptera		
<i>Drosophila</i> sp.	<i>Hemileia vastatrix</i>	Amante <i>et al.</i> , 1971
<i>Scatella stagnalis</i>	<i>Pythium</i> sp.	Goldberg & Stanghellini, 1990
<i>Bradysia</i> sp.	<i>F. oxysporum</i>	Gillespie & Menzies, 1993

## ENTOMOPATÓGENOS ASSOCIADOS A ARTRÓPODOS VETORES OU TOXICOGENICOS

### *Hemiptera: Homoptera*

Além da mortalidade, há que se considerar os efeitos dos patógenos na biologia dos insetos. No caso específico dos pulgões, as fêmeas partenogênicas e vivíparas apresentam um potencial reprodutivo

bastante elevado, podendo pôr em risco a eficiência de um programa de controle microbiano. Os patógenos, então, poderiam não ter uma ação direta na redução populacional e, conseqüentemente, na incidência de fitovirose, mas indiretamente reduziriam os impactos causados por estas pragas, diminuindo a fecundidade dos adultos ou sendo transmitidos por estes aos descendentes. A simples presença de adultos mortos pode se constituir em focos primários importantes na disseminação do patógeno para as ninfas que, pelo seu hábito, estão em constante contato com outros indivíduos da colônia.

De forma aplicada, existem poucos relatos sobre o controle de pulgões por meio de aplicações de fungos, seja na forma de suspensão de conídios ou mesmo formulado, em populações de campo ou casa-de-vegetação. A introdução do fungo *Erynia neoaphidis* em campos de feijão tem levado a grandes êxitos no controle de *Aphis fabae*, com significativa redução populacional e aumento da produção, em comparação com parcelas não tratadas, principalmente quando são utilizados cadáveres de pulgões ou insetos vivos previamente infectados pelo fungo. A aplicação de propágulos de patógeno obtidos em meio de uma cultura não foi eficiente, provavelmente porque o potencial de inóculo fornecido pelas duas primeiras formas de aplicação seja maior, ou então, porque propágulos isolados são menos resistentes às condições ambientais (Wilding, 1981; Wilding *et al.*, 1986).

Diante da problemática dos afídeos como vetores de viroses para a batata, Kish *et al.* (1994) fizeram um estudo, visando conhecer o nível de incidência de patógenos na população de *Myzus persicae* em batata e outras plantas hospedeiras, que servem de abrigo para o pulgão. Foram isoladas 5 espécies de fungos, havendo variação de acordo com a planta hospedeira dos pulgões: *Verticillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *Entomophthora chromaphidis*, *Conidiobolus coronatus*, *C. obscurus* e *Pandora neoaphidis*; porém, a porcentagem de indivíduos infectados não ultrapassou 35%, havendo predominância do fungo *P. neoaphidis*.

O fungo *V. lecanii* ocorre sobre muitas espécies de cochonilhas e pulgões. Como esse fungo aparece com grande intensidade em algumas regiões e épocas do ano, há necessidade de se estudar a epizootiologia dessas doenças com a finalidade de se adotar estratégias mais adequadas para cada praga. As técnicas de conservação e incrementação devem ser preferidas nesses casos. Sua importância pode

ser constatada pela existência de produtos comerciais recomendados para pulgões em casa-de-vegetação. Sua grande vantagem está no fato de ser produzido *in vitro* e, quando aplicado em ambientes fechados, persistir sob condições inadequadas. Tem sido verificado que as condições favoráveis para o seu desenvolvimento são umidade elevada (acima de 85%) e temperatura entre 20 e 25°C. Foi constatado também que os isolados mais virulentos de *V. lecanii* apresentavam conídios maiores, observando-se nestes isolados também maior crescimento do tubo germinativo (germinação mais rápida). Isso constitui uma vantagem, pois há, assim, tempo hábil para penetração no corpo do hospedeiro, antes mesmo de ocorrer a ecdise (Hall, 1981, 1984).

O fungo *V. lecanii* pode atacar um grande número de espécies de pulgões, havendo, obviamente, diferenças na suscetibilidade em função das próprias características de cada inseto, incluindo-se locais de abrigo e alimentação. São consideradas potencialmente controláveis pelo fungo as espécies *Diuraphis noxia*, *Metopolodium dirhodum*, *Sitobium avenae*, *Macrosiphoniella sanborni*, *Brachycaudus helichrysi*, *Mysus persicae* e *Aphis gossypii*.

No Brasil, já foi verificada a ocorrência epizootica de *V. lecanii* em populações de cochonilhas de citros e principalmente sobre *Coccus viridis* em cafeeiro, mantendo as populações dessa praga a nível de danos não-econômicos. Esse fungo já foi isolado de diversas espécies de pulgões, ocorrendo epizooticamente em 1985 sobre pulgões da cana-de-açúcar, no estado do Espírito Santo. O fungo parece ser inócuo ao homem e outros vertebrados, devido à sua baixa capacidade de crescimento sob temperatura acima de 37°C. Além disso, não tem sido observado colonizando insetos úteis ou de importância no controle biológico.

Além de *V. lecanii*, outros fungos têm sido constatados em populações de homópteros e alguns têm sido testados no controle aplicado desses insetos. Em estudos comparativos desenvolvidos por Feng *et al.* (1990) e Hayden *et al.* (1992), os fungos *V. lecanii*, *B. bassiana*, *Paezilomyces farinosus*, *C. obscurus* e *Erynia neoaphidis* foram avaliados, visando-se determinar a virulência para pulgões. O fungo *V. lecanii* foi o mais virulento, com CL de  $1,3 \times 10$  conídios/ml e com TL de 2,4 dias.

Comparativamente aos demais homópteros, os pulgões raramente são encontrados na natureza atacados por fungos entomopatogênicos do gênero *Beauveria*, tendo um dos relatos sido feito em 1983 (Pavlinshiu,

citado por Feng *et al.*, 1990). O potencial do fungo *B. bassiana* no controle de pulgões foi demonstrado pelos trabalhos desenvolvidos por Feng *et al.* (1990) e Dorshner *et al.* (1991), que testaram sua patogenicidade a diversas espécies de pulgões, incluindo *Schizaphis graminum*, *Metapolodium dirhodum*, *Dimaphis noxia*, *Rhopalosiphum maidis*, *Sitobium avenae*, *R. padi* e *Pleorodum humuli*. Testes em casa-de-vegetação com pulverizações sobre plantas de lúpulo revelaram a persistência do patógeno por até 4 semanas, mantendo o nível populacional dos pulgões praticamente no mesmo patamar observado no pico de mortalidade (segunda semana após aplicação, na concentração de 10 conídios/ml). No campo, porém, as condições de baixa umidade relativa (30%) e temperatura elevada (30°C) inibiram o desenvolvimento do patógeno. Formulações com umectantes podem ser uma alternativa para melhorar a eficiência do patógeno nessas condições.

Com o objetivo de melhorar o desempenho do patógeno no campo, foi testada em telados uma formulação peletizada, contendo micélio seco de *B. bassiana*, sendo os testes iniciais desenvolvidos em telados. Foi comprovada a estabilidade da formulação armazenada em condições ambiente, por cinco vezes. Nos bioensaios os pulgões foram inoculados com os "pellets" hidratados previamente por quatro dias, aplicados nas folhas do trigo junto às colônias. As plantas foram mantidas em alta umidade relativa (90 a 100%), obtendo-se cerca de 15% de mortalidade após nove dias da aplicação. Os autores também verificaram elevado número de cadáveres cobertos de conídios indicando a possibilidade de reinfestação nos indivíduos remanescentes (Knudsen *et al.*, 1990).

O fungo *Aschersonia aleyrodis* é um patógeno que ocorre naturalmente sobre aleirodídeos e coccídeos em pomares de citros e em algumas culturas anuais, deixando os insetos róseo-avermelhados. As epizootias aparecem em épocas de umidade elevada e podem ser afetadas pela utilização incorreta de defensivos químicos. É conhecido como fungo vermelho, sendo considerado um dos mais importantes entomopatógenos que atuam no controle de pragas na cultura dos citros. O fungo pode ser utilizado por introdução inoculativa, por incrementação onde já ocorra, e principalmente, através da manipulação do ambiente, utilizando defensivos seletivos. Testes vêm sendo realizados com esse patógeno envolvendo produção, bioensaios e testes de compatibilidade com defensivos químicos. Ataca cochonilhas (Coccidae) e mosca-branca (*dialeurodes citri* e *D. citrifolii*) (Aleyrodidae) na

fase conidial. O fungo *A. aleyrodis* é considerado o maior inimigo natural da mosca-branca em diversas regiões, sendo comuns as epizootias naturais (Browning & McCoy, 1994). Ferron (1978) fez referências a espécie *A. aleyrodis* como patógeno de coccídeos e aleirodídeos e mencionou o sucesso obtido com *A. placenta* no controle de *D. citri* na Caucásia e regiões do mar Negro, causando, sob condições favoráveis, 90% de mortalidade de ninfas.

No Brasil, a ocorrência do gênero *Aschersonia* sobre mosca-branca é muito comum, aparecendo em todas as regiões onde se cultivam citros. O fungo ataca a fase imóvel dos coccídeos e as ninfas das moscas-brancas. A época mais favorável às epizootias coincide com a de maior precipitação pluviométrica. Assim, o patógeno ocorre de novembro a fevereiro, nas condições do estado de São Paulo, e nos meses de maio a agosto, nos estados do Nordeste. Para favorecer a disseminação desse patógeno nos pomares cítricos, recomenda-se a estratégia de incrementação, representada pelo corte de galhos com insetos atacados e a sua distribuição sobre árvores do pomar. Na ex-União Soviética existe o produto comercial à base de *Aschersonia* denominado "Aseronija", produzido pela IAM (Kumo *et al.*, 1982).

O controle de coccídeo conhecido por piolho-de-São-José, *Quadraspidiotus perniciosus*, em rosáceas (pêssego, macieira, pereira) pode ser feito por *Podonectria (Sphaerostilbe)* e *Atractium flammeeun*. Esses fungos ocorrem em populações elevadas, atacando o coccídeo em pomares onde não se efetuam tratamentos químicos. Assim, nesses locais só devem ser feitas aplicações de inseticidas seletivos. São recomendadas introduções de inóculo usando galhos infestados com cochonilhas doentes ou aplicações de suspensões de conídios dos fungos (Alves, 1992).

Os Entomophthorales são fungos epizoóticos, rápidos e de difícil produção artificial.

Steinkraus *et al.* (1995) realizaram, pela primeira vez, estudos epizoóticos com *Neozygites fresenii* em populações de *Aphis gossypii* em campos de algodão, pois em observações preliminares verificaram a redução populacional de afídeos causada por este fungo em 5 a 10 dias, em áreas sem tratamento fitossanitário. Foram constatados, inicialmente, adultos alados infectados cerca de duas semanas antes da infecção de fêmeas ápteras, sugerindo ser a migração a forma pela qual o patógeno é introduzido nas diferentes populações. A redução po-

pulacional generalizada (formas ápteras e aladas) ocorreu após uma a três semanas da constatação dos alados infectados. Estudos também foram conduzidos em laboratórios, com *N. fresenii*, no sentido de se estimar os parâmetros ambientais envolvidos no seu desenvolvimento sobre *A. gossypii*. Verificou-se que a produção do fungo nos cadáveres foi favorecida pela combinação de temperaturas entre 20 e 25°C e umidade relativa na faixa de 89 a 100%, podendo nestas condições alcançar 100% de esporulação, após 18 horas.

Por não serem as condições exigidas tão rigorosas, é provável que o local em que esses insetos vivem proporcione umidade e temperatura adequadas para a sobrevivência dos capiloconídios, garantindo sua permanência no ambiente como focos primários (Steinkraus & Slaymaker, 1994).

As diferentes espécies do gênero *Entomophthora* (= *Esmputsa*) também atacam pulgões de importância agrícola. O gênero *Zoophthora* pode colonizar diversos tipos de hospedeiros, sendo mais comum em pulgões. As principais espécies são: *anglica*, *anhueinsis*, *aphidis*, *canadensis*, *humbeiri*, *lanceolata*, *occidentalis*, *orientalis*, *pentatomis*, *radicans* e *viridis*.

A espécie *Zoophthora radicans* (= *Erynia radicans* = *Entomophthora sphaerosperma*) é considerada altamente epizoótica e predomina sobre outras espécies de *Entomophthorales* que ocorrem em um mesmo hospedeiro. Esta é mais patogênica para o pulgão *Therioaphis trifolii maculata*, quando comparada com outras espécies da mesma classe, necessitando de 11,3 conídios/mm para eliminar 50% da população tratada, sendo capaz de provocar mortalidade em apenas 3 dias, após a inoculação (Milner & Soper, 1981; Milner *et al.*, 1984). Para o pulgão *Acyrtosiphon pisum* a CL de diversos isolados foi de 5,1 a 12,1 conídios por mm<sup>2</sup>, sendo que esse fungo formou rizóides e produziu esporos primários e esporos de resistência (Papierok *et al.*, 1984). A faixa de temperatura favorável ao fungo é de 15 a 20°C, sendo a faixa ótima de 20 a 25°C. O desenvolvimento da doença é dependente do período de orvalho e da densidade de insetos atacados pelo patógeno e em certas condições da densidade do hospedeiro (Leite, 1991).

O fungo *Cladosporium cladosporioides* é, segundo S. Sudo (comunicação pessoal), um excelente inimigo natural dos pulgões do fumo. Cerca de nove mil produtores já vêm utilizando esse patógeno para o controle dessa praga na região sul do país.

Em função de observações preliminares de epizootias de *Z. radicans* em populações da cigarrinha-verde-do-feijoeiro (*Empoasca kraemeri*), Galaini-Wraight *et al.* (1991) realizaram estudos sobre incidência e persistência do fungo em relação às condições ambientais (umidade relativa e temperatura), fatores ligados ao hospedeiro e também ligados ao patógeno (potencial de inóculo). Dentre as variáveis incidentes, a umidade relativa foi a determinante para a ocorrência da epizootia, sendo alcançados 55% de mortalidade de ninfas e 19% de adultos. Segundo os autores, apesar da eficiência do patógeno, o fato dos maiores danos causados da cigarrinha se concentrarem nos meses mais quentes e secos do ano constitui-se em um grande entrave à sua utilização. Estudos de estratégias de controle integrado devem ser desenvolvidos para se aproveitar o grande potencial desse fungo.

McGuire *et al.* (1987) realizaram estudos em campos de tomateiro nos EUA e concluíram que uma epizootia de *E. radicans* ocorreu na população de *Empoasca fabae*. O nível populacional da praga era alto no início do estudo, enquanto que a porcentagem de infecção era baixa. Decorridos 12 dias, a população da praga foi reduzida em 50%, e o nível de infecção cresceu de 10 a 94%.

Foram testados cinco hifomicetos entomopatogênicos em condições de campo, visando ao controle da cigarrinha-marrom, *Nilaparvata lugens*, em arroz. Suspensões de conídios de *M. anisopliae*, *M. flavoviridae*, *B. bassiana* e *Hirsutella citriformis* foram aplicadas na base de 4 a 5 x 10<sup>12</sup> conídios/ha. Também *M. anisopliae* e *Paecilomyces lilacinus* foram aplicados como preparações de micélio seco na dosagem de 1,5 a 2 kg/ha. A mortalidade dos insetos variou de 63 a 98%, três semanas após a aplicação. Não houve diferenças significativas entre as espécies fúngicas. As preparações de micélio esporularam na planta e foram tão efetivas quanto a suspensão de conídios (Rombach *et al.*, 1986).

Trabalhando com *N. lugens* e *Sogatodes orizicola* em condições de laboratório, Holdon *et al.* (1988) expuseram macrópteros (machos e fêmeas) a 48 isolados dos fungos *E. delphacis*, *E. radicans* e *Erynia* sp. Houve diferenças na eficiência entre as espécies e isolados, sendo *E. delphacis* a espécie mais promissora.

O potencial de fungos da ordem Entomophthorales foi também avaliado por Feng & Johnson (1991), expondo adultos de pulgões (*D.*

*noxia* e *M. dirhodeum*) aos esporos de isolados de *Pandora neoaphidis*, *Z. radicans*, *C. thromboides* e *C. coronatus*. Os isolados de *Conidiobolus thromboides* e *C. coronatus* apresentaram-se mais virulentos, além de outros dois isolados de *P. neoaphidis*.

Fungos do gênero *Batkoa* podem atacar epizooticamente as cigarrinhas-das-pastagens e da cana-de-açúcar *Mahanmarava fimbriolata* em diversos estados do Brasil. É muito provável que já tenham sido confundidos com *Entomophthora* (= Empusa).

Por meio de pulverizações em ultra-baixo volume, Aguda *et al.* (1987) aplicaram diferentes preparações de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *M. flavoviridae* com aproximadamente  $7,5 \times 10^{12}$  conídios/ha, em áreas de cultivo de arroz na Coreia, mantendo insetos adultos de *N. lugens* em gaiolas teladas colocadas na cultura. Após sete dias, verificaram drástica redução na população, a qual voltou a elevar-se, não ocorrendo uma segunda infecção. A persistência prolongada pode garantir a infecção de populações imigrantes que colonizaram a área.

Visando estabelecer o controle de *Aeneolamia vaira saccharina* em cana-de-açúcar, Allard *et al.* (1990) avaliaram, durante 6 meses, a persistência de *M. anisopliae*, aplicado nos talhões, na forma de arroz cozido (substrato de crescimento) + conídios. Não foram verificadas diferenças no nível populacional dos cercopídeos entre as parcelas tratadas e a testemunha. Os autores atribuem esse resultado à baixa população reinante no período de observação, que foi atipicamente precedido de uma época de chuvas com baixo índice pluviométrico. Entretanto, com o passar do tempo, verificou-se um aumento significativo no número de indivíduos infectados e mortos, que exibiam o corpo coberto por conídios, constituindo um provável foco primário da doença, importante para desencadear uma epizootia.

Quinze isolados do fungo entomopatogênio *V. lecanii*, de vários hospedeiros e localidades, foram testados no laboratório a  $19 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa acima de 95%, sobre larvas de quarto instar de *Trialeurodes vaporariorum* (Drummond *et al.*, 1987). Os isolados mais patogênicos geralmente vieram de moscas-brancas, por outro lado, não havendo correlação entre tamanho do conidiósporo, taxa de germinação em ágar e a patogenicidade. O efeito de períodos de baixa umidade (70% UR), seguidos de 16 ou 96 horas a mais de 95% de UR depois da colocação das larvas em discos de folhas de tomate em uma suspensão de  $1 \times 10^6$  esporos/ml, foi comparado para cinco isolados.

A diminuição progressiva da umidade reduziu significativamente a patogenicidade de todos os isolados. Assim, o "screening" de isolados de *V. lecanii*, em condições limitantes de umidade, promove uma avaliação mais crítica da patogenicidade e do seu potencial no controle de moscas-brancas, em casas-de-vegetação.

Novas alternativas têm sido estudadas para o controle de cochonilhas do coqueiro (*Helopeltis* sp.), transmissoras do vírus CSSV (Cocoa Swollen Shoot Virus). Assim, Brew (1992) fez uma série de levantamentos em áreas produtoras de coco em Gana. Embora não tenha identificado o agente etiológico, o autor imergiu insetos sadios em uma suspensão de esporos do fungo isolado de cadáveres coletados. Os insetos tratados viveram por apenas seis dias, enquanto na testemunha a sobrevivência prolongou-se por vinte dias. O autor sugeriu que, após a identificação, o fungo fosse produzido em larga escala e aplicado no coqueiral.

O gênero *Fusarium* (= *Atractium*) reúne um grupo de patógenos muito amplo e pode ocorrer sobre plantas e insetos. Cresce facilmente em meios de cultura, apresentando coloração amarela, laranja ou vermelha. Pode atuar como agente secundário de doenças. A fase sexual corresponde a *Nectria*.

As espécies de *Fusarium*, que ocorrem sobre insetos, comportam-se normalmente como patógenos fracos, exceto as que ocorrem em coccídeos, como *F. lateritium*, capaz de produzir toxinas semelhantes à Beauvericina. No Brasil, em pomares de pêsego, ocorre com grande intensidade sobre coccídeos a espécie *F. larvarum*. Também Arantes & Correia (1995) isolaram fungos do gênero *Fusarium* associados à cochonilha *Parlatoria ziziphus* em citros, em pomares de citros em Jaboticabal, SP. Também os gêneros *Tetracrium* e *Tetranacrium* ocorrem em cochonilhas e têm *Podonectria* como fase telemorfa.

Uma raça de *Coletotrichum gloeosporioides* que apresenta conídios com formato de halteres é, segundo C. Robbs (comunicação pessoal), um excelente inimigo natural de *Orthezia*, no Brasil. Assim, num estudo em pomar de laranja-pêra com seis anos de idade, Silva & Melo (1995) avaliaram a eficiência de estirpes de *C. gloeosporioides*, *B. bassiana* e *B. brongniartii* aplicadas em suspensão aquosa com pulverizador costal, em concentrações de aproximadamente  $10^7$  conídios/ml, no controle da cochonilha *Orthezia*. Os resultados evidenciaram uma taxa de mortalidade nas parcelas tratadas com os entomopatógenos, sendo,

aos 7 dias após a aplicação, de 84,9%, 87,3% e 86,9% respectivamente para os fungos testados.

O fungo *Aegerita* infecta cochonilhas e o gênero *Septobasidium* é um basidiomiceto que pode estar associado com cochonilhas. Considera-se que esse gênero mantém uma relação mutualística com a população de cochonilhas, porém, pode infectar ninfas desses insetos e provocar a esterilidade em fêmeas.

Além dos fungos, têm sido relatados na literatura alguns casos de infecções virais, sendo que esses entomopatógenos, por suas próprias características, exigem estudos mais detalhados.

Estudos preliminares revelaram que tais vírus pertenciam ao grupo dos Picornavírus. São vírus específicos dos pulgões, isolados em criações de laboratório ou casa-de-vegetação, não sendo encontrados na superfície ou em extratos das plantas hospedeiras de insetos infectados. Estudos fisiopatológicos demonstraram haver relação entre a infecção do inseto e a redução da longevidade e fecundidade, sendo muitas vezes as causas do insucesso nas criações. Verificou-se, posteriormente, que há insetos que apresentam distúrbios locomotores e paralisia, quando infectados pelo vírus. Em nenhum caso sugere-se seu emprego no controle microbiano de pulgões.

A transmissão ocorre principalmente na forma vertical (transovarialmente), sendo possível isolar partículas virais de ninfas recém-emergidas. Alguns trabalhos citam a possibilidade de transmissão por contato, através do "honeydew" produzido por indivíduos infectados. Comum em ambientes artificiais, sua incidência está relacionada à alta população e grande oscilação na temperatura, principalmente na faixa de 15 a 24°C. Maiores detalhes podem ser obtidos nos trabalhos de D'Arcy *et al.* (1981); Williamson *et al.* (1988); Williamson *et al.* (1989); Allen & Ball (1990); Lambsehn & Wechmar (1992).

### ***Hemiptera: Heteroptera***

Os efeitos dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Paecilomyces lilacinus* em populações do percevejo-preto-do-arroz (*Scotinophora coarctata*) foram estudados por Rombach *et al.* (1986a). Percevejos adultos foram testados, suspensões de conídios e micélio seco. O número de percevejos foi significativamente reduzido em todos os tratamentos, comparados com a testemunha, ao final de um

período de 9 semanas. O número de ninfas foi suprimido pelos fungos nos blocos bem irrigados. A performance geral das diferentes espécies de fungos foi semelhante, sendo sugerida a implementação de preparações de micélio seco dos fungos em programas de controle integrado desta praga.

### ***Thysanoptera***

Tripes da espécie *Taeniothrips inconsequens* têm se tornado um dos principais problemas nos EUA em florestas de *Acer saccharum* ("sugar mapple"), atingindo mais de 500.000 ha na região nordeste do país. Em um estudo sobre o manejo integrado da praga, buscou-se no ambiente de ocorrência a presença de inimigos naturais, que pudessem incrementar o controle da praga. Com base em observações feitas na Califórnia, verificou-se a ocorrência do fungo *V. lecanii* em ninfas no solo. Nas regiões amostradas, o maior percentual de infecção foi próximo de 22%, que pode ser considerado satisfatório (Schinner *et al.*, 1991).

Também isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* podem ser selecionados para o controle das espécies-pragas de tripes. Devido à facilidade de produção, estes dois patógenos têm grande potencial.

### ***Hymenoptera***

A vespa-da-madeira, *Sirex noctilio*, tem sido combatida extensivamente na Austrália, a partir dos anos 60, por meio de um programa nacional, porque é associada simbioticamente ao fungo fitopatogênico *Amylostereum areolatum*, inoculado na oviposição. Tal programa foi adaptado e introduzido no Brasil quando a vespa foi aqui detectada, no final da década de 80, sendo também criado pela EMBRAPA, Ministério da Agricultura e empresas florestais, um programa de controle de praga (Ribas Jr., 1993; E.T. Iede, comunicação pessoal), relatado no item 4.

### ***Acari***

A bactéria *Bacillus thuringiensis* tem sido estudada como potencial para o controle de ácaros, principalmente da família Tetranychidae. Testes de laboratório e um estudo em casas-de-vegetação foram conduzidos por Hall *et al.*, 1971, para determinar a resposta do ácaro

vermelho dos citros à  $\beta$ -exotoxina de *B. thuringiensis*. Os resultados mostraram que a função tóxica produziu alta mortalidade nos ácaros adultos. Ovos e formas imaturas foram igualmente afetados. Os estudos em casas-de-vegetação demonstraram que o material testado foi tóxico em pelo menos 45 dias após a aplicação.

Hoy & Ouyang (1987), baseando-se em relatos anteriores, avaliaram em laboratório o efeito da  $\beta$ -exotoxina produzida por *B. thuringiensis*, na forma de produto comercial (formulação do tipo concentrado emulsionável), sobre as diferentes fases do desenvolvimento do ácaro *Tetranychus pacificus*. Houve efeito na sobrevivência de fêmeas adultas, bem como na sua fecundidade (chegando à ausência total de postura na dosagem quatro vezes maior que a recomendada). As larvas expostas sofreram sensível redução na viabilidade, não chegando à fase adulta. Algumas protoninfas foram obtidas dos ovos tratados, mas também nenhuma chegou à fase adulta.

Visando determinar a toxicidade de *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* ao ácaro rajado, *Tetranychus urticae*, Chapman & Hoy (1991) realizaram ensaios em laboratório, aplicando uma formulação comercial suspensa em águas sobre discos foliares, que foram fornecidos a fêmeas adultas e também a formas imaturas. Não foi observado nenhum efeito na eclosão e desenvolvimento das larvas e os adultos mostraram-se normais frente ao patógeno, não tendo sua fecundidade afetada e nem sendo observada mortalidade que diferisse da testemunha.

Fungos do tipo *Hirsutella* (= *Synnematium*, *Desmidiospora* etc.) podem atacar diversos grupos de ácaros. O estado sexual (telemorfo) desse fungo pode ser *Cordyceps*, *Torrubiella* etc. A espécie mais comum é *H. thompsonii*, conhecida desde 1924, quando foi observada provocando doença em populações do ácaro da ferrugem *Phyllocoptruta oleivora*, segundo Speare & Yothers, por McCoy (1981).

Esse patógeno é bastante específico para ácaros e, em especial, eritofiídeos tetraniquídeos. Dentre os hospedeiros importantes citam-se *P. oleivora*, *Eriphyes sheldoni*, *Eutetranychus Bankii*, *Panonychus citri* e outros.

O patógeno desenvolve-se numa faixa de temperatura de 25 a 30°C com ótimo de 27°C. A umidade relativa favorável à infecção está entre 90 e 100% e as epizootias naturais estão diretamente correlacionadas com épocas chuvosas e com elevada densidade de hospedeiros.

Os resultados experimentais do uso de *H. thompsonii* para controle de ácaros podem ser considerados razoáveis. Há necessidade, porém, de epizootiologia, envolvendo condições favoráveis para a aplicação como temperatura, umidade e níveis de infestação da praga. Também é importante o desenvolvimento de processos e meios adequados para produção desse patógeno, sendo a produção em meio líquido, visando a obtenção de micélio seco, a mais promissora. Existe também a possibilidade de aumentar a população do fungo em pomares cítricos situados em regiões ecologicamente favoráveis ao patógeno, manipulando o ecossistema. Assim, algumas medidas poderão ser adotadas, como a utilização de defensivos seletivos ao patógeno e a tolerância de níveis mais elevados da praga.

Esse fungo não tem sido observado infectando ácaros predadores. Silva *et al.* (1981) evidenciaram a seletividade de *H. Thompsonii* sobre o ácaro predador de *Phyllocoptruta oleivora*, o fitoseídeo *Iphiseiodes quadriplis*.

O laboratório americano Abbot já produziu experimentalmente o produto Mycar, à base de *H. Thompsonii*. Trata-se de uma formulação pó molhável recomendada na base de 2,5 a 5,0 kg/ha. Essa formulação já foi utilizada em pequenos experimentos no Brasil e, como a maioria das formulações de fungos, apresentou problemas de estabilidade.

Os fungos do gênero *Neozygites* também são importantes patógenos de ácaros. As espécies mais comuns são *N. adjarica*, que ataca *Tetranychus urticae*, e *N. fresenii*.

No Brasil, esse gênero também causa doenças em ácaros. No ácaro-verde-da-mandioca vem causando epizootias, com redução das populações do ácaro em até 85%, tendo sido constatado pela primeira vez sobre esse hospedeiro nas condições da Venezuela (Agudelo-Silva, 1986; Delalibera, 1996). Apesar de sua eficácia em campo, seu emprego prático vem sendo limitado pela falta de estudos epizootiológicos e dificuldades de produção, tanto no hospedeiro como *in vitro*, pesquisados exaustivamente em projeto que vem sendo desenvolvido pela EMBRAPA.

Os fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Paecilomyces* spp. surgem como alternativas biológicas importantes para serem utilizadas em programas de controle de ácaros, usando produtos microbianos (introdução inundativa), tanto em casa-de-vegetação como em campo.

## UTILIZAÇÃO PRÁTICA DE ENTOMOPATÓGENOS NO CONTROLE DE INSETOS

### Cigarrinhas-da-cana-de-açúcar

O controle microbiano das cigarrinhas-da-cana-de-açúcar e das pastagens é um bom exemplo da utilização prática de patógenos no controle de insetos toxicogênicos. Milhares de hectares dessas gramíneas são tratados anualmente com *M. anisopliae* visando ao controle dessas pragas.

As cigarrinhas *M. posticata* e *M. fimbriolata* (Hemiptera, Cercopidae) são as principais pragas da cana-de-açúcar. A primeira espécie é conhecida como cigarrinha-da-folha e ataca a parte aérea das plantas; a segunda é a cigarrinha-da-raiz e o seu ataque se localiza nas primeiras raízes ao nível do solo. No Brasil ocorrem causando prejuízos econômicos em culturas localizadas nos estados de São Paulo (*M. fimbriolata*), Rio de Janeiro, Espírito Santo e região nordestina, onde somente a espécie *M. posticata* incide em aproximadamente 800.000 ha da cultura. Nessa região causam, em função de seu hábito alimentar da sua fitotoxímia, prejuízos de 11% na produção agrícola e 15% no rendimento industrial (Marques *et al.*, 1981).

Isolados de *M. anisopliae* têm sido selecionados para o controle de *Mahanarva posticata*. Assim, o Departamento de Entologia da ESALQ/USP já selecionou diversas raças de *M. anisopliae* para serem utilizadas no controle de cigarrinha-da-cana-de-açúcar no Nordeste, sendo as mais promissoras PL-43, PL-88, PL-95 e PL-121. As usinas do Nordeste e a Biotec vêm produzindo o isolado PL-43 com excelentes resultados de controle.

Os primeiros resultados positivos de controle da cigarrinha-de-folha com o fungo *Metarhizium anisopliae* foram obtidos em 1969 e, a partir de 1975, iniciou-se a instalação de laboratórios setoriais para a produção do fungo nas usinas de Pernambuco (Marques *et al.*, 1981).

A estratégia utilizada inicialmente foi a introdução inoculativa, pela implantação de campos de dispersão do patógeno. Assim, de 1970 a 1972, foram instalados na região canavieira do estado de Pernambuco 118 campos de dispersão, abrangendo uma área de aproximadamente 400 ha, tratados com pulverizadores terrestres, e nove campos com

112 ha, tratados com pulverizações aéreas. Decorridos 15 a 20 dias de aplicação, observaram, para as aplicações aéreas, mortalidades de ninfas e adultos superiores a 80% e para as terrestres foram registradas médias de mortalidade de ninfas de 30 a 40% e de 20 a 30% para adultos (Guagliumi, 1971; Guagliumi *et al.*, 1974)

Foram produzidos pelo IAA/PLANALSUCAR, IPA e demais laboratórios setoriais instalados no estado de Pernambuco 38.000 kg de conídios de *M. anisopliae*, os quais foram aplicados em uma área de 474.000 ha, de cana-de-açúcar infestada pela cigarrinha *M. posticata*. Na região canavieira do estado de Alagoas, no período de 1977 a 1991, foram pulverizados aproximadamente 670.000 ha infestados pela cigarrinha, havendo uma redução de aproximadamente 72% nos índices de manifestação da cigarrinha-da-cana-de-açúcar, proporcionada pela aplicação do fungo. Inicialmente a área tratada com inseticidas químicos era de 150.000 ha/ano. À medida em que foi incrementada a aplicação do fungo, a área tratada com químicos foi reduzida para uma média de 30.000 ha. Nos últimos anos essa média foi de aproximadamente 12.000 ha, correspondendo a menos de 10% da área tratada inicialmente (Marques, 1992).

Essa redução no uso de químicos foi determinante na compatibilização do controle integrado das pragas da cana-de-açúcar, contribuindo para a proteção dos parasitóides liberados para controle da broca (*Diatraea* spp.) e dos predadores de ocorrência natural.

## Epizootiologia e Desenvolvimento da Doença

O inóculo proveniente das aplicações do fungo ou propágulos oriundos das diferentes fontes de inóculo servem para contaminar as primeiras ninfas ou adultos. Assim, a doença se inicia com a imigração de adultos contaminados que, após a morte, caem no “olho” da cana ou nas bainhas das folhas superiores do ponteiro. Nesses locais, o fungo esporula sobre os cadáveres, sendo os conídios levados pela água da chuva, orvalho ou vento para as outras partes da planta (principalmente as partes inferiores do colmo). Nessa ocasião, as ninfas novas que eclodiram dos ovos colocados nas folhas velhas, no solo ou nas folhas baixas das plantas, estão subindo pelo colmo em direção ao “olho” da cana, quando entram em contato com uma elevada quantidade de inóculo produzida pelos cadáveres. Além disso, a espuma

abundante liberada pelas ninfas cria um ambiente favorável ao patógeno. Muitas dessas ninfas morrem, formando os focos primários da doença; outras dão adultos contaminados, que disseminam a doença pelo canavial.

Em condições de campo, o patógeno necessita de umidade relativa elevada para causar a doença, o que coincide com o período chuvoso do Nordeste. Também é importante que ocorram alguns veranicos dentro desse período, para a melhor disseminação dos conídios do fungo. A faixa de temperatura favorável pode ser considerada entre 25 e 27°C (Alves, 1986).

### **Aplicação do fungo e resultados obtidos**

A linhagem que vem sendo aplicada (PL-43) foi selecionada através de bioensaios, partindo-se de um grande número de isolados coletados na região. Essa linhagem foi devidamente caracterizada, através de métodos biológicos e bioquímicos. Um estoque do patógeno deve ser sempre mantido para evitar a perda da identidade da linhagem. Assim, não se deve aplicar o fungo no campo e depois coletar os insetos infectados para isolamento e sua reutilização. Os bioensaios para a comprovação da virulência do material armazenado, que utiliza-se como inóculo, devem ser feitos em condições controladas em laboratórios, usando-se insetos constatatadamente do patógeno.

A época de aplicação do fungo deverá coincidir com o período chuvoso do ano, que vai de julho a agosto na região nordestina, e com o aparecimento das cigarrinhas nos canaviais. O índice mínimo, a partir do qual devem ser efetuadas as aplicações, ainda não foi bem determinado. Porém, deve-se ter no mínimo 5 ninfas por planta, não sendo consideradas as ninfas do "cartucho". Com relação aos intervalos de aplicação, consideram-se econômicos intervalos de 30 dias. O ideal seria que a aplicação coincidisse com o período de maior trânsito das ninfas nos colmos.

A estratégia utilizada no controle é a incrementação, já que o patógeno encontra-se presente na areia. Assim, podem ser utilizadas doses entre  $2,0 \times 10^{12}$  e  $5,0 \times 10^{12}$ , ou seja, aproximadamente 200 a 500 gramas de conídios do fungo por hectare.

As aplicações podem ser efetuadas via terrestre, usando atomizadores, com gasto de 50 a 200 litros de água/ha. Nas aplicações via

aérea, gastam-se 20 a 30 litros de água/ha, realizando-se vôos de dois a cinco metros acima do nível superior da cana. O emprego de ultraleves, devidamente adaptados para essa tarefa, deverá facilitar o trabalho de controle.

Outro tipo de controle que poderá ser empregado é a colonização. Consiste na liberação de ninfas e adultos contaminados no início do período chuvoso. Esses insetos seriam inoculados no laboratório, com a raça adequada de fungo, e após dois dias, liberados no campo. Os adultos doentes, caindo nas axilas das folhas, serviriam de fonte de inóculo para a formação dos focos primários da doença, importante para o desencadeamento da epizootia.

É necessário enfatizar que as preparações do fungo ainda são muito rudimentares. Assim, trabalhos nessas áreas são importantes para a melhoria da eficácia do patógeno.

A formulação granulada BIO 1020, preparada com micélio seco pela Bayer, na Alemanha, poderia resultar em um controle mais eficiente, já que esses grânulos conseguiriam esporular facilmente nas axilas das folhas, onde ficariam retidos após a aplicação.

A introdução de *M. anisopliae* para o controle das cigarrinhas-da-cana-de-açúcar no Nordeste vem trazendo resultados positivos. Por ser a cana uma cultura semiperene e implantada em grandes áreas, a aplicação contínua de inseticidas químicos, como vinha sendo feita, poderia levar a um desequilíbrio biológico irreparável a esse agroecossistema.

Os resultados das aplicações variam de acordo com a localização das culturas e com a ocorrência das chuvas na região. Assim, no estado de Alagoas, o melhor desempenho na região do litoral norte se registra nos meses de maio, junho e julho. Para a região Centro-sul, o melhor desempenho do patógeno ocorre no mês de julho. Também observou-se a influência negativa das altas precipitações pluviométricas e dos períodos longos de estiagem sobre o desencadeamento nas populações da praga.

## Cigarrinhas-das-pastagens

As cigarrinhas do gênero *Deois*, *Zulia* e *Mahanarva fimbriolata* (em capim Napier) são as principais pragas das pastagens no Brasil. Altamente fitotóxicas, são responsáveis por até 60% na capacidade de suporte de milhões de hectares de pasto. Pode-se afirmar que

reduzem a produção de massa verde em cerca de 15% e, em consequência, danificam uma área que poderia alimentar milhões de bovinos por ano.

### Controle Integrado

O controle químico das cigarrinhas pode se tornar antieconômico em grandes áreas, em decorrência da baixa eficiência desse produto sobre as ninfas do inseto e do número elevado de aplicações que devem ser executadas.

Além desse aspecto, deve-se considerar o problema da poluição ambiental. As consequências diretas das aplicações dos inseticidas químicos são os resíduos no leite e na carne. Também precisam ser considerados os problemas ecológicos relativos à eliminação da fauna silvestre e dos insetos parasitos e predadores. Por outro lado, sabe-se que atualmente não existe medida isolada de controle que propicie uma redução do nível populacional da praga, evitando os problemas econômicos.

Por esses motivos, o controle da praga deve ser executado integrando uma série de medidas, englobando o manejo das pastagens, a proteção dos inimigos naturais e a aplicação do fungo *M. anisopliae* em áreas ecologicamente favoráveis, visando à redução da população desses cercopídeos a níveis de danos não-econômicos.

As principais medidas a adotar podem ser resumidas nas seguintes:

- a) manutenção da vegetação nativa nas grotas ou formação das pastagens com faixas de árvores, visando dar abrigo aos predadores;
- b) adubação de formação e manutenção das pastagens;
- c) divisão das pastagens;
- d) emprego de gramíneas nativas ou resistentes em associação com gramíneas suscetíveis;
- e) manutenção das gramíneas a uma altura mínima de 25 cm observando-se as suas características específicas;
- f) durante o ciclo da praga, nos locais de postura demarcados anteriormente:
  - redução da população na primeira geração, aplicando inseticida seletivo ao fungo e outros inimigos naturais da cigarrinha;
  - aplicação de *M. anisopliae* sobre a segunda e terceira gerações de ninfas;

- se a população de adultos for elevada na terceira geração, aplicar inseticida seletivo em associação com *M. anisopliae*.

## Dosagem e Modo de Aplicação de *M. anisopliae*

O fungo pode ser aplicado na formulação pó molhável, na dose mínima de  $5,0 \times 10^{12}$  por ha, que corresponde a aproximadamente 500 g de conídios puros. As aplicações devem ser executadas com o aparecimento da segunda ou terceira geração de ninfas. As aplicações sobre as gerações mais populosas de ninfas tendem a dar maiores índices de controle. O controle deve, portanto, visar sempre a fase de ninfa, que é mais suscetível ao ciclo biológico do inseto. As aplicações poderão ser executadas com pulverizadores terrestres, gastando 200 a 300 litros de água/ha.

O tratamento se torna mais eficiente se for executado em pastagens de 25 a 40 cm de altura, para evitar a ação indesejável da radiação ultravioleta sobre o fungo. Elevada umidade, seguida de veranicos e temperatura na faixa de 25 a 27°C são condições indispensáveis para obtenção de bons resultados no controle.

Também é indispensável determinar quais são os topoclimas mais favoráveis à ocorrência do patógeno, para que o mesmo possa ser aplicado visando sua maior persistência.

## Resultados de Controle

Apesar de existirem algumas pesquisas que mostram altas porcentagens de controle de cigarrinha-das-pastagens por *M. anisopliae*, o mais comum é a obtenção de índices entre 10 e 60%. Esses resultados são excelentes, considerando que, na prática, executa-se apenas uma aplicação do fungo, com dosagens muito baixas de conídios por hectare (100 a 500 g). Além disso, a eficiência do fungo, em regiões ecologicamente favoráveis, supera o efeito real dos inseticidas químicos, em termos de evolução da praga. Para a obtenção de melhores resultados de controle da cigarrinha com *M. anisopliae* ainda são necessários estudos sobre os seguintes aspectos:

- a) epizootiologia, envolvendo as condições adequadas de temperatura e umidade por ocasião da aplicação, persistência em campo e seleção de raças adaptadas para alguns topoclimas;

- b) antecipação das epizootias, já que o fungo normalmente ocorre em condições naturais quando a manifestação da praga torna-se elevada e os danos já ocorreram;
- c) dosagens que proporcionem controle eficiente em regiões ecologicamente favoráveis ao patógeno;
- d) formulação e armazenamento em condições ambientes a longo prazo;
- e) desenvolvimento de novas estratégias para sua utilização.

Esses estudos, principalmente os que se referem à antecipação de focos primários, dosagens e formulações, serão decisivos para o futuro de *M. anisopliae* como inseticida microbiano.

Também a procura e exploração de outros patógenos, como os Entomophthorales (*Batkoa* sp.), devem ser estimuladas para o controle das cigarrinhas.

### Controle da Cigarrinha-verde-do-feijão

O Instituto Biológico de São Paulo vem estudando a possibilidade da utilização do fungo *Zoophthora radicans* no controle da cigarrinha-verde-do-feijão *Empoasca* sp. (Homoptera:Cicadelidae). Trabalhos desenvolvidos por Leite (1991), na região de Capão Bonito, no período da seca, demonstram a possibilidade do controle do inseto pela aplicação desse fungo na dosagem de 1 g de micélio seco por m<sup>2</sup>, distribuídos em 4 pontos de 4 m<sup>2</sup> cada, por hectare, o que representa 16 gramas de micélio por hectare. A infecção chegou a atingir 80% da população do inseto. A grande vantagem é que esse patógeno altamente epizoótico pode colonizar rapidamente qualquer densidade de insetos existente na sua área, partindo de uma baixa quantidade de inóculo.

### Controle da Vespa-da-madeira

A EMBRAPA-CNPF desenvolveu um controle da praga e são utilizadas diversas técnicas, integrando o monitoramento constante nas áreas de cultivo, com vista a detectar precocemente a vespa e eliminar as árvores infestadas. Vem sendo também preconizado o uso de nematóide entopatogênico da família Neothylenchidae, *Delamus siricidicola*. Esse nematóide ocorre na natureza, infestando as larvas da vespa e causando infertilidade (castração parasitária) (Bedding, 1984; Mendes, 1992).

Para atender à demanda de campo, o nematóide pode ser produzido em meio artificial, segundo Bedding & Akhurst (1974). O método é bem sucedido e baseia-se na produção do fungo *Amylostereum areolatum* (simbionte de nematóide), a partir de inóculo extraído de glândulas micetófagas da fêmea da vespa, que é distribuído em placas de Petri contendo meio de cultura (BDA). Quando o fungo coloniza a superfície do meio, este recebe o nematóide na forma infectiva, que, então, se alimenta e se desenvolve neste meio-ambiente. O armazenamento do produto obtido pode ser feito durante 6 a 12 meses a 5°C.

Outro sistema de produção é baseado na substituição do meio BDA por grãos de trigo. O substrato é autoclavado em frascos de 500 ml (100 g de trigo e 150 ml de água) e, em seguida, inoculado com o nematóide e o fungo, sendo possível produzir de 3 a 10 milhões de larvas infectivas/frasco (Evans, 1970; Bedding, 1984).

Segundo Diodato (1995), a aplicação do nematóide é feita após a detecção da vespa na área, usando-se árvores-armadilha. Estas são árvores estressadas pela retirada da casca e pela aplicação de herbicidas no corte, que assim tornam-se atrativas para a vespa. Dentro da árvore, os nematóides movimentam-se pela madeira até encontrarem as larvas do inseto, infectando-as.

De acordo com o E.T. Iede (comunicação pessoal), a área atual atacada pela praga é de 200.000 ha, abrangendo todos os estados do sul do Brasil, onde há florestas de *Pinus*. Seu console, baseado nas orientações do Programa Nacional de Controle à Vespa-da-madeira, vem aumentando em eficiência, partindo dos 10% iniciais (1989) para 30% em 1992. O envolvimento de empresas privadas, pequenos reflorestadores e a EMBRAPA-CNPQ tem resultado em maior aceitação e ampliação do programa; além disso, novas linhagens vêm sendo testadas ("Kamona", proveniente da Austrália e "Encruzilhada", isolada no Rio Grande do Sul) e aguardam-se mais elevados níveis de controle, próximos de 80%, obtidos em testes preliminares com tais linhagens.

Constatou-se ainda a ocorrência, no ano de 1989, de um grande número de indivíduos de *S. noctilio* infectados pelo fungo *B. bassiana*. Foram feitos levantamentos, a fim de se avaliar a incidência de patógeno. Foi constatado maior número de larvas infectadas (23,8%) que de pupas e adultos (juntos não alcançaram 10%), que pode ser considerado um bom nível de controle natural. A maior suscetibilidade foi verificada

em larvas, nos instares iniciais, com níveis de mortalidade próximos a 100% nas três concentrações testadas,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/ml. As larvas desenvolvidas foram mais afetadas quando submetidas à concentração de  $10^8$  conídios/ml (Diodato, 1995).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, J.; WEGNIILLER, O. A atividade do casal de *hypocryphalus mangiferae* (Stebbing) na construção da célula de oviposição. **O Biológico**, v.13, p.57-58, 1947.
- AGUDA, R.M.; ROMBACH, M.C.; IM, D.J.; SHEPARD, B.M. Supression of populations of the brow planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hom., Delphacidae) in field cages by entomogenous fungi (Deuteromycotina) on rice in Korea. **Journal of Applied Entomology**, v.104, p.167-172, 1987.
- AGUDELO-SILVA, P.A. Species of *Triplosporium* (Zygomycetes: Entomophthorales) infectig *Mononychellus progresivus* (Acari: Tetranychidae) in Venezuela. **Florida Entomologist**, v.69, p.167-172, 1987.
- ALLARD, G.B.; CHASE, C.A.; HEALE, J.B.; ISAAC, J.E.; PRIOR, C. Field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a mycoinsecticide for control of sugarcane froghopper, *Aeneolamia varia saccharina* (Hemiptera: Cercopidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.55, p.41-46, 1990.
- ALVES, S.B. Fungos entopatogênicos. In: ALVES, S.B., coord. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Manole, 1986. p.73-126.
- ALVES, S.B. Perspectivas para utilização de fungos entopatogênicos no controle de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, p.77-86, 1992.
- AMANTE, E.; VULCANO, A.; ABRAHÃO, J. Observações preliminares sobre a influência da entomofauna na dispersão dos endosporos da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*). **O Biólogo**, v.37, p.102-105, 1971.
- ANANTHAKRISHAN, T.N. Thrps. In: HARRIS, K.F.; MARAMOROSCH, K. **Vectors of plant pathogens**. New York: Academic Press, 1980. p.149-164.
- ARANTES, A.M.V.T.; CORREA, A.C.B. Ocorrência do fungo *Fusarium* sp. associado a cochonilha *Parlatoria zizphus* (Lucas) (Hemiptera: Diaspididae) em citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 15., Caxambu, 1995. **Resumos**. Londrina: Sociedade Entomológica do Brasil, 1995. p.336.
- BATRA, L.R.; STAVELY, J.R. Attraction of twospotted spider to bean rust uredina. **Plant Disease**, v.78, p.282-284, 1994.
- BEDENDO, I.P. Protozoários. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. ed. **Manual de Fitopatologia**. Piracicaba: Ceres, 1995. v.1.
- BEDDING, R.A.; AKHURST, R.J. Use of *Deladenus siricidicola* in the biological control of *Sirex noctilio* in Australia. **Journal of the Australian Entomological Society**, v.13, p.129-135, 1974.
- BEDDING, R.A. Netatodes parasites of Hymenoptera. In: NICKLE, W.R., ed. **Plant and insect nematodes**. New York: marcel Dekker, p.755-796.
- BREW, A. Towards the use of pathogenic microorganisms in the control of some cocoa insect pests in Ghana. **Cocoa Grower's Bulletin**, v.45, p.26-30, 1992.
- CHAPMAN, M.H.; HOY, M.A. Relative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* to the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) and its predator *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acari, Tetranychidae and Phytoseidae). **Journal of Applied Entomology**, v.111, p.147-154, 1991.
- COSTA, A.S. Transmissão de agentes fitopatogênicos por insetos. s.l.: s.c.p., 1973. **Apostila**. 324p.
- DELALIBERA JR., I. Distribuição geográfica, métodos de produção e epizootiologia de *Neozygites* sp., patógeno do açúcar verde da mandioca, *Mononychellus tanajoa* (Bondar). Piracicaba: ESALQ/USP, 1996. 96p. Dissertação de Mestrado.
- DIODATO, M.A. Controle da vespa-da-madeira. **Ciência Hoje**, v.19, p.21-24, 1995.
- DORSCHNER, K.W.; FENG, M.; BAIRD, C.R. Virulence of an aphid-derived isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) to the hop aphid, *Phorodon humuli* (Homoptera: Aphididae). **Environmental Entomology**, v.20, p.690-693, 1991.
- DRUMOND, J., HEALE, J.B.; GILLESPIE, A.T. Germination and effect of reduced humidity on expression of pathogenicity in *Verticillium lecanii* against the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. **Annals of Applied Biology**, v.111, p.193-201, 1987.
- EVANS, A.A.F. Mass culture of mycophagous nematodes. **Journal of Nematology**, v.2, p.99-100, 1971.
- FENG, M.G.; JOHNSON, J.B. Relative virulence of six isolates of *Beauveria bassiana* on *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). **Environmental Entomology**, v.19, p.785-790, 1990.
- FENG, M.G.; JOHNSON, J.B. Bioassay of four Entomophthoraceae fungi (Entomophthorales) against *Diuraphis noxia* and *Metopolodum deihodum* (Homoptera: Aphididae). **Environmental Entomology**, v.20, p.338-345, 1991.
- FENG, M.G.; JOHNSON, J.B.; KISH, L.P. Virulence of *Verticillium lecanii* and an aphid-derived isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) for six species of cereal-infesting aphids (Homoptera: Aphididae). **Environmental Entomology**, v.19, p.815-820, 1990.

- FENG, M.G.; JOHNSON, J.B.; HALBERT, S.E. Natural control of cereal aphids (Homoptera: Aphididae) by entomopathogenic fungi (Zygomycetes: Entomophthorales) and parasitoids (Hymenoptera: Braconidae and Encyrtidae) on irrigated spring wheat in southwestern Idaho. **Environmental Entomology**, v.20, p.1699-1710, 1991.
- FENG, M.G.; NOWIERSKI, M.; JOHNSON, J.B.; POPRAWSKI, T.J. Epizootics caused by entomophthorales fungi (Zygomycetes, Entomophthorales) in populations of cereal aphids (Hom., Aphididae) in irrigated small grains of southwestern Idaho, USA. **Journal of Applied Entomology**, v.113, p.376-390, 1992.
- FERMAUD, M.; GAUNT, R.E.; ELMER, P.A.G. The influence of Thrips obscuratus on infection and contamination of kiwifruit by *Botrytis cinerea*. **Plant Pathology**, v.43, p.953-960, 1994.
- FRAZER, H.L. Observation on the method of transmission on internal boll disease of cotton by the cotton stainer bug. **Annals of Applied Biology**, v.31, p.271-290, 1994.
- GILLESPIE, D.R.; MENZIES, J.G. Fungus gnats vector *Fusarium oxysporum* f. sp. radiclesycopresici. **Annals of Applied Biology**, v.123, p.593-594, 1993.
- GOLDBERG, M.P.; STANGHELLINI, M.E. Ingestion-egestion and aerial transmission of *Phytophthora aphanidreum* by shore flies (Ephydriidae: *Scatella stagnalis*). **Phytopathology**, v.80, p.1244-1246, 1990.
- GUAGLIUMI, P. As cigarrinhas dos canaviais (Hom., Cercopidae) no Brasil. VIII Contribuição: Luta integrada contra as "Cigarrinhas-da-cana e das-pastagens" no Nordeste do Brasil. Recife, 1971. 43p.
- GUAGLIUMI, P.; MARQUES, E.J.; VILLAS-BOAS, A.M. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium posticata* (Stal) no Nordeste do Brasil. Recife: CODECAP, 1974. 54p. (Boletim Técnico CODECAP, 3).
- HALL, R.A. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scale. BURGESS, H.D., ed. **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. London: Academic Press, 1976. p.483-498.
- HALL, R.A. Control of aphids by the fungus, *Verticillium lecanii*: effect of spore concentration. **Entomology Experimentalis et Applicata**, v.27, p.1-5, 1980.
- HALL, R.A. Control of whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* and cotton aphid, *Aphis gossypii* in glasshouses by two isolates of the fungus, *Verticillium lecanii*. **Annals of Applied Biology**, v.101, p.1-11, 1982.
- HALL, R.A. Epizootic potential for aphids of different isolates of the fungus, *Verticillium lecanii*. **Entomophaga**, v.29, p.311-321, 1984.
- HALL, R.A.; BURGESS, H.D. Control of aphids in glasshouses with the fungus, *Verticillium lecanii*. **Annals of Applied Biology**, v.93, p.235-246, 1979.
- HIRUKI, C. Plant diseases associated with mites as vectors of known viruses and unknown etiological agents. In: MARAMOROSCH, K., ed. **Plant diseases of viral, viroid, mycoplasma and uncertain etiology**. San Francisco: Westview Press, 1992. p.127-156.
- HOLDOM, D.G.; TAYLOR, P.S.; SOPER, R.S. Activity of entomophthoran fungal isolates (Zygomycetes) against *Nilaparvata lugens* and *Sogatodes orizicola* (Homoptera: Delphacidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.52, p.221-230, 1988.
- HOY, M.A.; OUYANG, Y. Toxicity of the  $\beta$ -exotoxin of *Bacillus thuringiensis* to *Tetranychus urticae* and *Metatseius occidentalis* (Acari: Tetranychidae and Phytoseiidae). **Journal of Economic Entomology**, v.80, p.507-511, 1987.
- HSIAO, W.F.; BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURINUS, G.G. Effect of temperature and relative humidity on the virulence of the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii*, toward the oat-bird berry aphid, *Rhopalosiphum padi* (Hom., Aphididae). **Journal of Applied Entomology**, v.114, p.484-490, 1992.
- KENNEDY, R.W.; LACY, G.H. Phytopathogenic prokaryotes: an overview. In: MOUNT, M.S.; LACY, G.H., ed. **Phytopathogenic Prokaryotes**. New York: Academic Press, 1982. v.1, p.3-17.
- KISH, L.P.; MAJCHROWICZ, I.; BIEVER, K.D. Prevalence of natural fungal mortality of green peach aphid (Homoptera: Aphididae) on potatoes and nonsolanaceous hosts in Washington and Idaho. **Environmental Entomology**, v.23, p.1326-1330, 1994.
- KNUDSEN, G.R.; JOHNSON, J.B.; ESCHEN, D.J. Alginate pellet formulation of a *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) isolate pathogenic to cereal aphids. **Journal of Economic Entomology**, v.83, p.2225-2228, 1990.
- LEACH, J.G. **Insect transmission of plant diseases**. New York: McGraw-Hill, 1940. 615p.
- LEE, F.N.; TUGWELL, N.P.; FANNAH, S.J.; WEIDEMANN, G.J. Role of fungi vectored by rice stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) in discoloration of rice kernels. **Journal of Economic Entomology**, v.86, p.549-556, 1993.
- LEITE, L.G. Efeito de alguns fatores que afetam a epizootia de *Zoophthora radicans* e utilização do fungo para o controle de *Empoasca* sp. Piracicaba: ESALQ/USP, 1991. 118p. (Dissertação de Mestrado).
- LEVIEUX, J.; LIEUTIER, F.; MOSER, J.C.; PERRY, T.J. Transportation of phytopathogenic fungi by the bark beetle *Ips sexdentatus* Boerner and associated mites. **Journal of Applied Entomology**, v.108, p.1-11, 1989.
- MARQUES, E.J. A cigarrinha-da-folha *Mahanarva posticata* (Stal) (Hom.: Cercopidae) fator limitante na produção de açúcar no Nordeste do Brasil. Recife: IAA/PLANALSUCAR, CONOR., 1981. 12p.
- MARQUES, E.J. Controle microbiano de cigarrinhas (Hemiptera: Cercopidae) com *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok: eficiência e limitações. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3., 1992, Águas de Lindóia. **Anais**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1992. p.73-78.
- MARQUES, E.J.; VILLAS-BOAS, A.M.; PEREIRA, C.E.F. Orientações técnicas para a produção do fungo entomogêneo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em laboratórios setoriais. **Boletim Técnico PLANALSUCAR**, Piracicaba, v.3, n.2, p.5-23, 1981.
- MARTIN, W.R.; GRISHAM, M.P.; KENRLEY, C.M.; STERLING, W.L.; MORGAN, P.W. Microorganisms associated with cotton fleahopper *Pseudotomoscelis seriatus* (Heteroptera: Miridae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.80, p.251-255, 1987.

- MATTHEWS, R.E.F. **Plant Virology**. 3.ed. San Diego: Academic Press, 1991. 835p.
- McCOY, C.M. Pest control by the fungus *Hirsutella thompsonii*. In: BURGESS, H.D., ed. **Microbial control of pest and plant diseases** 1970-1980. London: Academic Press, 1981. p.499-512.
- McGUIRE, M.R.; MORRIS, M.J.; ARMBRUST, E.J.; MADDOX, J.V. An epizootic caused by *Erynia radicans* (Zygomycetes: Entomophthoraceae) in an Illinois *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae) population. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.50, p.78-80, 1987.
- MENDES, C.J. **Manual de controle à vespa-da-madeira**. Florianópolis: Associação Catarinense dos Reflorestamentos, 1992, 23p.
- MILNER, R.J.; LUTTON, G.G. Dependence of *Verticillium lecanii* (Fungi: Hyphomycetes) on high humidities for infection and sporulation using *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) as host. **Environmental Entomology**, v.15, p.330-382, 1986.
- NASH, B.; STANOSZ, G.; TAYLOR, G.; DAVIS, D. Association of a fungus with overstrory sugar maple leaves injured by pear thrips in Pennsylvania. **Phytopathology**, v.81, p.123, 1991.
- NAULT, L.R.; BRIONES, M.L.; WILLIAMS, L.E.; BARRY, B.D. Relation of the wheat curl mite to kernel red streak of corn. **Phytopathology**, v.57, p.986-989, 1967.
- NAULT, L.R. Arthropod transmission of plant viruses. In: MADDEN, L.V.; RACCAH, B.; THRESH, J., ed. **Epidemiology and Management of Plant Virus Diseases**. New York: Springer-Verlag., 1996. No prelo.
- PURCELL, A.H. Insect vector relationships with procaryotic plant pathogens. **Annual Review of Ohytopathology**, v.20, p.397-417, 1982.
- PURCELL, A.H. Cigarinhas na cultura de citros. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS, 3., 1994, Betedouro. **Anais** Campinas: Fundação Cargill, 1994, p.195-209.
- RIBAS JR., U. Práticas de controle da vespa-da-madeira em povoamento de *Pinus* do sul do Brasil e efeitos de seu ataque nas propriedades da madeira *Pinus taeda*. Série Técnica IPEF, v.9, p.47-55, 1993.
- ROMBACH, M.C.; AGUDA, R.M.; SHEPARD, B.M.; ROBERTS, D.W. Entomopathogenic fungi (Deuteromycotina) in the control of the black bug of rice, *Scotinophara coarctata* (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.48, p.174-179, 1986a.
- ROMBACH, M.C.; AGUDA, R.M.; SHEPARD, B.M.; ROBERTS, D.W. Infection of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae), by field application of entomopathogenic hyphomycetes (Deuteromycotina). **Environmental Entomology**, v.15, p.1070-1073, 1986b.
- SCHINNER, M.; PARKER, B.L.; BERGDAHL, D.R. *Verticillium lecanii*, isolated from larvae of pear thrips, taeriothrips inconsequens, in Vermont. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.58, p.157-163, 1991.
- SILVA, L.M.S.; GRAVENA, S.; DONADIO, E.L.C. Efeito de produtos químicos e do fungo *Hirsutella thompsonii* (Fisher, 1950) sobre o ácaro predador *Iphiseoides quadripiles* (Banks, 1905), de Leon 1966 (Acan, Phytoseidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 7., 1981, Fortaleza. **Resumos** Fortaleza: SEB, 1981, p.37.
- SILVA, L.M.S.; MELO, M.B. Controle biológico da Ortézia dos citros através de pulverização de estirpes entomopatogênicas de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Beauveria bassiana* e *B. brongniartii*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 15., 1995, Caxambu. **Resumos**. Caxambu: SEB, 1995. p.374.
- STEINKRAUS, D.C.; HOLLINGSWORTH, R.G.; SLAYMAKER, P.H. Prevalence of *Neozygites fresenii* (Entomophthorales: Neozygiteaceae) on cotton aphids (Homoptera: Aphididae) in Arkansas cotton. **Environmental Entomology**, v.24 p.465-474, 1995.
- TSAI, J.H. Vector transmission of mycoplasma agents of plant diseases. In: WHITCOMB, R.F.; TULLY, J.G., ed. **The Mycoplasmas. Plant and insect mycoplasmas**. New York: Academic Press, 1979. v.3, p.265-307.
- VALARINI, P.J.; TOKESHI, H. *Ceratocystis fimbriata* agente causal da "seca da figueira" e seu controle. **Summa Phytopathologica**, v.6, p.102-106, 1980.
- WANG, Z.G.; KNUDSEN, G.R. Effect of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) on fecundity of the russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). **Environmental Entomology**, v.22, p.874-878, 1993.
- WILDING, N. The effect of introducing aphid-pathogenic Entomophthoraceae into field populations of *Aphis fabae*. **Annals of Applied Biology**, v.99, p.11-23, 1981.
- WILDING, N.; MARDELL, S.R.; BROBYN, P.J. Introducing *Erynia neophidis* into a field population of *Aphis fabae* form of the inoculum and effect of irrigation. **Annals of Applied Biology**, v.108, p.373-385, 1986.
- WILLIAMSON, C.; VON WECHMAR, M.B.; RYBICKI, E.P. Further characterization of *Rhopalosiphum padi* virus to aphids and comparison of isolates from South Africa and Illinois. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.53, p.25-69, 1989.
- WILLIAMSON, C.; RYBICKI, E.P.; KARDORF, G.G.F.; VON WECHMAR, M.B. Characterization of a new picorna-like virus isolated from aphids. **Journal of Genetic Virology**, v.69, p.787-795, 1988.
- WITCOSKY, J.J.; SHOWALTER, T.D.; HANSEN, E.M. *Hylastes nigrinus* (Coleoptera: Scolytidae), *Pissodes fasciatus* and *Stereomnius carinatus* (Coleoptera: Curculionidae) as vectors of black-stain root disease of douglas fir. **Environmental Entomology**, v.15, p.1090-1095, 1986.

# 6

## GENÉTICA E MELHORAMENTO DE FUNGOS AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

**Luzia Doretto Paccola-Meirelles**

### INTRODUÇÃO

Atualmente são descritas mais de 700 espécies de fungos patogênicos de insetos e antagonicos de plantas, de diversos gêneros. Numerosos trabalhos de pesquisa são direcionados, visando a aplicação no controle biológico e na ecologia desses fungos. A utilização desses agentes em formulações comerciais requer, sem dúvida, estudos de natureza genética para a compreensão dos mecanismos de penetração do fungo no inseto. No entanto, esses estudos são escassos e a falta de conhecimento básico impede consideravelmente sua aplicação no controle biológico. A manipulação para a obtenção de linhagens mais apropriadas, seja através das metodologias clássicas de recombinação, seja através de manipulações do material genético por meio das técnicas de transformação em fungos, faz dessas técnicas ferramentas úteis em programas de controle biológico. Apesar disso, faz-se necessária a exploração dos processos de recombinação para a condução de um eficiente programa de melhoramento nesses microrganismos, a fim de que se torne possível a utilização da capacidade máxima que a linhagem empregada no controle biológico tem para oferecer.

O primeiro passo para a caracterização genética de um fungo recém-isolado é a adequação das condições de cultivo e crescimento desse microrganismo. Os aspectos fisiológicos de seu crescimento e suas exigências nutricionais são indispensáveis para o progresso da

genética do mesmo. O segundo passo é a análise da condição nuclear do fungo de interesse e o terceiro é a avaliação da variabilidade presente na espécie. Essa variabilidade pode ser natural ou induzida. A natureza, sem dúvida, nos oferece todas as ferramentas para a exploração da variabilidade genética e esta é uma fonte inesgotável de variabilidade. Porém, muitas vezes, o geneticista necessita induzir essa variabilidade em função da característica do trabalho que está desenvolvendo. Para isso lança mão das técnicas de indução de mutação ou de técnicas mais recentes de transformação, as quais são discutidas nos capítulos 2 e 7 deste volume. Uma vez obtidos e caracterizados esses mutantes, é possível, através das técnicas de recombinação, conduzir um programa de estudos genéticos na espécie.

## CONDIÇÃO NUCLEAR DO FUNGO

Fungos possuidores de conídios uninucleados são extremamente favoráveis para estudos de natureza genética. No entanto, mesmo aquelas espécies que não possuem esta condição nuclear podem ser estudadas através de técnicas especiais, as quais serão discutidas posteriormente.

As técnicas de coloração nuclear são relativamente simples e nelas são empregados corantes basófilos, como o giemsa e hematoxilina, entre outros. Um exemplo típico é dado pelos trabalhos com *Beauveria bassiana*, um Deuteromiceto entomopatogênico cujas condições de cultivo em laboratório e ciclo de vida foram bem definidos. Com o objetivo de estudar a genética desse Deuteromiceto, análises da condição nuclear foram conduzidas em conídios, em tubos germinativos e em micélio (Paccola *et al.*, 1984; Araújo & Paccola-Meirelles, 1994). Os conídios mostraram-se uninucleados, condição desejável para iniciar os estudos de genética com esse fungo. Araújo & Paccola-Meirelles (1994) definiram sete estágios de desenvolvimento no entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Esses estágios podem ser visualizados nas Figs. 1 a 6. O primeiro estágio é o conídio uninucleado (Fig. 1). A duração deste estágio depende do meio de cultivo. Na Fig. 2 os conídios estão entumecidos, indicando o início do processo de germinação, o que caracteriza o estágio II, que tem duração de cerca de 8 a 16 horas, também dependente do meio de cultivo. Após a emergência do tubo germinativo ocorre a primeira divisão nuclear (estágio III). A Fig. 3

mostra a liberação de tubos germinativos e núcleos em divisão. O estágio IV caracteriza-se pela formação do primeiro septo (Fig. 4). O estágio V é definido a partir da segunda divisão mitótica e a formação do segundo septo marca o início do estágio VI (Fig. 5). Neste estágio

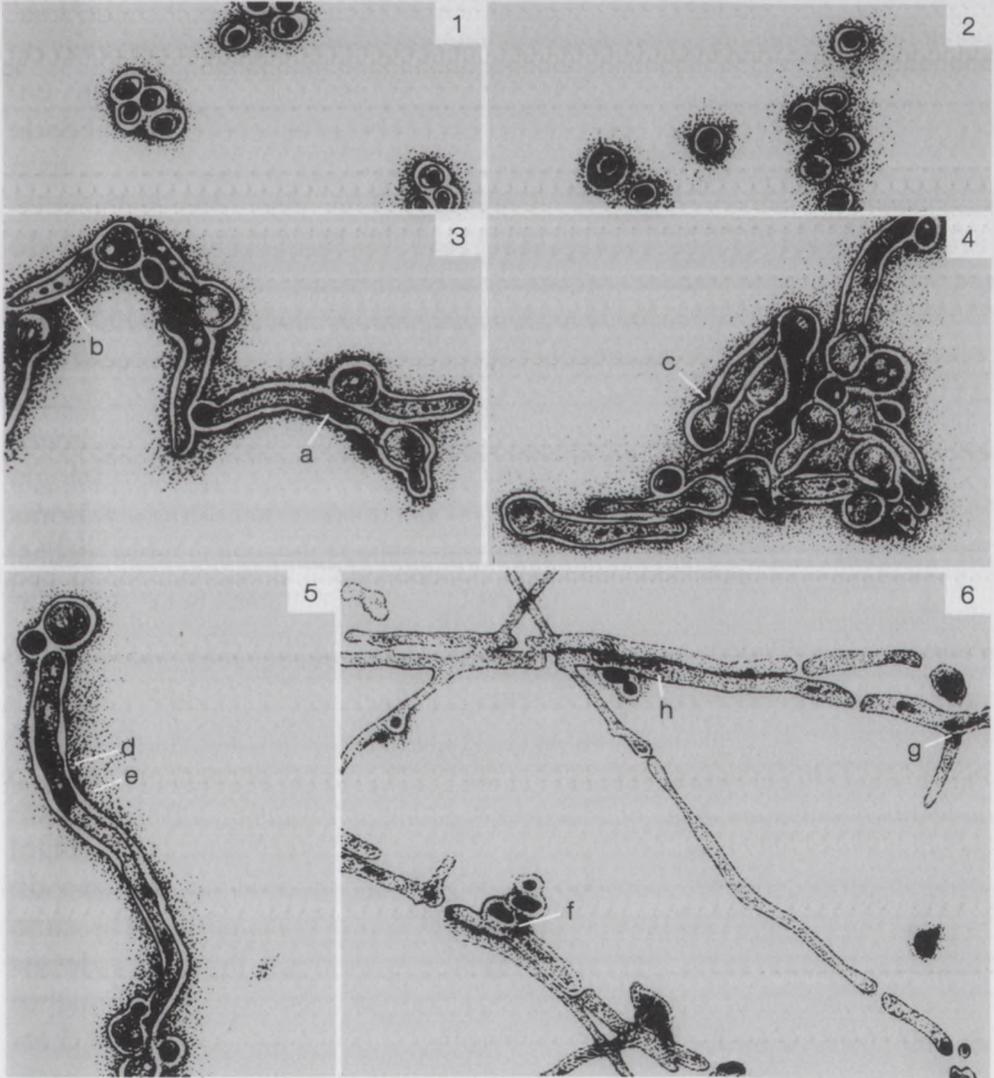


FIGURA 1-6. Os sete estágios de desenvolvimento de *Beauveria bassiana* em cultura líquida. FIGURA 1, estágio I: conídio uninucleado. FIGURA 2, estágio II: emergência do tubo germinativo (seta). FIGURA 3, estágio III: primeira divisão nuclear; anáfase (seta a) e telófase (seta b). FIGURA 4, estágio IV: formação do primeiro septo (seta c). FIGURA 5, estágio V: segunda divisão nuclear, núcleo em metáfase (seta d) e estágio VI: formação do segundo septo (seta e). FIGURA 6, estágio VII: ramificação hifal, formação do conídio (seta f), migração nuclear (seta g) e um núcleo em prófase (seta h). Paccola-Meirelles & Araújo (1993).

inicia-se a produção de conídios e no estágio VII ocorre a ramificação das hifas, a formação de conídios e a migração nuclear.

Outro exemplo, mostrado na Fig. 7, é o do *Helmintosporium euphorbiae*, um fungo isolado e caracterizado por Yorinori & Gaziero (1989) como sendo um agente biocontrolador do amendoim bravo (*Euphorbia heterophila*), uma erva-daninha invasora da cultura de soja. Inicialmente, vários trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de otimizar as condições de crescimento e esporulação desse fungo em laboratório. Diversos isolados foram caracterizados e sua variabilidade genética avaliada. Com o interesse de se estudar geneticamente essa espécie, análises citológicas foram conduzidas por Silva & Paccola-Meirelles (1995) visando a determinação do número de núcleos do conídio e das hifas. Esses autores observaram um número de núcleos nos conídios que variou de 4 a 20, o que dificulta a indução de mutação nesses conídios. O tempo de liberação do tubo germinativo foi de cerca de 6 horas e os segmentos hifais permaneceram uninucleados até 8 horas, passando a trinucleados após esse período de crescimento. Uma alternativa para estudos genéticos desse fungo é a metodologia de protoplastos. Protoplastos de tubos germinativos com 6 a 8 horas de crescimento possibilitaram a obtenção de células uni e binucleadas.

A obtenção de mutantes em linhagens multinucleadas é mais trabalhosa e requer técnicas especiais para seu isolamento.

A avaliação da condição nuclear é uma característica extremamente importante para a condução de eficientes programas de melhoramento na espécie.

Alguns fungos, quando cultivados em meio líquido, produzem estruturas leveduriformes, os blastósporos. Essas estruturas se assemelham àquelas produzidas na hemolinfa dos insetos, quando da infecção do inseto pelo fungo. Os blastósporos apresentam vida média mais curta que a do conídio e sua parede também é mais delgada. Apesar dessas características, eles podem ser usados com sucesso no melhoramento das linhagens e na formulação de bioinseticidas. Essas estruturas já foram descritas em vários fungos, como *Metarhizium anisopliae* (Adamek, 1965), *Beauveria brongniartii* (Cartroux *et al.*, 1970), *Beauveria bassiana* (Fargues *et al.*, 1979), *Verticillium lecanii* (Hall & Latgé, 1980) e *Nomuraea rileyi* (Riba & Glandard, 1980). Os blastósporos são tão patogênicos quanto os conídios. Embora menos freqüentemente, eles são também utilizados em formulações comerciais.

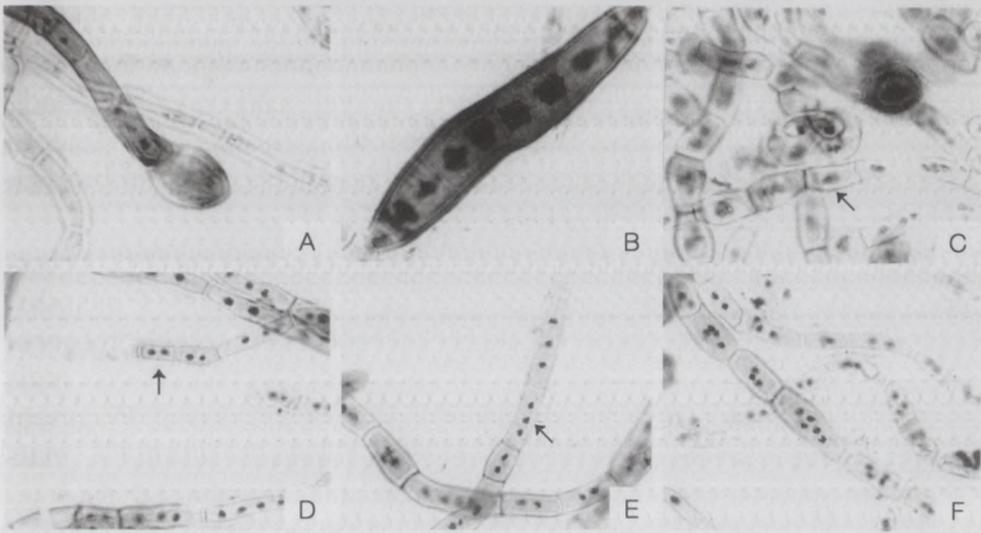


FIGURA 7. Conídios multinucleados e hifas de *H. euphorbiae*. A – Formação do conídio (48 horas de crescimento). B – Conídio multinucleado. C – Hifas uninucleadas (setas) com 8 horas de crescimento. D/E – Hifas bi e trinucleadas (setas) com 18 horas de crescimento. F – Hifas multinucleadas com 18 horas de crescimento.

## AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE NATURAL EM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

A variabilidade natural em fungos entomopatogênicos é bastante ampla e é facilmente avaliada através das técnicas hoje disponíveis, como crescimento e morfologia da colônia, análises citológicas do conídio, produção de exoenzimas, eletroforese de isozimas, quantificação do conteúdo de DNA, RAPD e PCR. Azevedo & Messias (1985) citam o importante papel do geneticista no estudo da variabilidade genética dentro da espécie e na estabilização das linhagens utilizadas. Assim, como uma etapa inicial de um trabalho de genética, a avaliação da variabilidade natural existente na espécie é fundamental. Várias características são utilizadas para avaliar tal variabilidade. Entre elas pode-se citar a germinação, o crescimento em diferentes substratos, a produção de conídios, o número e tamanho de núcleos, o tamanho de conídios e a produção de enzimas exógenas, como amilases, proteases, celulases, quitinases, pectinases, lipases e outras. A resistência a agentes químicos, como fungicidas, inseticidas, herbicidas e outros inibidores, ou a agentes físicos, como radiação ultravioleta e radiação ionizante, também são parâmetros que podem ajudar na caracterização genética das

linhagens (Hankin & Anagnostakis, 1975; Rosato *et al.*, 1981; Frigo & Azevedo, 1984; Leite & Messias, 1984; Paccola-Meirelles & Azevedo, 1990). Essas características, além de úteis na avaliação da variabilidade genética entre as linhagens, podem contribuir para o melhoramento genético, seja na elucidação das etapas envolvidas no controle biológico, ou na produção de bioinseticida industrial.

Hoje, técnicas moleculares têm contribuído sobremaneira na exploração da variabilidade genética entre as espécies. Esses métodos macromoleculares evoluíram desde as metodologias de eletroforese de proteínas, adotadas há cerca de 30 anos, para as tecnologias mais recentes, utilizando o DNA, tais como o RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphisms), o PCR (Polimerase Chain Reaction) e, mais recentemente, o RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA).

As técnicas eletroforéticas de isozimas e proteínas são ferramentas simples e acessíveis para avaliar com rapidez e segurança a variabilidade entre linhagens de fungos. May *et al.* (1979) descreveram a análise eletroforética em isolados de duas espécies de *Entomophthora*, *E. virulenta* e *E. sphaerosperma*, e concluíram que o uso de análises isoenzimáticas permitiu uma base genética segura nos estudos de taxonomia dentro desse gênero. Isso também é verdadeiro para outros fungos (De Conti *et al.*, 1980; Boucias *et al.*, 1982; Riba *et al.*, 1986). Em *Beauveria bassiana* Paccola-Meirelles & Azevedo (1990) avaliaram a variabilidade genética entre isolados de diferentes regiões brasileiras por meio de análises isoenzimáticas, de testes de produção de exoenzimas e crescimento em diferentes meios. Tigano & Riba (1990), utilizando a técnica de eletroforese para  $\alpha$ -esterases, diferenciaram 92 isolados do mesmo fungo. St. Leger *et al.* (1992a) identificaram 146 isolados de *Beauveria* spp. oriundos de diferentes regiões geográficas, e os classificaram dentro de 47 classes genotípicas distintas, através do perfil eletroforético para isozimas.

As albuminas e as globulinas também mostraram-se úteis na caracterização de linhagens de *Beauveria bassiana* (Paccola-Meirelles *et al.*, in press).

St. Leger *et al.* (1992b) detectaram considerável variabilidade entre isolados de *Metarhizium* spp. pelo uso de isozimas. A variação aloenzimática dentro e entre 120 isolados de *Metarhizium* spp. de diversos países permitiu a determinação de 8 loci isoenzimáticos. Quarenta e oito classes genotípicas foram encontradas entre os isolados analisados.

De forma geral, as análises isoenzimáticas têm sido utilizadas na diferenciação de isolados, que apresentam morfologia semelhante (Zambino & Harrington, 1989; Soper *et al.*, 1983; St. Leger *et al.*, 1992b), e na identificação de fatores que afetam a variação genética, tais como a falta de reprodução sexual e a homogeneidade ambiental.

Nos últimos anos, as técnicas moleculares, utilizando como marcadores o próprio DNA, passaram a ser um instrumento adicional e complementar em laboratórios de genética de fungos. Comparadas às isozimas, as marcas de DNA apresentam a vantagem de não serem influenciadas pelo ambiente ou pelas condições de cultivo, permitindo uma determinação mais acurada da diversidade genética de muitos loci.

Para a utilização dessas técnicas moleculares, o primeiro passo é a extração do DNA. Pfeifer & Khachatourians (1993a) reportaram um método simples e rápido de extração de DNA de *M. anisopliae*, *Paezilomyces farinosus* e *B. bassiana* para análises de taxonomia molecular de isolados desses gêneros.

O RFLP, o PCR e o RAPD têm sido empregados com sucesso para solucionar questões evolucionárias em uma grande variedade de taxas (Hillis & Moris, 1990; Tigano-Milani *et al.*, 1995a, 1995b, 1995c). O método RAPD tem um grande potencial na análise das relações filogenéticas entre e dentro de espécies relacionadas (Williams *et al.*, 1990). Difere das técnicas convencionais de amplificação, em que 1) as seqüências de DNA genômico são amplificadas com primers de composição nucleotídica arbitrária e não necessitam de conhecimento prévio da região genômica alvo para amplificação e 2) apenas um tipo de primer é usado em cada mistura de reação para amplificação.

São vários os trabalhos descritos na literatura que utilizam as técnicas de PCR e RAPD para caracterizar e confirmar a variabilidade genética existente entre os agentes fúngicos empregados no controle biológico. Através do RAPD, Bidochka *et al.* (1994) e Fegan *et al.* (1993) confirmaram a ocorrência de um alto grau de variabilidade intraespecífica em isolados de *Metarhizium* até mesmo entre isolados da mesma área geográfica. Essa variabilidade já havia sido avaliada no gênero, através de análises empregando eletroforese de isozimas (Riba *et al.*, 1896; St. Leger *et al.*, 1992b).

O gênero *Metarhizium* está constituído por 3 espécies, *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *M. album* (Rombach *et al.*, 1987). *M. aniso-*

TABELA 1. Exemplos de mutagenicidade em fungos entomopatogênicos.

Agente mutagênico	Fungo	Método	Tipo de mutante	Referência
UV	<i>M. anisopliae</i>	EF EF EF	auxotróficos morfológicos resistentes	Tinline & Noviello, 1971
UV	<i>M. anisopliae</i>	IT IT	auxotróficos morfológicos	Messias & Azevedo, 1980
UV	<i>Trichoderma</i> spp.	IT	resistentes	Gullino & Garibaldi, 1988
UV	<i>T. harzianum</i>	IT	morfológicos/ resistentes	Papavizas <i>et al.</i> , 1982
UV	<i>T. pseudokoningii</i>	IT	auxotróficos	Furlaneto & Pizzirani-Kleiner, 1992
UV	<i>T. pseudokoningii</i>	IT	auxotrófico/ morfológicos	
UV	<i>T. reesei</i>	IT	resistentes	Bensaci & Neumann, 1989
UV	<i>T. viride</i>	IT	resistentes	
UV	<i>M. anisopliae</i>	EF EF	auxotróficos/ morfológico morfológicos	Bagalhi, 1987 Riba <i>et al.</i> , 1985
RG	<i>B. bassiana</i>	IT	auxotróficos	Paccola-Meirelles & Azevedo, 1991
UV	<i>B. bassiana</i>	IT IT	resistentes UV resistentes ben	Vilas-Boas <i>et al.</i> , 1992 Belo (dados não publicados)
UV	<i>B. tenella</i>	IT	auxotróficos	Paris, 1977
EMS	<i>M. anisopliae</i>	IT IT	auxotróficos morfológicos	Al-Aidroos, 1980 Bergeron & Messing-Al-Aidroos, 1982; Magoon & Messing-Al-Aidroos, 1986
NG	<i>B. tenella</i>	IT	auxotróficos	Paris, 1977
UV+NG	<i>B. brongniartii</i>	SN SN	auxotróficos Blas negat	Paris & Ferron, 1979 Paris <i>et al.</i> , 1985
UV+NG	<i>V. lecanii</i>	IT	auxotróficos	Jackson & Heale, 1987

IT: Isolamento Total/EF: Enriquecimento por filtração/SN: Seleção pela nistatina/EMS: Etilmetanosulfonato/NG: Nitroso guanidina/UV: Ultravioleta/blas neg: falta de formação de blastósporos/ben: resistência a benomyl

TABELA 2. Sobrevivência de *Beauveria bassiana* ao agente mutagênico UV em diferentes tempos e número de mutantes morfológicos obtidos em cada tempo de exposição.

Tempo (min)	Sobrevivência (%)	Nº de mutantes morfológicos
0,0	51,95 (100,00%)	00
0,5	40,20 (77,40%)	00
1,0	34,74 (66,90%)	00
1,5	24,30 (46,77%)	01
2,0	9,65 (18,57%)	01
2,5	4,30 (8,28%)	03
3,0	2,59 (5,00%)	06
3,5	1,56 (3,00%)	06
4,0	0,75 (1,44%)	09
4,5	0,52 (1,00%)	11
5,0	0,23 (0,44%)	09

Uma vez definidos o agente mutagênico e a dose necessária para obter um maior número de mutantes, é necessário estabelecer o método de isolamento dos mutantes. O método empregado é dependente do tipo de mutante que se deseja isolar.

**Método de isolamento total.** Após o tratamento mutagênico do conídio, segmento hifal ou outro material, são feitas diluições apropriadas e a suspensão é plaqueada em meio sólido. As colônias crescidas nesse meio são todas isoladas e avaliadas quanto à mutação.

**Método de enriquecimento por filtração.** Este é um método bastante adequado para isolamento de mutantes auxotróficos e resistentes. A porcentagem de mutantes auxotróficos isolados através desse método é aumentada, em comparação com o método de isolamento total. Para tal, após tratamento com mutagênico, conídios tratados são inoculados em meio mínimo líquido sob agitação. Após determinado tempo de crescimento, é possível observar a formação de aglomerados miceliais, que correspondem às colônias selvagens em crescimento. O material é filtrado, onde são retidas as colônias prototróficas, deixando passar os conídios mutantes, que não conseguiram crescer no meio mínimo. Estes são deixados para crescer sob agitação por mais algumas horas. Repete-se o procedimento de filtração por mais duas vezes e, finalmente, o filtrado é centrifugado. No filtrado concen-

tram-se os conídios auxotróficos incapazes de crescer em meio mínimo. Após a centrifugação, o "pellet" é diluído e plaqueado em meio completo. Nesse meio, são possíveis a germinação e o isolamento de mutantes auxotróficos em uma frequência bem superior àquela observada pelo método do isolamento total.

Com essa metodologia Silveira & Azevedo (1984) obtiveram um aumento no isolamento de mutantes auxotróficos em *M. anisopliae* de 2,34% para 6,13%, em comparação com o método de isolamento total.

Dependendo do fungo, esse método nem sempre é o ideal. Citemos como exemplo *B. bassiana*. Este entomopatógeno, quando crescido em cultivo agitado, forma estruturas leveduriformes, conhecidas por blastósporos. São estruturas semelhantes a esporos, liberadas a partir das hifas em crescimento. Assim, o crescimento sob agitação favorece a formação dos blastósporos, a partir das colônias prototróficas. Durante os processos de filtração, atravessam os filtros com facilidade, diminuindo assim a possibilidade de isolamento de colônias mutantes, uma vez que a proporção de prototróficos aumenta. Paris (1977) aplicou o método para a seleção de mutantes em *B. tenella*, mas não obteve sucesso. O mesmo aconteceu durante o trabalho de Paccola-Meirelles & Azevedo (1991) para a obtenção de mutantes auxotróficos em *B. bassiana*. Em trabalhos posteriores houve sucesso ao utilizar a técnica de enriquecimento por filtração, empregando, porém, o cultivo estático para o crescimento de *B. bassiana*, o que impediu o aparecimento de blastósporos no meio de cultura (Paccola-Meirelles & Genaro, 1993). Shimizu (1986), ao contrário, obteve um aumento de 15 vezes na quantidade de isolamento de mutantes em *B. bassiana* deficientes para aminoácidos através da técnica de enriquecimento por filtração.

**Método de isolamento por inibição com nistatina.** A nistatina é um fungicida bastante potente, que age nos tubos germinativos, impedindo seu desenvolvimento. Após tratamento com o mutagênico apropriado, a suspensão de conídios é plaqueada em meio mínimo. Iniciada a germinação das colônias prototróficas, uma fina camada de ágar contendo nistatina (100 mg/ml de meio) é colocada sobre o meio mínimo (Laillier-Rosseau, 1972). A nistatina atua nos tubos germinativos em crescimento. A seguir, o material é exposto à luz e uma fina camada de meio completo é adicionada à placa. A nistatina em presença de luz é inativada e as colônias auxotróficas podem desenvolver-se nesse

meio. Paris (1977) obteve uma proporção de 1 a 3% de mutantes auxotróficos em *B. tenella*, através do método. Já Paccola-Meirelles & Genaro (1993) não tiveram sucesso com esse método na obtenção de mutantes auxotróficos em *B. bassiana*.

**Método de inativação pela aplicação de enzimas líticas.** É aplicado tanto para isolamento de linhagens auxotróficas como para linhagens termossensíveis ou sensíveis a agentes químicos. Citemos, como exemplo, o isolamento de mutantes auxotróficos. Após tratamento com o mutagênico apropriado, a suspensão de conídios é inoculada em meio mínimo por um tempo suficiente para a liberação de tubos germinativos ou blastósporos, quando for o caso. É feita uma centrifugação, a fim de concentrar o material. A seguir, o material é tratado com uma solução de enzimas líticas. Como a parede dos blastósporos é mais delgada e sensível que a dos conídios, é degradada pelas enzimas líticas, ocasionando a destruição dos blastósporos. O mesmo se aplica aos tubos germinativos ainda jovens. Estes possuem uma parede delgada, que é facilmente digerida pelas enzimas. Como os conídios são geralmente resistentes a essas enzimas, eles permanecem viáveis durante o processo e posteriormente podem ser isolados em meio completo.

Não se pode perder de vista o fato de que as mutações induzidas por agentes químicos ou físicos são aleatórias, de forma que mutantes indesejáveis podem ocorrer juntamente com aqueles de interesse. Assim, é importante o domínio das técnicas seletivas para a obtenção do produto desejável.

A mutagênese seguida de seleção pode representar uma alternativa bastante adequada para o processo de melhoramento em fungos utilizados no controle biológico. Muitos desses fungos apresentaram alteração na virulência, após tratamento com mutagênico (Al-Aidroos & Roberts, 1978; Al-Aidroos & Seifert, 1980). Paris & Ferron (1979) estudaram a virulência de mutantes de *B. brongniartii* deficientes na produção de blastósporos e mostraram que essa característica está ligada à patogenicidade. Já Paris *et al.* (1985) relataram a virulência desse tipo de mutante. A diferença entre os resultados foi atribuída por Khachatourians (1991) provavelmente ao tipo de mutagênico utilizado e à natureza exata dos mutantes obtidos.

Linhagens auxotróficas, em geral, são menos virulentas que as selvagens (Jackson & Heale, 1986) e, em alguns casos, observa-se uma correlação direta. Um exemplo é o que acontece com a auxotrofia

para isoleucina em *B. brongniartii*. Este entomopatógeno produz um ciclodepsipeptídeo tóxico a alguns insetos, a beauvelidina. A isoleucina participa na via metabólica da formação deste produto, de forma que a incapacidade de sintetizá-la interfere diretamente na produção da toxina e conseqüentemente na patogenicidade. Porém, há relatos na literatura, mostrando que linhagens auxotróficas de *B. bassiana*, que eram avirulentas, não recuperaram a virulência após a reversão das marcas auxotróficas (Usenko *et al.*, 1973), de forma que o assunto ainda requer investigações.

Mutantes deficientes na produção de enzimas necessárias para a penetração do fungo no hospedeiro têm sido constantemente isolados com o objetivo de se esclarecer o processo de infecção (Bidochka & Khachatourians, 1990; Paris *et al.*, 1985; Champlin *et al.*, 1981). São vários os trabalhos tentando verificar a relação entre a produção de enzimas extracelulares, como proteases, quitinases, amilases e lipases com a patogenicidade do fungo, porém há muitas controvérsias entre autores. Champlin *et al.* (1981) e Smith *et al.* (1981) isolaram mutantes de *B. bassiana* com graus variados de atividade lipolítica, quitinolítica e proteolítica, que apresentaram diferentes graus de patogenicidade, porém, não apontaram correlação positiva e direta entre virulência e síntese dessas enzimas extracelulares. Bidochka & Khachatourians (1990) isolaram mutantes defectivos na produção de protease e quitinase, os quais apresentaram um  $LT_{50}$  maior que o tipo selvagem. Já Silva & Messias (1986) mostraram correlação positiva entre atividade amilolítica e lipolítica com virulência, através do uso de mutantes de *M. anisopliae* amilase e lipase negativos. Samuel *et al.* (1989) mostraram que mutações, afetando a produção da amilase, lipase, protease e quitinase, têm um efeito variável na patogenicidade.

Outro caráter bastante explorado em estudos de natureza genética é a resistência a agentes químicos. Tinline & Noviello (1971) isolaram mutantes resistentes a diversos agentes químicos, como verde malaquita, cristal violeta e acriflavina, entre outros. Linhagens de *M. anisopliae* resistentes à acriflavina foram selecionadas por Al-Aidroos (1980).

Mutantes resistentes à UV foram isolados por Vilas-Boas *et al.* (1992) e foram ensaiados a campo. Solos com diferentes tipos de cobertura foram avaliados e os conídios mutantes permaneceram viáveis no solo por um período bem superior ao observado para os tipos selvagens.

Além dessas características mutantes, existem outras que merecem atenção e precisam ser mais exploradas para a elucidação do processo de infecção dos fungos empregados no controle biológico, como por exemplo mutações morfológicas, produção de toxinas, produção de pigmentos, virulência etc.

Magoon & Messing-Al-Aidroos (1986) mapearam marcas para coloração de conídios em *M. anisopliae*, utilizando os mutantes morfológicos obtidos por Al-Aidroos (1980) e por Bergeron & Messing-Al-Aidroos (1982). No mesmo trabalho os autores propuseram duas vias metabólicas para a biossíntese de pigmentos nesse entomopatógeno (Fig. 8).

Precursor 1 → verde lemon → tan → amarelo → verde (tipo selvagem)  
Precursor 2 → marrom → pigmento X  
(sem cor)

FIGURA 8. Via metabólica proposta para biossíntese de pigmentos em conídios de *M. anisopliae* (Magoon & Messing-Al-Aidroos, 1986).

## RECOMBINAÇÃO EM FUNGOS

Através da recombinação, é possível combinar características desejáveis em uma única linhagem. Os processos de recombinação conhecidos em fungos são o ciclo sexual, o ciclo parassexual, fusão de protoplastos e as técnicas de transformação (esta é abordada com detalhes no capítulo 7 neste volume).

### Recombinação Sexual

Através da reprodução sexual, os fungos podem combinar diversas características em um só indivíduo. Em fungos, a reprodução sexual consiste na fusão de dois núcleos haplóides, dando origem a um diplóide que por divisão meiótica produz núcleos haplóides. Apesar das dificuldades em se observar microscopicamente os cromossomos de fungos, devido ao seu pequeno tamanho, algumas análises citogenéticas da meiose de fungos, conduzidas em *Neurospora crassa* (Singleton, 1953),

demonstram que o processo é semelhante ao de organismos superiores. As informações sobre o mecanismo da meiose, na maioria dos fungos, são provenientes de análises genéticas e não de observações citológicas.

Considerando que a maioria dos fungos empregados no controle biológico são deuteromicetos, cujo ciclo sexual ainda não foi descrito, enfocaremos com mais detalhes os outros processos de recombinação.

## Recombinação Parassexual

A parassexualidade é um mecanismo que permite a análise genética em fungos deuteromicetos e também representa uma importante ferramenta para o melhoramento de linhagens de interesse aplicado. O ciclo parassexual foi descrito pela primeira vez em *Aspergillus nidulans* e *Penicillium* (Pontecorvo, 1953, 1954; Pontecorvo *et al.*, 1953; Pontecorvo & Roper, 1953; Pontecorvo & Sermont, 1954; Pontecorvo & Kafer, 1958) e passa por uma série de eventos, que consiste dos seguintes passos:

1. **Formação do heterocário:** Anastomose de hifas entre homocárions complementares, seguida de migração nuclear com conseqüente estabelecimento do heterocário.
2. **Fusão nuclear:** A fusão nuclear ocorre em baixa freqüência (aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$ ), resultando heterozigotos diplóides somáticos, os quais podem multiplicar-se por mitose juntamente com os núcleos haplóides do heterocário.
3. **Crossing-over mitótico:** Crossing-over mitótico pode ocorrer no núcleo diplóide em uma freqüência de  $1 \times 10^{-2}$  por divisão nuclear.
4. **Haploidização:** O núcleo diplóide, durante as sucessivas divisões mitóticas, pode sofrer não-disjunções cromossômicas, que ocasionam a recuperação do estado haplóide normal do fungo. Durante o processo de haploidização, ocorre um “embaralhamento” ao acaso dos cromossomos parentais, resultando em recombinantes que apresentam em seus cromossomos as mesmas marcas ligadas como nos parentais, a menos que estas tenham sido separadas por um evento de crossing-over mitótico.

Núcleos geneticamente idênticos podem passar pelo processo de parassexualidade, ou seja, sofrer fusão, recombinação e haploidização, porém neles isso não tem efeito genético.

A parassexualidade, em certos casos, é o único mecanismo que permite a recombinação genética, de forma que estudos de natureza genética podem ser conduzidos nesses fungos ditos imperfeitos.

**Anastomose de hifas.** A anastomose consiste na fusão de segmentos hifais, com conseqüente mistura de citoplasma.

A anastomose é um fenômeno complexo e pouco conhecido sobre a sua ocorrência em fungos entomopatógenos. Como já citado, a anastomose entre hifas dentro de uma mesma colônia é uma indicação da possibilidade da ocorrência de parassexualidade na espécie. Paris (1977), em estudos de microscopia óptica, observou raras anastomoses hifais em *B. tenella* e não detectou heterocariose na espécie. Luna (1985), em avaliações citológicas, observou anastomoses hifais em linhagens de *M. anisopliae*. Em nosso laboratório pudemos observar a anastomose em alguns pontos do micélio de *Helminthosporium euphorbiae*, sendo portanto um indicativo da possibilidade de formação de heterocário nessa espécie (Fig. 9).

A ocorrência de um ciclo parassexual depende da natureza dessa anastomose. No entanto, certos fatores podem afetar negativamente essa anastomose. Por exemplo, a dissolução da parede celular e fatores de incompatibilidade podem ocorrer durante o processo de anas-

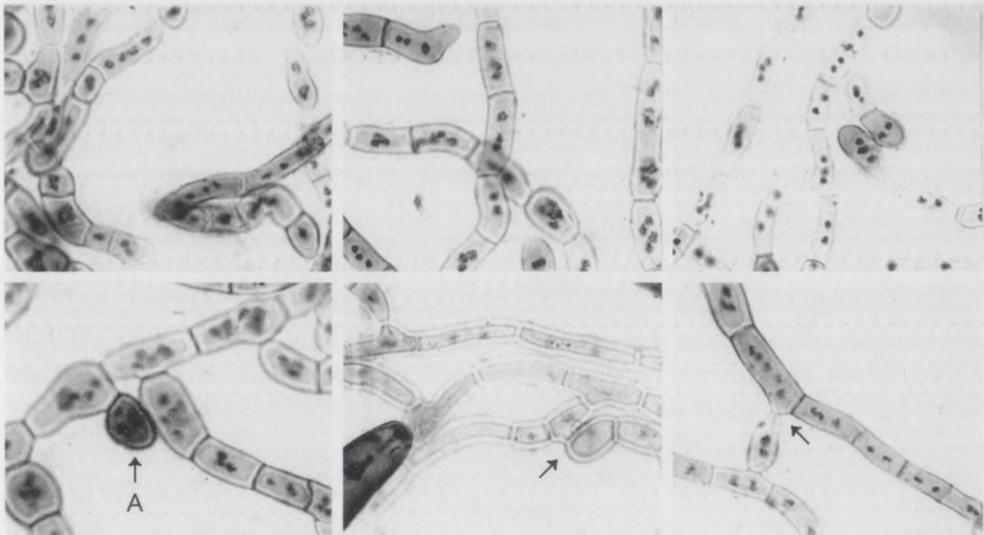


FIGURA 9. Anastomose de hifas em *Helminthosporium euphorbiae* (setas). Em (A) núcleo em anáfase iniciando a formação de um conídio.

tomose entre as hifas, tendo como consequência a repulsão entre as duas hifas envolvidas no processo.

**Heterocariose e fusão nuclear.** A anastomose hifal é um indicativo da ocorrência de heterocariose. Entende-se por heterocariose a ocorrência de núcleos geneticamente diferentes em um mesmo citoplasma. De forma similar à diploidia, a heterocariose permite a heterozigose e, em certos casos, pode ocasionar vigor híbrido (Baracho *et al.*, 1970). A heterocariose é o início da determinação do ciclo parassexual em uma espécie fúngica. Em *M. anisopliae* a heterocariose foi descrita pela primeira vez por Tinline & Noviello (1971), que obtiveram heterocários empregando mutantes auxotróficos. Esses estudos abriram a possibilidade da ocorrência de parassexualidade nesse deuteromiceto, confirmada posteriormente pelos trabalhos de Messias & Azevedo (1980) e Al-Aidroos (1980).

A maioria dos estudos de heterocariose envolve linhagens selecionadas em laboratório, que diferem na morfologia e em determinados requerimentos nutricionais.

Poucos estudos têm sido conduzidos visando a ocorrência da heterocariose na natureza. Jinks (1952) observou que *Penicillium* pode existir na natureza na forma de heterocário com vantagens no crescimento, quando comparado com as formas homocarióticas. O mesmo autor demonstrou que a heterocariose em linhagens selvagens de *Penicillium* gera variação somática e adaptação natural nesse gênero. A partir desta data poucos estudos foram conduzidos nesse sentido.

A fusão nuclear segue a heterocariose e é considerada um evento raro (Roper, 1952). Diferentes núcleos haplóides, após fusão, dão origem a diplóides somáticos heterozigotos, que podem permanecer nas hifas ou formar conídios que são diferenciados dos conídios parentais por diversos métodos seletivos. Os núcleos dos diplóides apresentam conídios com um volume maior (próximo ao dobro do haplóide); quando marcas nutricionais estão envolvidas, estas são complementares no diplóide e, geralmente, este é instável, ocasionando a liberação de setores.

*M. anisopliae* apresenta conídios uninucleados com núcleos dividindo-se antes ou durante a germinação. Durante o processo de germinação, é comum ocorrer anastomose entre as hifas com consequente heterocariose (Tinline & Noviello, 1971). A condição de heterocariose em *M. anisopliae* foi demonstrada, através do uso de marcas auxotróficas

complementares entre as linhagens envolvidas. Observou-se que, enquanto algumas pontas de hifas se desenvolviam normalmente em meio definido, outras eram incapazes de desenvolvimento, demonstrando dessa forma a ocorrência da complementariedade das marcas em alguns núcleos nas primeiras.

**Crossing-over mitótico.** A recombinação mitótica, descrita pela primeira vez em *Drosophila* (Stern, 1936) e, mais tarde, em fungos (Pontecorvo *et al.*, 1953; Pontecorvo & Roper, 1953) representa uma alternativa para a produção de novas combinações de material genético em organismos que são incapazes de reprodução sexual.

O crossing-over mitótico, à semelhança da meiose, ocorre no estágio de 4 fios. A permuta mitótica espontânea é rara; em *A. nidulans* observa-se a média de um crossing-over a cada 50 mitoses (Pontecorvo & Kafer, 1958). Essa frequência pode ser ampliada pelo uso de agentes indutores, como por exemplo radiação UV, radiação X, radiação gama, formalina,  $\rho$ -fluorfenilalanina, EDTA e outros (maiores detalhes em Esser & Kuenen, 1967).

**Haploidização.** O núcleo diplóide pode sofrer mitoses regulares, mas eles também conduzem à produção de genótipos irregulares, ou pela recombinação mitótica ou por sucessivas não-disjunções mitóticas, que ocasionam a formação de aneuplóides que podem chegar a um número haplóide de cromossomos. A haploidização resulta em um embaralhamento ao acaso entre cromossomos das linhagens parentais e as marcas localizadas em um mesmo grupo de ligação demonstram completa ligação, a não ser que estas tenham sido separadas por crossing-over mitótico. Essas alterações são visíveis através da liberação de setores das colônias. Esses setores são isolados e caracterizados quanto às marcas envolvidas no cruzamento.

A liberação dos setores pode ocorrer espontaneamente ou ser induzida por agentes haploidizantes do tipo Benomil, Botran ou  $\rho$ -fluorfenilalanina.

Bergeron & Messing-Al-Aidroos (1982) compararam a ação de Benomil e de Botran na liberação de setores a partir de diplóides de *M. anisopliae*. Pela Tabela 3 é possível observar que diplóides de *M. anisopliae* são instáveis, pois liberam setores haplóides espontaneamente. Porém, a liberação de setores foi mais rápida quando se empregaram agentes indutores de haploidização.

TABELA 3. Indução de haploidização em diplóides de *M. anisopliae*.

Linagem diplóide	Tratamento <sup>1</sup>	% de colônias com setores
D <sub>5</sub>	CM	20,9
	CM + Benomil	90,0
	CM + Botran	64,3
RMD6	CM	20,9
	CM + Benomil	65,8
	CM + Botran	72,4

<sup>1</sup>CM: meio completo (Dados de Bergeron & Messing-Al-Aidroos, 1982)

Pelos dados apresentados na Tabela 3 observa-se que o número de setores a partir dos diplóides aumentou em 5 a 10 vezes com o uso de Benomil ou de Botran.

Análises genéticas através do ciclo parassexual são realizadas com sucesso em fungos utilizados no controle biológico. Messias & Azevedo (1980), através desse ciclo, detectaram a existência de pelo menos 4 grupos de ligação em *M. anisopliae*, enquanto que Bergeron & Messing-Al-Aidroos (1982) propuseram um número de 5 grupos de ligação para a espécie. Estes últimos autores relacionaram 8 marcas nos grupos de ligação e, em seguida, Magoon & Messing-Al-Aidroos (1986) confirmaram a localização dessas marcas e acrescentaram mais duas nos 5 grupos de ligação, as quais são distribuídas conforme a Fig. 10.

Os símbolos *ylo*, *tan*, *lem*, e *brn* representam marcas para coloração amarela, dourada, verde limão e marrom, respectivamente; *lys*, *ade*<sub>1</sub> e *ade*<sub>2</sub>, *met*, *leu* representam deficiências para lisina, adenina, metionina e leucina respectivamente, e *Acr*<sub>2</sub> e *Acr*<sub>5</sub>, resistência à acriflavina.

O mapeamento genético através da parassexualidade é um processo mais demorado e exige a análise de um número maior de recombinantes que as análises envolvendo o ciclo sexual. Apesar de trabalhoso, é possível determinar a ordem dos genes e até mesmo estimar a distância entre eles. Um exemplo ilustra melhor o uso desse ciclo em análises genéticas. Um diplóide, RMD6, de *M. anisopliae*, cuja constituição genética está representada na Fig. 11, apresenta conídios verdes e pode crescer em meio mínimo, porém é heterozigoto para as marcas *lys* (requerimento para lisina), *met* (requerimento para metionina) e *ACR* (resistência à acriflavina). O diplóide sofreu haploidização e os setores haplóides foram isolados e caracterizados quanto às marcas

envolvidas. A Tabela 4 mostra a frequência dos setores recombinantes, obtidos após exposição do diplóide a agentes haploidizantes.

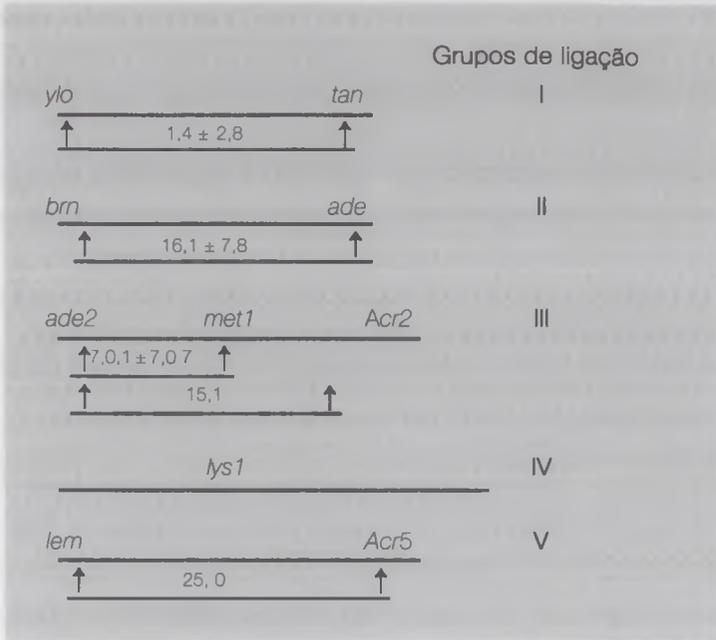


FIGURA 10. Marcas genéticas e grupos de ligação em *M. anisopliae*.

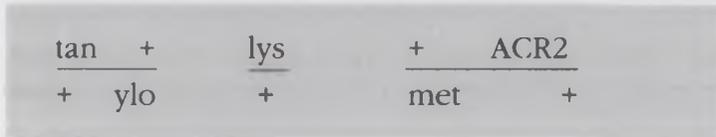


FIGURA 11. Constituição genotípica do diplóide RMD6 de *M. anisopliae*.

TABELA 4. Recombinantes haplóides originados a partir do diplóide heterozigoto RMD6 (Bergeron & Messing-Al-Aidroos, 1982).

	tan	lys	met	ACR2	
ylo	$\frac{R}{P}$	$\frac{0+0}{48+51}$ } 0 %	$\frac{25+27}{21+26}$ } 53%	$\frac{35+7}{44+13}$ } 44%	$\frac{9+36}{12+42}$ } 46%
lys	$\frac{R}{P}$	-	-	$\frac{38+12}{41+8}$ } 51%	$\frac{13+38}{8+40}$ } 52%
met	$\frac{R}{P}$	-	-	-	$\frac{3+2}{18+76}$ } 5%

R = Fenótipo Recombinante P = Fenótipo Parental

Pela Tabela 4 observa-se que a frequência de recombinação mitótica é baixa e que as marcas *ylo* e *tan* encontram-se ligadas, assim como *met* e *ACR2* (frequência 5%).

Através da análise dos setores recombinantes e parentais, pode-se ter uma idéia da distância entre as marcas analisadas, o que contribui em muito para estudos de natureza genética em espécies, cujo ciclo sexual permanece desconhecido.

Recentemente têm sido descritos casos em que a instabilidade do diplóide obtido via ciclo parassexual é tão alta que a permuta mitótica e a haploidização ocorre ainda no heterocário. A essa alta instabilidade do diplóide deu-se o nome de parameiose. O termo foi proposto por Bonatelli *et al.* (1983) para descrever a alta instabilidade que eles observavam em cruzamentos realizados com *Aspergillus niger*. O processo parameiótico é simplesmente uma variação do ciclo parassexual e tem sido descrito em vários fungos, como *Beauveria bassiana* (Paccola-Meirelles & Azevedo, 1991), *M. anisopliae* (Silveira & Azevedo, 1987; Bagalhi *et al.*, 1991) e *Trichoderma pseudokoningii* (Furlaneto & Pizzirani Kleiner, 1992).

No processo de parameiose, os diplóides, sendo altamente instáveis, recuperam seu estado haplóide normal ainda no heterocário, de forma que este contém conídios com constituição genética semelhante aos parentais, conídios recombinantes haplóides, conídios aneuplóides e raros diplóides.

A análise genética, por esse processo, é mais trabalhosa e os conídios recombinantes são isolados, a partir do heterocário, em meios seletivos apropriados. Tomemos como exemplo um cruzamento entre duas linhagens auxotróficas de *B. bassiana* *nic bio* e *ade ths*. Cerca de  $10^7$  conídios/ml<sup>-1</sup> de cada linhagem foram inoculados juntos em um tubo contendo meio líquido para formação da película heterocariótica (Paccola-Meirelles & Azevedo, 1990). Depois de 7 dias de crescimento, a película formada foi transferida para meio mínimo para formação do heterocário. Formado o heterocário, foi feita uma suspensão dos conídios e estes foram plaqueados em meios seletivos, onde eliminaram-se os tipos parentais, de forma que são recuperados nestes meios apenas os segregantes recombinantes representados na Tabela 5.

Pela Tabela 5 podemos concluir que os genes *nic ade* e *ths* encontram-se no mesmo grupo de ligação e *bio* em um segundo grupo de ligação.

TABELA 5. Recombinantes de *B. bassiana* obtidos via parameiose no cruzamento entre uma linhagem *Nic Bio x Ade Ths*.

		nic	ade	bio	ths
nic	$\frac{R}{P}$	-	$\frac{13}{53}$ 19,0%	$\frac{52}{14}$ 78,8%	$\frac{15}{51}$ 22,7%
ade	$\frac{R}{P}$	-	-	$\frac{48}{18}$ 72,7 %	$\frac{19}{47}$ 28,8%
bio	$\frac{R}{P}$	-	-	-	$\frac{48}{18}$ 72,7%

P = Fenótipo parental      R = Fenótipo recombinante

As marcas *nic*, *ade*, *bio* e *ths* representam deficiência para ácido nicotínico, adenina, biotina e tiosulfato de Na, respectivamente.

A ocorrência natural de heterocariose em fungos patogênicos, como já citado, é muito pouco estudada, mas ela poderia representar um processo de adaptação gradual e os segregantes originados, seja por crossing-over mitótico, seja pelo processo de haploidização, tornariam-se mais adaptados e deles se originariam raças ou variantes mais virulentos.

Atualmente, as técnicas moleculares, através de eletroforese em campo pulsado (CHEF), possibilitaram com certa facilidade a determinação do número de cromossomos em fungos, principalmente nos fungos imperfeitos (Osiewacz & Ridder, 1991). A técnica permite também o isolamento de DNA *cromossômico* de vários organismos (Orbach *et al.*, 1988). Pfeifer & Khachatourians (1993b), através do cariótipo eletroforético, definiram como sendo 8 o número de cromossomos em *B. bassiana*. Já Shimizu *et al.* (1993), empregando a mesma técnica, definiram como sendo 6 o número de cromossomos da espécie. Essas diferenças podem ser atribuídas à adequação da técnica durante a separação das bandas. Por essa metodologia, foram observadas diferenças significantes no tamanho dos cromossomos entre isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Shimizu *et al.*, 1992, 1993). Cariótipos eletroforéticos de *Paecilomyces fumosoroseus* e *P. farinosus*, no entanto, exibiram um alto grau de similaridade entre os isolados (Shimizu *et*

al., 1991, 1993). Shimizu *et al.* (1991) definiram como sendo 6 o número de cromossomos de *P. fumosoroseus* e Shimizu *et al.* (1992) determinaram 7 bandas cromossômicas para *M. anisopliae*.

Até o momento, em nossos estudos de genética clássica utilizando a parameiose, identificamos 8 marcas localizadas em 4 grupos de ligação de *B. bassiana*.

A separação de cromossomos, pela técnica de CHEF em combinação com procedimentos de hibridação, permite a caracterização do genoma nuclear e o mapeamento de genes específicos, que não poderiam ser localizados pelas técnicas convencionais. Além disso, auxilia na identificação e localização de genes responsáveis pela especificidade ao hospedeiro, virulência e patogenicidade do fungo.

## MELHORAMENTO GENÉTICO DE LINHAGENS DE FUNGOS COM ÊNFASE NO CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS

Nos ítems anteriores foram descritas as ferramentas clássicas e convencionais de que o geneticista dispõe para auxiliá-lo na condução de um programa de melhoramento de agentes de biocontrole.

O conhecimento básico das características envolvidas na patogenicidade é essencial para o desenvolvimento de um eficiente programa de melhoramento. Muitas dessas características estão sob controle multigênico, porém há aquelas condicionadas por genes únicos, os quais permitem com certa facilidade sua manipulação genética e sua transferência para linhagens desejáveis. Essas características são de interesse e devem ser aproveitadas.

Entre as características de importância para o biocontrole podemos citar:

**Adesão de conídios.** O conídio de um entomopatógeno adere-se à superfície do hospedeiro, através de uma camada mucilaginosa contida no conídio (Fargues, 1984). Al-Aidroos & Bergeron (1981) descreveram um gene em *M. anisopliae* responsável pela adesão do conídio na superfície das larvas. Esse gene está ligado ao gene *brown* para coloração do conídio.

Grula *et al.* (1984) descreveram os fatores responsáveis pela adesão dos conídios e dos blastosporos de *B. bassiana* como sendo uma glicoproteína, que, além de promover a ancoragem e a orientação dos

conídios, facilita a penetração dos tubos germinativos na cutícula do inseto.

Assim, a aderência dos conídios ou dos blastósporos é um determinante importante durante o processo de patogenicidade, e deveria ser empregado com mais frequência nos programas de melhoramento genético.

**Germinação e penetração no inseto.** A germinação é outra característica de valor no controle biológico. Drummond *et al.* (1987) demonstraram que isolados de *V. lecanii* altamente patogênicos germinaram mais rápido na superfície do inseto que isolados pouco patogênicos. Em *B. bassiana* mutantes com baixa patogenicidade não germinaram ou tiveram crescimento anormal sem penetração na superfície de *Heliothis zea* (Pekrul & Grula, 1979).

O processo de penetração envolve atividades enzimáticas e mecânicas. São numerosos os trabalhos tentando relacionar a produção de enzimas, como quitinases, amilases, proteases e lipases, com a patogenicidade. É certo que esses sistemas enzimáticos estão envolvidos na penetração do fungo no inseto.

**Patogenicidade.** A morte do inseto atacado por um fungo ocorre, devido à colonização interna, acompanhada da utilização de nutrientes. Em alguns casos, foi descrita a produção de toxinas que inibem a síntese de DNA e RNA do inseto (Quiot *et al.*, 1985). Em *M. anisopliae* essa toxina foi identificada como sendo uma destruxina ciclodepsipeptídeo (Roberts, 1981). Outro ciclodepsipeptídeo foi isolado em *B. bassiana*, a beauvericina. A produção dessa toxina foi correlacionada com a patogenicidade por Ferron (1978), porém Champlin & Grula (1979) descrevem a beauvericina como um agente que não está envolvido com a patogenicidade do fungo.

A manipulação genética contribui para a elucidação do processo de patogenicidade, e associada à seleção resultaria em um aumento na produção de toxinas pelo fungo.

**Condições ambientais.** Na maioria das vezes, o emprego de fungos no biocontrole torna-se inviável, em função das condições adversas de temperatura e umidade.

A seleção de linhagens termossensíveis ou de linhagens que cresçam a temperaturas abaixo da ótima é desejável para o controle biológico. Nesse sentido, Hall (1981) observou um isolado natural de *V.*

*lecanii* crescendo a 36°C quando a temperatura ótima de crescimento está entre 20 e 25°C.

A luz ultravioleta solar é outro fator que limita o uso de fungos no controle biológico. Dessa forma, o isolamento de linhagens resistentes à UV é de interesse nos programas de melhoramento. Vilas-Boas *et al.* (1992), observaram o comportamento e a persistência no solo de mutantes resistentes à UV de *B. bassiana* e de *M. anisopliae*. A permanência dos esporos resistentes à UV no campo foi bem superior ao do tipo selvagem. Em trabalho posterior, os mutantes de *B. bassiana*, resistentes à UV foram avaliados quanto à patogenicidade em lagartas de *Diatraea saccharalis*, e observou-se que esses mutantes perderam a patogenicidade. A perda foi atribuída a inúmeras irradiações sofridas pelo fungo, durante o processo de obtenção de mutantes (Paccola-Meirelles *et al.*, in press). A patogenicidade é, na verdade, determinada por um conjunto de caracteres que são controlados por numerosos genes. No caso em questão, o mutagênico pode ter alterado alguns desses caracteres, ao mesmo tempo em que ocorreu a mutação para a resistência à UV. A transferência desse caráter para linhagens altamente patogênicas, seja através da parassexualidade ou por técnicas de transformação, é de valor para o controle biológico.

**Reconhecimento do hospedeiro.** O reconhecimento do hospedeiro determina a especificidade do fungo ao inseto. *M. anisopliae* e *B. bassiana* são patogênicos a uma grande variedade de insetos, porém observa-se que determinadas linhagens são mais específicas a determinados hospedeiros. Isso é resultado da variação no grau de reconhecimento do fungo ao inseto. Esses sinais de reconhecimento têm sido muito pouco explorados na genética e no controle biológico.

**Esporulação.** A taxa de esporulação é outra característica de interesse em um programa de melhoramento de um agente fúngico para o biocontrole. A paralisação rápida do hospedeiro, seguida de morte e liberação de um número elevado de esporos na superfície do inseto morto, facilita a dispersão do patógeno no campo.

*B. bassiana* produz um número expressivo de conídios que são facilmente liberados, secos e altamente hidrofóbicos. Esse entomopatógeno, quando repicado sucessivas vezes em meio sintético, perde a capacidade de esporulação e mostra redução acentuada na patogenicidade. Contudo, quando esse fungo é transferido para um

meio contendo extrato de lagartas, ou lagartas esterilizadas, ele recupera a taxa de esporulação.

Linhagens de fungos entomopatogênicos com produção aumentada de esporos com fácil dispersão são de interesse para os programas de melhoramento genético e para o controle biológico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMEK, L. Submerged Cultivation of the Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Folia Microbiologia*, v.10, p.255-257, 1965.
- AL-AIDROOS, K. Demonstration of a Parasexual Cycle in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v.22, p.309-314, 1980.
- AL-AIDROOS, K.; BERGERON, D. Use of the Parasexual Cycle to Relate Spore Adhesiveness to Virulence in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Genetics Society of America*, v.6, p.52, 1981.
- AL-AIDROOS, K.; ROBERTS, D.W. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with Increased Virulence Toward Mosquito Larvae. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v.20, p.211-219, 1978.
- AL-AIDROOS, K.; SEIFERT, A.M. Polysaccharide and Protein Degradation, Germination, and Virulence against Mosquitoes in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.36, p.29-34, 1980.
- ARAÚJO, W.L.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Localização de Marcas Genéticas Via Ciclo Parasexual no Fungo *Beauveria bassiana*. *Revista Brasileira de Genética*, v.14, 1991. Abstract.
- ARAÚJO, W.L.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Mycelial Development and Nuclear Differentiation in the Deuteromiceto *Beauveria bassiana*. *Journal of Microbiological Science*, v.16, p.73-78, 1993.
- ARAÚJO, W.L.; ICHIKAWA, S.M.; GENARO, J.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Mapeamento Genético Utilizando Marcas Auxotróficas no Deuteromiceto *Beauveria bassiana*. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICROORGANISMOS, 18., 1992, São Paulo. **Resumos**.
- AZEVEDO, J.L.; MESSIAS, C.L. Aspectos Genéticos do Controle Biológico de Insetos por Fungos. In: AZEVEDO, J.L. ed. **Genética de Microrganismos em Biotecnologia e Engenharia Genética**. Piracicaba: FEALQ, 1985. p.111-114.
- BAGALHI, E. Parameiose em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba: ESALQ/USP, 1987. 123p. Dissertação, Mestrado.
- BAGALHI, E.; VALADARES, M.C.C.; AZEVEDO, J.L. Parameiose in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Revista Brasileira de Genética*, v.14, p.261-271, 1991.
- BARACHO, I.R.; VENCOSKY, R.; AZEVEDO, J.L. Correlation between Size and Hybrid or Selfed State of *Cleistothecia* in *Aspergillus nidulans*. *Transactions of the British Mycological Society*, v.54, p.109-116, 1970.
- BENSACI, M.; NEUMANN, P. Selection of *Trichoderma* spp. Strains as Biocontrol Agents, Resistant to Fungicides. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v.11, p.185-186, 1989.
- BERGERON, D.; MESSING-AL-AIDROOS, K. Haploidization Analysis of Heterozygous Diploids of the Entomogenous Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v.24, p.643-651, 1982.
- BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Identification of *Beauveria bassiana* Extracellular Protease as a Virulence Factor in Pathogenicity Toward the Migratory Grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.56, p.362-370, 1990.
- BIDOCHKA, M.J.; 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*, v.25, p.107-113, 1994.
- BONATELLI JR., R.; AZEVEDO, J.L.; VALENT, G.V. Parasexuality in a Citric Acid Producing Strain of *Aspergillus niger*. *Revista Brasileira de Genética*, v.6, p.399-405, 1983.
- BOUCIAS, D.G.; MCCOY, C.M.; JOSLYN, O.J. Isozyme Differentiation Among 17 Geographical Isolates of *Hirsutiella thompsonii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.39, p.329-337, 1982.
- CARTROUX, G.; GALVEZ, J.; FERRON, P.; BLACHERE, H. Mise au Point d'une Préparation Entomopathogène a Base de Blastospores de *Beauveria Tenella* (Delaw) Siemasko Pour La Lutte Microbiologique Contre le Ver Blanc. *Annales de Zoologie-Ecologie Animale*, v.2, p.281-294, 1970.
- CHAMPLIN, F.R.; GRULA, E.A. Non-Involvement of Beauvericin in the Entomopathogenicity of *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.37, p.1122-1125, 1979.
- CHAMPLIN, E.R.; CHEUNG, P.Y.K.; PEKRL, S.; SMITH, R.J.; BURTON, R.L.; GRULA, E.A. Virulence of *Beauveria bassiana* Mutants for the Pecan Weevil. *Journal of Economic Entomology*, v.74, p.617-621, 1981.
- DE CONTI, E.; MESSIAS, C.L.; DE SOUZA, H.M.; AZEVEDO, J.L. Electrophoretic Variation in Esterases and Phosphatases in eleven Wild-Type of *Metarhizium anisopliae*. *Experientia*, v.36, p.293-294, 1980.

- DRUMMOND, J.; HEALE, J.B.; GILLESPIE, A.T. Germination and the Effect of Reduced Humidity on the Expression of Pathogenicity in *Verticillium lecanii* Against the Glasshouse Whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. **Annals of Applied Biology**, v.111, p.193-201, 1987
- ESSER, K.; KUENEN, R. **Genetics of Fungi**. New York: Springer Verlag, 1967, 500p.
- FARGUES, J. Adhesion of the Fungal Spore to the Insect Cuticle in Relation to Pathogenicity. In: ROBERTS, D.W.; AIST, J.R., ed. **Infection Processes of Fungi**. New York: The Rockefeller Foundation, 1984, p.90-110.
- FARGUES, J.; ROBERT, P.H.; REISINGER, O. Formulation des Production de Masse de L'Hyphomycete Entomopathogene *Beauveria* en Vie des Applications Phytosanitaires. **Annales de Zoologie - Ecologie Animale**, v.11, p.247-257, 1979.
- FEGAN, M.; MANNERS, J.M.; MACLEAN, D.J.; IRWIN, J.A.G.; SAMUELS, K.D.Z.; HOLDOM, D.G.; LI, D.P. Random Amplified Polymorphic DNA Markers Reveal a High degree of Genetic Diversity in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, v.139, p.2075-2081, 1993.
- FERRON, P. Biological Control of Insect Pests by Entomogenous Fungi. **Annual Review of Entomology**, v.23, p.409-442, 1978.
- FRIGO, S.M.; AZEVEDO, J.L. Variabilidade Natural para Crescimento, Condição e Sobrevivência à luz UV em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. **Revista de Agricultura**, v.61, p.137-147, 1984.
- FURLANETO, M.C.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Intraspecific Hybridisation of *Trichoderma* by anastomosis and by protoplast fusion. **FEMS Microbiology Letters**, v.90, p.191-196, 1992.
- GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A. Biological and Integrated Control of Grey Mold of Grape in Italy. **Trichoderma News letter**, Coventry, v.4, p.4, 1988.
- GRULA, E.A.; WOODS, S.P.; RUSSEL, H. Studies Utilizing *Beauveria bassiana* as an Entomopathogen. In: ROBERTS, D.W.; AIST, J.R.; ed **Infection Processes of Fungi**. New York: The Rockefeller Foundation, 1984, p.147-152.
- HALL, R.A. *Verticillium lecanii* as a Microbial Insecticide of Aphids and Scales. In: BURGESS, H.D., ed. **Microbial Control of Pests and Plant Diseases**. New York, Academic Press, 1981, p.483-498.
- HALL, R.A.; LATGÉ, J.P. Étude de Quelques Facteurs Stimulant La Formation *in vitro* des Blastospores de *Verticillium Lecanii* (Zimm) Viegas. **Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances De L'Academie De Sciences**, v.291, p.75-78, 1980.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v.67, p.597-607, 1975.
- HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Construction of Cloned DNA Probes for the Specific Detection of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* in Grasshoppers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.62, p.233-240, 1993a.
- HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Identification of Molecular Variants in Mitochondrial DNAs of Members of the Genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Tolyposcladium* and *Metarhizium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.4283-4288, 1993b.
- HEGEDUS, D.D.; PFEIFER, T.A.; MACPHERSON, J.M.; KHACHATOURIANS, G.G. Cloning and Analysis of Five Mitochondrial tRNA-Encoding Genes from the Fungus *Beauveria bassiana*. **Gene**, v.109, p.149-154, 1991.
- JACKSON, C.W.; HEALE, J.B. Parasexual Crosses by Hiphal Anastomosis and Protoplast Fusion in the Entomopathogen *Verticillium Lecanii* (Zimm) Viegas. **Journal of General Microbiology**, v.133, p.3537-3547, 1987.
- JINKIS, J.L. Heterocaryosis: A System of Adaptation in Wild Fungi. **Proceedings of the Royal Society of Boston**, v.140, p.105-145, 1952.
- KHACHATOURIANS, G.G. Physiology and Genetics of Entomopathogenic Fungi. In: ARORA, D.K.; RAI, B.; MUKERJI, K.G.; KNUDSEN, G.R., ed. **Handbook of Applied Mycology**. New York: Marcel Dekker, 1991, p.613-663.
- KOSIR, J.M.; MACPHERSON, J.M.; KHACHATOURIANS, G.G. Restriction Fragment Length Polymorphisms from the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.37, p.534-541, 1991
- LAILLIER-ROUSSEAU, D. Adaptation et Mise au Point D'une Technique de Crible de Mutants Auxotrophes chez le *Penicillium Baamense* Von Beyna. **Academic Science of Paris**, v.277, p.2582-2584, 1972.
- LEITE, B.; MESSIAS, C.L. Atividade Enzimática para Linhagens de *Metarhizium anisopliae*. **Boletim do Grupo de Pesquisa em Controle Biológico**, v.5, p.13, 1984.
- LUNA, E.A. Características Citológicas e Genéticas de Linhagens selvagens, Mutantes e Diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metsc.) Sorokin. Rio de Janeiro: UFRJ, 1985 250p. Tese, Doutorado.
- MAGOON, J.; MESSING-AL-AIDROOS, K. Epistatic Relationships and Linkage among Colour Markers of the Imperfect Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.28, p.96-100, 1986.
- MAY, B.; ROBERTS, D.W.; SOPER, R.S. Intraspecific Genetic Variability in Laboratory Strains of *Entomophthora* as Determined by Enzyme Electrophoresis. **Experimental Mycology**, v.3, p.289-297, 1979.
- MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L. Parasexuality of the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.75, p.473-477, 1980.
- ORBACH, M.J.; VOLRATH, D.; DAVIS, R.W.; YANOFSKY, C. An Electrophoretic Karyotype of *Neurospora crassa*. **Molecular and Cellular Biology**, v.8, p.1469-1473, 1988.
- OSIEWACZ, H.D.; RIDDER, R. Genome Analysis of Imperfect Fungi: Electrophoretic Karyotyping and Characterization of the Nuclear Gene Coding for Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (gpd) of *Curvularia lunata*. **Current Genetics**, v.20, p.151-155, 1991.
- PACCOLA, L.D.; FUNGARO, M.H.P.; ARANTES, O.M.N. Diâmetro de núcleo e conídios e curva de sobrevivência em diferentes isolados de *Beauveria bassiana*. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 11, 1984, Londrina. **Resumos Londrina**, 1984, p.63.

- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; AZEVEDO, J.L. Natural Variability in the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. **Arquivos de Biologia e Biotecnologia**, v.33, p.657-672, 1990.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; AZEVEDO, J.L. Parasexuality in *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.57, p.172-176, 1991.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; GENARO, J.H. Análise Comparativa entre Diferentes Métodos de Indução e Seleção de Mutantes para Auxotrofia em *Beauveria bassiana*. **Revista Brasileira de Genética**, v.16 abstract, 1993
- PAPAVIZAS, G.C.; LEWIS, J.A.; MOITY, A.E. Evaluation of New Biotypes of *Trichoderma harzianum* for Tolerance to Benomyl and Enhance Biocontrol Capabilities. **Phytopathology**, v.72, p.126-132, 1982.
- PARIS, S. Heterocaryons chez *Beauveria tenella*. **Mycopathologia**, v.61, p.67-75, 1977.
- PARIS, S.; FERRON, P. Study of the Virulence of Some Mutants of *Beauveria brongniartii* (= *Beauveria tenella*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.34, p.72-77, 1979.
- PARIS, S.; FERRON, P.; FARGUES, J.; ROBERT, P. Physiological Characteristics and Virulence of Auxotrophic and Morphological Mutants of *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch (*Beauveria tenella*). **Mycopathologia**, v.91, p.109-116, 1985.
- PEKRUL, S.; GRULA, E.A. Mode of Infection of the Corn Earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as Revealed by Scanning Electron Microscopy. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.34, p.238-247, 1979.
- PFEIFER, T.A.; KHACHATOURIANS, G.G. Isolation of DNA from Entomopathogenic Fungi Grown in Liquid Cultures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.61, p.113-116, 1993a.
- PFEIFER, T.A.; KHACHATOURIANS, G.G. Electrophoretic Karyotype of the Entomopathogenic Deuteromycete *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.61, p.231-235, 1993b.
- PONTECORVO, G. The Genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v.5, p.141-238, 1953.
- PONTECORVO, G. Mitotic Recombination in the Genetic Systems of Filamentous Fungi. **Caryologia**, suppl., p.1-9, 1954.
- PONTECORVO, G.; SERMONTI. Parasexual Recombination in *Penicillium chrysogenum*. **Journal of General Microbiology**, v.11, p.94-104, 1954.
- PONTECORVO, G.; KAUFER, E. Genetic Analyses Based on Mitotic Recombination. **Advances in Genetics**, v.9, p.71-104, 1958.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A. Diploids and Mitotic Recombination. **Advances in Genetics**, v.5, p.218-233, 1953.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MACDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The Genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v.5, p.141-238, 1953.
- QUIOT, J.M.; VEY, A.; VAGO, C. Effects of Mycotoxins on Invertebrate Cells *in vitro*. In: MARAMOROSCH, K., ed. **Advances in Cell Culture**. New York: Academic Press, 1985. p.199-212.
- RIBA, G.; GLANDARD, A. Mise au point d'un Milieu Nutritif Pour la Culture Profonde du Champignon Entomopathogène *Normuraea rileyi*. **Entomophaga**, v.24, p.317-322, 1980.
- RIBA, G.; AZEVEDO, J.L.; MESSIAS, C.L.; SILVEIRA, W.D.; TUVERSON, R. Studies of the Inheritance of Virulence in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.46, p.20-25, 1985.
- RIBA, G.; SOARES JR., G.G.; SAMSON, R.A.; ONILLON, J.; CAUDAL, A. Isoenzyme Analysis of Isolates of the Entomogenous Fungus *Toxopneustes cylindrosporum* and *Toxopneustes extinguis* (Deuteromycotina; Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.48, p.362-367, 1986.
- ROMBACH, M.C.; HUMBER, R.A.; EVANS, H.C. *Metarhizium album*, a Fungal Pathogen of Leaf and Plant Hoppers of Rice. **Transactions of the British Mycological Society**, v.81, p.451-459, 1987.
- ROBERTS, D.W. Toxins. In: BURGESS, H.D. ed. **Microbial Control of Pests and Plant Diseases**. New York: Academic Press, 1981. p.441-464.
- ROPER, J.A. Production of Heterozygous Diploids in Filamentous Fungi. **Experientia**, v.8, p.14-15, 1952.
- ROSATO, Y.B.; MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L. Production of Extra-cellular Enzymes by Isolates of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.38, p.1-3, 1981.
- SAMUELS, K.D.Z.; HEALE, J.B.; LLEWELLYN, M. Characteristics Relating to the Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* towards *Nilaparvata lugens*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.53, p.25-31, 1989.
- SHIMIZU, S. A Method for the Isolation of Amino Acid-Requiring Mutants in *Beauveria bassiana*. **Journal of Sericultural Science of Japan**, v.55, p. 472-476, 1986.
- SHIMIZU, S.; ARAI, Y.; MATSUMOTO, T. Electrophoretic Karyotype of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.60, p.185-187, 1992.
- SHIMIZU, S.; NISHIDA, Y.; YOSHIOKA, H.; MATSUMOTO, T. Separation of Chromosomal DNA molecules from *Paecilomyces fumosoroseus* by Pulsed-Field Electrophoresis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.58, p.461-463, 1991.
- SHIMIZU, S.; HIGASHIYAMA, R.; MATSUMOTO, T. Chromosome Length Polymorphisms in *Beauveria bassiana*. **Journal of Sericultural Science of Japan**, v.62, p.45-49, 1993.
- SILVA, J.C.; MESSIAS, C.L. Virulence of Mutants and Revertants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* toward *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.48, p.368-374, 1986.
- SILVA, T.M.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Caracterização Genética e Determinação do Número de Núcleos em Diferentes Isolados de *Helminthosporium euphorbiae*. **Revista Brasileira de Genética**, v.18, p.222, 1995.
- SILVEIRA, W.D.; AZEVEDO, J.L. Isolation of Auxotrophic Mutants of *Metarhizium Anisopliae* by the Filtration Enrichment Technique. **Revista Brasileira de Genética**, v.9, p.149-152, 1987.
- SINGLETON, J.R. Chromosome Morphology and the Chromosome Cycle in the Ascus of *Neurospora Crassa*. **American Journal of Botany**, v.40, p.124-144, 1953.

- SMITH, R.J.; PEKRUL, S.; GRULA, E.A. Requirement for Sequential Enzymatic Activities for Penetration of the Integument of Corn Earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.38, p.335-344, 1981.
- SOPER, R.S.; MAY, B.; MARTINELL, B. *Entomophaga grylli* enzyme polymorphism as a technique for pathotype identification. **Environmental Entomology**, v.12, p.720-723, 1983.
- STERN, C. Somatic Crossing Over and Segregation in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v.21, p.625-730, 1936.
- ST. LEGER, R.J.; ALLEE, L.L.; MAY, B.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. World-wide Distribution of Genetic Variation Among Isolates of *Beauveria* spp. **Mycological Research**, v.96, p.1007-1015, 1992 a.
- ST. LEGER, R.J.; MAY, B.; ALLEE, L.L.; FRANK, D.C.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Genetic Differences in Allozymes and in Formation of Infection Structures Among Isolate of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.60, p.89-101, 1992 b.
- TIGANO, M.S.; RIBA, G. Esterases Polymorphism and Pathogenicity of the Entomogenous fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.19, p.315-327, 1990.
- TIGANO-MILANI, M.S.; GOMES, A.C.M.M.; SOBRAL, B.W.S. Genetic Variability Among Brazilian Isolates of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.65, p.206-210, 1995a.
- TIGANO-MILANI, M.S.; HONEYCUTT, R.; LACEY, L.A.; ASSIS, R.; McCLELLAND, M.; SOBRAL, B.W.S. Genetic Variability of *Paecilomyces fumosoroseus* Isolates Revealed by Molecular Markers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.65, p.274-282, 1995b.
- TIGANO-MILANI, M.S.; SAMSON, R.A.; MARTINS, I.; SOBRAL, B.W.S. DNA Markers for Differentiating Isolates of *Paecilomyces lilacinus*. **Microbiology**, v.141, p.239-245, 1995c.
- TINLINE, R.D.; NOVELLO, C. Heterocariosis in the Entomogenous Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycologia**, v.63, p.701-712, 1971.
- USENKO, L.I.; KIRSANOVA, R.V.; LEVITIN, M.M. Genetics and Selection of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. II. The Virulence of Auxotrophic Mutants of *Beauveria bassiana* on *Drosophila Melanogaster*. **Genetika**, v.9, p.1421-1425, 1973.
- VEY, A.; FARGUES, J.; ROBERT, P. Histological and Ultrastructural Studies of Factors Determining the Specificity of Pathotypes of the Fungus *Metarhizium anisopliae* for Scabaeid Larvae. **Entomophaga**, v.24, p.387-397.
- VILAS-BOAS, A.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; LUNA ALVES, E.A.L. Development of Biological Insecticides for Pest Control. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.35, p.749-761, 1992.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, R.; LIVAK, K.J. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.
- YORINORI, J.T.; GAZZIERO, D.L.P. Control of Milk Weed (*Euphorbia heterophylla*) with *Helminthosporium* sp. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM BIOLOGICAL CONTROL OF THE WEEDS, 7, 1989 **Proceedings** p.571-576.
- ZAMBINO, P.J.; HARRINGTON, T.C. Isozyme Variation Within and Among Host-specialized Varieties of *Leptographium wagneri*. **Mycologia**, v.81, p.122-133, 1989.

# 7

## ENGENHARIA GENÉTICA DE MICRORGANISMOS AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

**Maria Cléria C. Valadares-Inglis**

**William Shiler**

**Marlene T. De-Souza**

### INTRODUÇÃO

Os microrganismos têm assumido importante papel no controle de insetos-pragas e doenças de importância agrícola. Vírus, bactérias e fungos são utilizados em programas de controle biológico. Centenas de vírus, pertencentes a diferentes grupos, são conhecidos infectando artrópodes. O grupo mais importante é o baculovírus, o qual inclui os vírus da poliedrose nuclear (NPV) e os vírus da granulose (GV). A grande vantagem desses vírus reside na sua alta especificidade, o que denota o potencial de uso de pesticidas microbianos seletivos (ver revisão de Enstwistle & Evans, 1985; Moscardi, 1986). Entretanto, de acordo com Jutsum (1988), do ponto de vista comercial, o maior potencial para controle biológico reside na utilização de bactérias e fungos, os quais podem ter custo efetivo de produção comparável aos dos químicos disponíveis no mercado. Dentre as bactérias com potencial de uso no controle biológico de insetos, destacam-se as do gênero *Bacillus*. O *Bacillus thuringiensis* (Bt) tem sido amplamente estudado sob o ponto de vista genético. Os cristais tóxicos e os genes que codi-

ficam estas proteínas vêm sendo isolados e estudados quanto à regulação e expressão. Os fungos entomopatogênicos, por sua vez, foram os primeiros organismos a serem usados para o controle de insetos-praga. Quanto aos fungos, como os mecanismos relacionados ao desenvolvimento da doença são altamente complexos, os genes envolvidos na patogenia não são, até o momento, completamente conhecidos.

Microorganismos também apresentam amplo potencial como agentes de controle de doenças de plantas. Agentes de controle biológico são particularmente eficientes contra espécies do gênero *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Typhula* e *Rhizoctonia*, além de outros. Dentre os microrganismos efetivos no combate dessas doenças estão algumas espécies de fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Gliocladium* e *Penicillium*, bem como algumas bactérias, principalmente *Pseudomonas*. Os mecanismos envolvidos compreendem principalmente a competição e o parasitismo. As relações entre patógeno e agente controlador se estabelecem em vários níveis, e atualmente são estudados os antibióticos e enzimas hidrolíticas secretados por esses agentes. Genes que codificam para enzimas hidrolíticas, como celulasas e quitinases, estão sendo isolados e analisados quanto aos mecanismos de regulação e importância das enzimas nas interações dos agentes de controle e agentes causadores de doenças.

Com as novas técnicas da engenharia genética, tornou-se possível a caracterização de espécies, bem como a criação de novos genótipos com maior capacidade de controlar pragas e doenças. Clonagem e transferência de genes têm permitido abordar os mecanismos de interação entre espécies.

## BACULOVÍRUS

### Importância

Os baculovírus constituem uma família de vírus isolados da classe Arthropoda, sendo em sua maioria encontrados em insetos, principalmente da ordem Lepidoptera. Devido ao seu papel natural como reguladores de populações no campo, seu uso até recentemente estendeu-se ao controle biológico (Bishop *et al.*, 1988). Sua especificidade e segurança, por não infectarem vertebrados ou plantas, além de sua facilidade

de aplicação pelo homem do campo, são vantagens que contribuem para o crescente interesse em seu estudo. São hoje disponíveis várias revisões sobre baculovírus relativas à sua biologia (Granados & Frederici, 1986), sua aplicação como inseticida (Granados, 1988) e sobre sua aplicação como vetores de expressão (Maeda, 1989; Luckow & Summers, 1988).

Uma das principais características dos baculovírus é seu grande tamanho, devido ao cristal protéico que os envolve. Este cristal é constituído principalmente da proteína poliedrina, que confere a forma de poliedro ao vírus. Essa estrutura é responsável pela proteção das unidades virais (nucleocapsídeo) nele ocluídos. Além disso, o acúmulo de poliedros no núcleo é responsável pela lise celular. Assim, a morte do inseto ocorre por uma ação mecânica e não química (por ação tóxica por parte do cristal da poliedrina).

É um DNA de fita dupla e circular que varia de 80 a 200 kb (Arif, 1986). O DNA é empacotado em nucleocapsídeos em forma de bastonetes, que adquirem envelopes através da membrana plasmática, ou por um processo de envelopamento nuclear (Miller, 1988).

Taxonomicamente, divide-se a família Baculoviridae nos gêneros *Nucleopolhiedrovirus*, composto pelos vírus de poliedrose nuclear (NPVs) e *Granulovirus*, compreendendo os vírus de granulose (Gvs) (Murphy *et al.*, 1995).

O ciclo da doença é iniciado quando o inseto digere o poliedro juntamente com seu alimento. A matriz protéica do cristal é dissolvida no lúmen do intestino médio, devido ao seu alto pH (10,5). Uma vez no interior da célula, o vírion se replica e vírus extracelulares passam à infecção sistêmica do inseto, através do sistema traqueal (Engelhard *et al.*, 1994) e hemolinfa.

## Regulação de Expressão Gênica

A análise da regulação e expressão gênica na replicação viral mostra que o processo ocorre numa seqüência ordenada em que cada fase sucessiva depende da anterior. Estudos de síntese de proteínas virais em células infectadas e uso de inibidores de síntese de proteínas (Maruniak & Summers, 1981; Kelly & Lescott, 1981) sugeriram inicialmente o modelo cascata. Análise do RNA mensageiro (mRNA) viral de vários genes por *northern blot*, ensaios de proteção à nuclease S1 e extensão

de *primer* identificaram classes temporais de transcritos. Sabe-se atualmente que a regulação ocorre a nível de transcrição com produtos de uma classe temporal de genes virais, transativando a transcrição de outra classe (Friesen & Miller, 1986; Guarino & Summers, 1986).

Em cultura de células, o ciclo de infecção pode ser dividido em três fases (O'Reilly *et al.*, 1992):

**Inicial** (*early* – reprogramação celular): Uma vez no núcleo da célula, o DNA do vírus começa a ser transcrito, sendo que os RNAs podem ser detectados 30 minutos após a infecção (Chisholm & Henner, 1988). Durante essa fase, que precede a replicação do DNA viral, ocorrem rearranjos no citoesqueleto e a cromatina da célula hospedeira se dispersa no núcleo.

**Tardia** (*late* – produção de vírus extracelulares): Período em que ocorre replicação do DNA viral, expressão de genes tardios e produção de vírus extracelulares (ECVs). Compreende o período entre 6 e 20 horas pós infecção (h.p.i). A produção de ECVs é logarítmica entre 12 e 20 h.p.i., decaindo em seguida (Knudson & Harrap, 1976). É nessa fase também que é formado o estroma virogênico, os capsídeos são montados e associados ao DNA viral.

**Muito tardia** (*very late* – produção de vírus oclusos): Inicia-se cerca de 20 h.p.i. Durante esta fase ocorre o processo de oclusão. Os vírions são montados no núcleo, envelopados *de novo* por um mecanismo ainda não compreendido e, então, envolvidos na matriz de poliedrina do corpo de inclusão.

Os poliedros se dispõem em forma de anel no núcleo celular, onde se acumulam, provocando o rompimento da célula. Numa infecção típica de Vírus da Poliedrose Múltipla Nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV) em células permissivas, é observada uma média de 70 corpos de inclusão por núcleo.

## Sistemas de Expressão

Dentre as vantagens para utilização de baculovírus como vetores de expressão estão: estabilidade, potencial para expressão em altos níveis de genes heterólogos, existência de promotores fortemente ativos durante a fase tardia da infecção (não interferindo no ciclo viral), capacidade para clonagem de grandes inserções, eficiência na expressão de genes que não precisam de *splicing* e simplicidade de manipulação.

O sistema de expressão de baculovírus de insetos fornece um ambiente apropriado para a síntese de proteínas eucarióticas, pois é capaz de oferecer condições para que ocorra o dobramento adequado da estrutura da proteína, formação de pontes dissulfídicas, oligomerização, modificações pós-traducionais (incluindo clivagem de peptídeo sinal, clivagem proteolítica, N-glicosilação, O-glicosilação, acilação, amidação, fosforilação e carboximetilação), similares às produzidas em células de mamíferos (O'Reilly *et al.*, 1992).

## Construção de Vetores de Expressão

A existência de diferentes fases na regulação gênica dos baculovírus oferece oportunidades de expressão de genes heterólogos, sob diferentes condições celulares.

Altas concentrações de proteínas heterólogas podem ser produzidas, sendo já conhecidos casos de expressão a níveis de 25-50% da proteína total de células infectadas. A maioria é produzida em cerca de 10-100 mg para cada  $10^9$  células. A expressão durante a fase de oclusão é vantajosa pelo uso dos promotores fortes e pela possibilidade de expressão tardia de genes citotóxicos. No entanto, deve-se considerar que há um declínio na capacidade de processamento pós-traducional nas células infectadas, em consequência dos danos ao retículo endoplasmático e ao aparelho de Golgi, responsáveis por estes processamentos, já comprometidos pela infecção. O sistema, devido ao nucleocapsídeo em forma de bastonete, é capaz de comportar até 100.000 pares de base de DNA adicionais, sendo no momento o maior inserto de 15.000 pares de base. Além disso, mais de um gene heterólogo pode ser expresso ao mesmo tempo, permitindo o estudo de interação entre os seus produtos (O'Reilly *et al.*, 1992).

Os genes muito-tardios dos baculovírus não sofrem *splicing*, provavelmente pelo declínio celular nesse período. Genes sem íntrons apresentam, portanto, uma expressão mais eficiente (O'Reilly *et al.*, 1992).

A tecnologia para construção de vetores de baculovírus é baseada em plasmídeos de transferência. Estes últimos são unidades replicativas, que contêm regiões flanqueadoras do gene que se pretende substituir no genoma viral, incluindo ou não o gene propriamente dito, regulado por seu promotor, e um *polylinker*, que deverá ser usado como sítio de

clonagem. A montagem é toda feita em plasmídeos, devido à fragilidade do grande DNA viral (80-220 kb). Uma vez construído o plasmídeo, deve-se proceder à cotransfecção da célula do inseto utilizando o DNA viral parental e o DNA plasmidial. Através de recombinação homóloga, o gene original no vírus é trocado pelo gene de interesse contido no plasmídeo e um novo vírus, recombinante, é obtido. Através de sucessivas purificações, chega-se a um clone viral.

O gene da poliedrina foi inicialmente escolhido para ser substituído, por possuir um promotor forte e por seu produto não ser essencial ao ciclo de infecção do vírus. Além disso, o fato de o promotor da poliedrina só ser ativado tardiamente na infecção facilita a expressão de produtos que possam interferir na regulação viral.

A localização do gene da poliedrina foi determinada no genoma do vírus do AcMNPV. O fragmento contendo o gene e regiões flangeadoras foi clonado no plasmídeo pUC 8 e, então, eliminada a seqüência codificadora da poliedrina. Essa região eliminada foi substituída por uma seqüência sintética de sítios para clonagem. Desta forma, tornou-se fácil a inserção de genes em substituição ao da poliedrina (Summers & Smith, 1987).

Dependendo da presença ou não da região codante da poliedrina no plasmídeo, a identificação dos vírus recombinantes pode ser feita facilmente através da observação dos fenótipos ocluso-positivo (formação de cristais) ou ocluso-negativo (não-formação de cristais). Recombinantes são selecionados quanto à presença de placas de vírus oclusos negativos, ou por *dot-blot*, utilizando sondas para a seqüência inserida.

Existem também os vírus construídos com base no AcMNPV que possuem a seqüência da  $\beta$ -galactosidase no local de clonagem. Dessa forma, a seleção de um recombinante é facilitada em presença do substrato sintético (X-Gal), pois o vírus parental deverá mostrar-se azul, enquanto o vírus que recebeu o inserto terá o gene da  $\beta$ -galactosidase interrompido e irá apresentar-se branco (O'Reilly *et al.*, 1992).

O vetor de baculovírus mais empregado utiliza-se, portanto, do promotor do gene da poliedrina, que é altamente expressa e finamente regulada no AcMNPV. Isso permite a expressão de genes procarióticos ou eucarióticos para produção de proteínas fusionadas ou não. Uma das grandes vantagens desse sistema sobre os outros, além da alta

expressão, é que as proteínas recombinantes são, na maioria das vezes, semelhantes às suas correspondentes originais, no que se refere à antigenicidade e funcionalidade (Luckow & Summers, 1988).

Diversos plasmídeos de transferência utilizam-se do promotor do gene que codifica para a proteína tardia e não essencial P10 ou mesmo de promotores que dirigem a síntese da poliedrina, aumentando o nível de transcrição, na ordem de 50% em relação ao original (Ooi *et al.*, 1989), e de combinações de promotores diferentes em seqüência (Weyer *et al.*, 1990).

Comparação da seqüência do gene da poliedrina de vários baculovírus mostrou ser esta altamente conservada, o que possibilita a síntese de sondas para localização do gene correspondente em outros vírus. A clonagem de promotores desse gene de diferentes vírus permite a comparação entre a eficiência deles.

Os promotores dos genes da fase tardia e muito-tardia da infecção apresentam o tetranucleotídeo TAAG, localizado no ponto inicial da transcrição (Thiem & Miller, 1989; Rohrmann, 1986). Essa seqüência está provavelmente envolvida na regulação de tais genes. Os nucleotídeos acima dessa seqüência TAAG parecem ser importantes para a determinação do nível de expressão dos genes que se seguem. O nucleotídeo A colocado antes da seqüência (ATAAG) torna o promotor ainda mais eficiente; níveis mais fracos são observados em regiões iniciadas em TTAAG e GTAAG (Nissen & Friesen, 1989).

Os promotores da fase tardia são insensíveis ao antibiótico  $\alpha$ -amanitina, sugerindo que deve haver uma RNA polimerase modificada (pela produção de subunidades vírus-específicas), ou mesmo uma nova enzima viral (O'Reilly *et al.*, 1992; Blissard & Rohrmann, 1990).

O uso de vetores de baculovírus é extremamente importante na produção em larga escala de substâncias que dificilmente seriam adequadamente sintetizadas por procariotos. Mais de trezentos genes, isolados de bactérias, fungos, vírus e vertebrados, incluindo humanos, já foram expressos por esse sistema (O'Reilly *et al.*, 1992). Além disso, biopesticidas melhorados podem ser desenvolvidos para aumento da virulência ou aceleração do processo de morte do inseto-alvo no campo, como, por exemplo, toxinas específicas de *B. thuringiensis* ou de escorpião (Hawtin & Possee, 1993). Para isso, no entanto, uma série de rigorosos testes deve antes ser executada em laboratório.

## **BACILLUS THURINGIENSIS**

### **Considerações Gerais**

Nos últimos anos, tem sido alto o investimento na otimização de agentes de controle biológico (ACB). As bactérias vêm-se destacando entre estes. A maioria pertence às famílias Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Micrococcaceae e Bacillaceae. A última família tem-se revelado a mais promissora para o controle de insetos nocivos.

Apesar de todos os benefícios, somente alguns biopesticidas têm sido empregados. Atualmente, apenas 1% das pragas da agricultura e vetores transmissores de doenças é controlado por compostos originários de organismos vivos. Entretanto, em mais de 30 anos como ACB, o *Bacillus thuringiensis* (Bt) é responsável por 90-95% desse mercado. A bactéria foi isolada de larvas mortas de *Bombyx mori* (bicho-da-seda) e descrita pela primeira vez, no início do século, pelo bacteriologista japonês Ishiwata (1901). Sua denominação atual data de seu reisolamento a partir de larvas mortas de *Anagatha kuniella*, no distrito de Thuringe, Alemanha (Berliner, 1911).

O *B. thuringiensis* é uma bactéria de solo, Gram-positiva, esporulante e anaeróbica facultativa. A atividade entomopatogênica desse microrganismo deve-se à presença de uma inclusão cristalina produzida durante a esporulação. O cristal, composto por proteínas denominadas  $\delta$ -endotoxinas ou proteínas cristal (Cry), apresenta ação extremamente tóxica (centenas a milhares de vezes mais potente que agrotóxicos) e altamente específica para larvas de insetos de três ordens: Lepidoptera, Diptera e Coleoptera. As toxinas contidas no cristal são virtualmente inócuas para o homem, os vegetais, os animais e outros invertebrados. A maioria das cepas pode sintetizar mais de um tipo de cristal (revisado por Lereclus *et al.*, 1993). Os cristais podem ser formados por diferentes  $\delta$ -endotoxinas, necessariamente relacionadas, podendo haver casos em que pelo menos cinco toxinas são encontradas. A forma das inclusões cristalinas é decorrente da composição (proteínas com massa molecular variando entre 27 e 140 kDa). Dessa maneira, pode-se estabelecer uma correlação parcial entre estrutura e composição do cristal. Uma vez que cada tipo de  $\delta$ -endotoxina é ativa para um número limitado de insetos, a correlação pode ser estendida para o

inseto-alvo. Conseqüentemente, a análise dos cristais protéicos por microscopia de contraste de fase e do perfil eletroforético dá uma idéia inicial do espectro de ação.

Baseado nas seqüências nucleotídicas conhecidas, sondas específicas de DNA e anticorpos monoclonais são utilizadas para determinar a composição de  $\delta$ -endotoxinas de uma cepa determinada e, conseqüentemente, sua possível atividade entomocida (Lereclus *et al.*, 1993). Atualmente, *primers* específicos para cada classe são ferramentas potentes e amplamente utilizadas para a predição da atividade (Shin, 1995; Kalman, 1993; Carozzi, 1991) via PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Essa estratégia permite direcionar os bioensaios, que irão confirmar a predição com grande economia de tempo e material.

Em 1962, De Barjac & Bonnefoi propuseram uma classificação baseada em propriedades bioquímicas e na aglutinação de antígenos flagelares (antígeno H). Atualmente, existem catalogados 45 sorotipos (Lecadet, comunicação pessoal), porém essa classificação não está relacionada com a atividade entomocida, que é definida pela composição das  $\delta$ -endotoxinas.

Em 1989, quando 14 tipos diferentes de  $\delta$ -endotoxinas haviam sido caracterizadas, Höfte & Whiteley propuseram uma nomenclatura baseada nas seqüências de aminoácidos deduzidas e no espectro de atividade. Foram descritas cinco classes principais: CryI (ativa para Lepidoptera); CryII (Lepidoptera e Diptera); CryIII (Coleoptera); CryIV (Diptera), e Cyt (citolisina, associada a CryIV), que, por não apresentar homologia com as demais classes ou atividade específica, foi distinguida como uma classe à parte. Uma nova toxina com atividade dupla para larvas de Coleoptera e Lepidoptera foi designada CryV (Tailor *et al.*, 1992).

Atualmente, com mais de 50 tipos de genes de proteínas Cry, clonados e seqüenciados, a nomenclatura se tornou inadequada, já que genes com seqüências similares apresentam atividade entomocida distinta. Diante desse quadro, foi criado um comitê internacional, que está propondo uma nova nomenclatura baseada apenas nas seqüências de aminoácidos.

A maioria dos estudos sobre o modo de ação das proteínas Cry foi realizada em Lepidoptera (revisado por Knowles & Dow, 1993). Essas toxinas, sintetizadas como protoxinas, provocam lesões no epitélio intestinal dos insetos sensíveis, em seu estágio larval. Após a ingestão,

os cristais são solubilizados dentro do tubo digestivo do inseto-alvo, graças a um pH alcalino (10, em média). Após a solubilização, são ativados por proteases contidas no fluido intestinal, liberando a porção N-terminal tóxica. Uma vez ativada, a toxina se liga de maneira irreversível a receptores específicos, presentes na superfície da membrana das células epiteliais, culminando na formação de poros (Sacchi *et al.*, 1986; Hendrickx *et al.*, 1990), seguida por desequilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular. A alteração da permeabilidade da membrana faz com que ocorra lise celular (Charles & De Barjac, 1983) e, finalmente, a morte da larva.

A primeira publicação da estrutura molecular de uma proteína cristal, CryIII A, resolvida por cristalografia de raio X (Li *et al.*, 1991), deu maior impulso para o conhecimento do modo de ação dessas toxinas. Sua estrutura consiste em três domínios que são no sentido N-C-terminal: a) domínio I, um *bundle* de 7  $\alpha$ -hélices claramente equipado para formação de poro na membrana; b) domínio II, que, constituído de três estruturas  $\beta$ -pregueadas e intercaladas com alças, exibindo padrão de seqüência, conferem a especificidade de ligação aos receptores celulares, c) domínio III, formado por um conjunto de 3 estruturas pregueadas do tipo  $\beta$ -antiparalelas, empacotadas em sanduíche, contendo a região C-terminal da maioria das proteínas Cry. Esse domínio é crítico para a integridade da estrutura da proteína. O núcleo da molécula é construído a partir dos cinco blocos de seqüências, os quais são altamente conservados na maioria das  $\delta$ -endotoxinas, sugerindo que as demais proteínas dessa família adotam dobramento similar.

## Localização e Organização Molecular dos Genes *cry*

O aparente caráter não-essencial, mas adaptativo, das  $\delta$ -endotoxinas sugere a localização plasmidial dos genes responsáveis por sua síntese. A correlação entre síntese de proteína cristal e a presença de um determinado plasmídeo foi obtida através de experimentos de cura plasmidial (Gonzalez *et al.*, 1981). Além do mais, os plasmídeos portadores de genes *cry* podem ser transferidos via conjugação, de maneira a restabelecer a produção de cristais em cepas curadas (Gonzalez *et al.*, 1982).

Com o uso de sondas homólogas às seqüências de genes que codificam as  $\delta$ -endotoxinas, ficou evidente que, na maioria das espécies,

estes estão localizados em plasmídeos de grande tamanho (40-150 MDa), que apresentam remarcada estabilidade segregacional e estão presentes em baixo número de cópias (revisado em Lereclus *et al.*, 1993). Entretanto, uma dupla localização plasmidial e cromossômica já foi observada em algumas cepas.

A descoberta de que várias cópias idênticas de um mesmo gene poderiam estar presentes dentro de uma mesma cepa e localizadas em diferentes replicons indicou que fenômenos de recombinação ou de transposição poderiam estar implicados na disseminação e diversidade dos genes das proteínas cristal (para revisão recente ver Mahiollon *et al.*, 1994). De fato, a maioria desses genes está estruturalmente associada a elementos móveis. Atualmente, 17 seqüências de inserção (IS) e duas classes de transposons já foram identificadas e caracterizadas em *B. thuringiensis*.

A associação dos processos de conjugação e mobilização dos genes de  $\delta$ -endotoxina, mediada pelos elementos móveis adjacentes a estes, pode ter contribuído para a origem da multiplicidade e diversidade das proteínas cristal apresentadas pelas cepas de *B. thuringiensis*. Por sua vez, a diversidade confere um potencial adaptativo extremamente forte a essa bactéria em termos de inseto-alvo.

## Regulação da Expressão dos Genes do Cristal

As diversas proteínas cristal são sintetizadas durante a fase estacionária e acumuladas no compartimento da célula-mãe (Ribier & Lecadet, 1973; ver também descrição da esporulação adiante). A expressão é de tal maneira eficaz que pode representar até 25 a 30% do peso seco total das células em esporulação. O conjunto de observações indica a existência de um controle temporal e espacial na expressão desses genes, que ocorre de maneira extremamente eficiente.

## Controle Temporal e Espacial na Expressão dos Genes *cry*

De acordo com o início da expressão, em função da fase do crescimento, os genes podem ser agrupados em dependentes e não-dependentes da esporulação.

**Genes dependentes da esporulação.** Em bactérias esporulantes, o processo pode ser dividido em sete estágios seqüenciais, morfo-

os cristais são solubilizados dentro do tubo digestivo do inseto-alvo, graças a um pH alcalino (10, em média). Após a solubilização, são ativados por proteases contidas no fluido intestinal, liberando a porção N-terminal tóxica. Uma vez ativada, a toxina se liga de maneira irreversível a receptores específicos, presentes na superfície da membrana das células epiteliais, culminando na formação de poros (Sacchi *et al.*, 1986; Hendrickx *et al.*, 1990), seguida por desequilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular. A alteração da permeabilidade da membrana faz com que ocorra lise celular (Charles & De Barjac, 1983) e, finalmente, a morte da larva.

A primeira publicação da estrutura molecular de uma proteína cristal, CryIIIA, resolvida por cristalografia de raio X (Li *et al.*, 1991), deu maior impulso para o conhecimento do modo de ação dessas toxinas. Sua estrutura consiste em três domínios que são no sentido N-C-terminal: a) domínio I, um *bundle* de 7  $\alpha$ -hélices claramente equipado para formação de poro na membrana; b) domínio II, que, constituído de três estruturas  $\beta$ -pregueadas e intercaladas com alças, exibindo padrão de seqüência, conferem a especificidade de ligação aos receptores celulares, c) domínio III, formado por um conjunto de 3 estruturas pregueadas do tipo  $\beta$ -antiparalelas, empacotadas em sanduíche, contendo a região C-terminal da maioria das proteínas Cry. Esse domínio é crítico para a integridade da estrutura da proteína. O núcleo da molécula é construído a partir dos cinco blocos de seqüências, os quais são altamente conservados na maioria das  $\delta$ -endotoxinas, sugerindo que as demais proteínas dessa família adotam dobramento similar.

## Localização e Organização Molecular dos Genes *cry*

O aparente caráter não-essencial, mas adaptativo, das  $\delta$ -endotoxinas sugere a localização plasmidial dos genes responsáveis por sua síntese. A correlação entre síntese de proteína cristal e a presença de um determinado plasmídeo foi obtida através de experimentos de cura plasmidial (Gonzalez *et al.*, 1981). Além do mais, os plasmídeos portadores de genes *cry* podem ser transferidos via conjugação, de maneira a restabelecer a produção de cristais em cepas curadas (Gonzalez *et al.*, 1982).

Com o uso de sondas homólogas às seqüências de genes que codificam as  $\delta$ -endotoxinas, ficou evidente que, na maioria das espécies,

estes estão localizados em plasmídeos de grande tamanho (40-150 MDa), que apresentam remarcada estabilidade segregacional e estão presentes em baixo número de cópias (revisado em Lereclus *et al.*, 1993). Entretanto, uma dupla localização plasmidial e cromossômica já foi observada em algumas cepas.

A descoberta de que várias cópias idênticas de um mesmo gene poderiam estar presentes dentro de uma mesma cepa e localizadas em diferentes replicons indicou que fenômenos de recombinação ou de transposição poderiam estar implicados na disseminação e diversidade dos genes das proteínas cristal (para revisão recente ver Mahiollon *et al.*, 1994). De fato, a maioria desses genes está estruturalmente associada a elementos móveis. Atualmente, 17 seqüências de inserção (IS) e duas classes de transposons já foram identificadas e caracterizadas em *B. thuringiensis*.

A associação dos processos de conjugação e mobilização dos genes de  $\delta$ -endotoxina, mediada pelos elementos móveis adjacentes a estes, pode ter contribuído para a origem da multiplicidade e diversidade das proteínas cristal apresentadas pelas cepas de *B. thuringiensis*. Por sua vez, a diversidade confere um potencial adaptativo extremamente forte a essa bactéria em termos de inseto-alvo.

## Regulação da Expressão dos Genes do Cristal

As diversas proteínas cristal são sintetizadas durante a fase estacionária e acumuladas no compartimento da célula-mãe (Ribier & Lecadet, 1973; ver também descrição da esporulação adiante). A expressão é de tal maneira eficaz que pode representar até 25 a 30% do peso seco total das células em esporulação. O conjunto de observações indica a existência de um controle temporal e espacial na expressão desses genes, que ocorre de maneira extremamente eficiente.

## Controle Temporal e Espacial na Expressão dos Genes *cry*

De acordo com o início da expressão, em função da fase do crescimento, os genes podem ser agrupados em dependentes e não-dependentes da esporulação.

**Genes dependentes da esporulação.** Em bactérias esporulantes, o processo pode ser dividido em sete estágios seqüenciais, morfo-

logicamente bem definidos e distinguíveis por características bioquímicas peculiares (Losick *et al.*, 1986; Betchel & Bulla, 1976). Essa série de eventos dá origem ao esporângio, que consiste em dois compartimentos celulares designados célula-mãe e pré-esporo. Em *B. subtilis*, o processo de diferenciação celular é regulado de maneira temporal e a nível transcricional, graças à ativação de seis fatores sigma ( $\sigma$ ):  $\sigma^A$ , o principal fator ativo durante a fase vegetativa; e cinco fatores que atuam na fase de esporulação e são designados  $\sigma^H$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^G$  e  $\sigma^K$ , em ordem de ativação durante o processo (recentemente revisado em Haldewang, 1995). Os fatores  $\sigma^A$  e  $\sigma^H$  atuam antes da formação do septo que dá origem à compartimentalização;  $\sigma^F$  e  $\sigma^E$  são ativos na célula-mãe e  $\sigma^G$  e  $\sigma^K$  são ativos no compartimento do pré-esporo. Esses fatores transcricionais se ligam ao núcleo da RNA polimerase (E), conferindo especificidade por promotores de genes determinados.

Os produtos dos genes de  $\delta$ -endotoxinas dependentes da esporulação começam a ser sintetizados a partir de  $t_2$  ( $t_n$  é o número de horas após o início da fase de esporulação, designado  $t_0$ ; em Bt  $t_2$  coincidente com o estágio II) e são acumulados na célula-mãe, havendo um incremento no tamanho do cristal até o  $t_{12}$  (Ribier & Lecadet, 1973).

Os dois pontos de iniciação da transcrição do gene *cryIA(a)* de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, mapeados por Wong *et al.* (1983), definiram dois promotores com seqüências sobrepostas e que são ativados de maneira seqüencial. BTI, o primeiro desses promotores, é utilizado a partir do estágio II da esporulação e é reconhecido pela RNA polimerase, associada ao  $\sigma^{35}$  (Brown & Whiteley, 1988). BTII é reconhecido pelo complexo  $E\sigma^{28}$ , a partir do estágio III (Brown & Whiteley, 1990). Os genes que codificam estes dois fatores sigma foram clonados e seqüenciados (Adams *et al.*, 1991). As seqüências de aminoácidos deduzidas dos fatores  $\sigma^{35}$  e do  $\sigma^{28}$  apresentam homologia de 88% e 85% com os fatores  $\sigma^F$  e  $\sigma^K$  de *B. subtilis*, respectivamente. Esse alto grau de homologia e habilidade em conduzir a transcrição a partir de promotores de *B. subtilis*, especificamente reconhecidos por  $\sigma^F$  e  $\sigma^K$  (Adams *et al.*, 1991), indicam uma homologia funcional entre os respectivos pares de fatores sigma (Tabela 1). Regiões similares contendo os dois tipos de promotores são encontradas *upstream* a todos os demais genes *cryI*, e genes das classes *cryII*, *cryIV* e *cyt*. Assim, a regulação temporal da síntese da proteína cristal é, pelo menos em parte, assegurada por sucessivas trocas de fatores sigma.

TABELA 1. Seqüências nucleotídicas<sup>1</sup> das regiões -35 e -10 dos genes *cry* e consenso de fatores de sigma ( $\sigma$ ) A, E e K de *B. subtilis*.

( $\sigma$ )	Região -35	Região -10	Referência
$\sigma^E$	KMATATT	CATACA-T	Moran, 1993
$\sigma^{35}$	GCAATNT	CATANNNT	Brown & Whiteley, 1988
$\sigma^K$	GKMACA	CATANNNT	Moran, 1993
$\sigma^{28}$	ND	TNATANNNTG	Brown & Whiteley, 1990
$\sigma^A$	TTGACA	TATAAT	Moran, 1993
<i>cryIII</i> A	TTGCAA	TAAGCT	De-Souza <i>et al.</i> , 1996; Agaisse & Lereclus, 1994

<sup>1</sup>Direção 5' → 3'; K = G ou T; M = C ou A; N = A, C, G ou T; ND = Não Determinado.

O alto nível de expressão, em perfeita coordenação com a esporulação, faz do *B. thuringiensis* um modelo notável para a investigação da regulação gênica em bactérias Gram-positivas capazes de esporular.

**Genes não-dependentes da esporulação.** O gene *cryIII*A, encontrado no *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, possui atividade para Coleoptera (Sekar *et al.*, 1987). Em contraste com os demais genes *cry* descritos, sua expressão não está associada à esporulação. O promotor desse gene é fracamente ativo, mas de maneira significativa, durante a fase vegetativa (De-Souza, 1993; Sekar, 1988), e a expressão é iniciada no final da fase exponencial, permanecendo apenas até cerca de  $t_0$ . A seqüência promotora responsável pela transcrição desse gene não apresenta homologia com as seqüências dos promotores BtI e BtII, mas é similar àquelas seqüências reconhecidas pelo  $\sigma^A$  (ver Tabela 1; De-Souza *et al.*, 1996; Agaisse & Lereclus, 1994a). Ademais, a ativação da seqüência promotora do referido gene não é dependente dos fatores sigma específicos da esporulação, nem em *B. subtilis* (Agaisse & Lereclus, 1994b), nem em *B. thuringiensis* (Agaisse & Lereclus, 1995). Além do mais, a expressão do gene *cryIII*A é aumentada e prolongada em cepas mutantes, que são incapazes de esporular (Agaisse & Lereclus, 1995; Lereclus *et al.*, 1995; Agaisse & Lereclus, 1994b). Dessa maneira, fatores de transcrição envolvidos na transição da fase exponencial para a fase estacionária são os responsáveis pela regulação da expressão desses genes. Outrossim, a análise da cinética de produção de  $\beta$ -galactosidase, através de fusões transcricionais (*cryIII*A<sup>+</sup>-*lacZ*), sugere que tanto em *B. subtilis* (Agaisse & Lereclus, 1994b) quanto em *B. thu-*

*ringiensis* (Agaisse & Lereclus, 1995), há um evento que reprime a expressão desse gene durante a esporulação. No entanto, o elemento envolvido no evento ainda não foi identificado.

## Estabilidade dos mRNA

A estabilidade dos RNA mensageiros (mRNA) é um elemento importante na maximização da expressão gênica. Em 1972, Glatron & Rapoport descreveram que os transcritos específicos dos genes *cry* têm uma meia-vida bastante elevada e estimada em torno de dez minutos. A presença dos *cis*-elementos envolvidos na degradação de mRNA, comumente descritos para *E. coli* e *B. subtilis*, nas regiões 5' e 3' não traduzidas dos mensageiros dos genes *cry*, pode explicar, em grande parte, a alta estabilidade dessas moléculas (para uma revisão recente ver Agaisse & Lereclus, 1995).

Wong & Chang (1986) descreveram a presença de seqüências repetidas com orientação invertida (*Inverted Repeated*, IR), localizadas na extremidade 3' do mensageiro do gene *cryIA*. O potencial desta IR em formar estrutura em alça concederia proteção aos mensageiros contra degradação por exoribonucleases com atividade 3' → 5'. É importante observar que esse tipo de estrutura terminadora putativa, denominado retroregulador positivo, é freqüentemente encontrado *downstream* às seqüências codificadoras dos genes *cry*.

A identificação e a análise funcional de uma longa seqüência de DNA (fragmento H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>), que se estende até cerca de 600 pb *upstream* ao ponto de iniciação da tradução do gene *cryIII*A, sugerem que a seqüência está envolvida na estabilidade do mensageiro (Agaisse & Lereclus, 1994a; De-Souza *et al.*, 1993). Fusões transcricionais com o gene reporter *lacZ* revelaram que duas regiões distintas estão envolvidas na expressão do gene. Um fragmento de DNA, localizado entre os nucleotídeos (nt) -635 e -558 (com referência ao ponto de iniciação da tradução), está envolvido na transcrição e contém o promotor *stricto sensu*. A segunda região, que se estende entre os nt -129 e -12, exerce um efeito a nível pós-transcricional, sendo um ponto de clivagem, que permite o acúmulo de mensageiros estáveis com extremidade 5' mapeada no nt -129. O provável elemento estabilizador é uma seqüência homóloga à seqüência Shine-Delgarno (SD), consenso presente na extremidade 5' do mRNA de *cryIII*A. Esta SD não

está envolvida na iniciação da tradução, porém análises de mutações introduzidas na região sugeriram fortemente que o fenômeno se deve a interações dessa SD com a extremidade 3' do rRNA 16S. O complexo formado com a ligação da subunidade 30S do rRNA à extremidade 5', não traduzida do gene *cryIIIA*, poderia conferir estabilidade ao mensageiro. É importante ressaltar que essa SD está presente em posição similar a de outros dois membros da classe *cryIII*, *cryIIIB* e *cryIIIB2* (Donovan *et al.*, 1992). Portanto, mecanismos semelhantes podem estar envolvidos na estabilização de mensageiros de outros membros da classe *cryIII*.

### **Número de Cópias dos Genes *cry* e Diferenciação na Expressão**

É provável que o número de cópias de cada gene *cry* presente em uma determinada cepa seja outro fator fundamental na produção relativa de cada tipo de  $\delta$ -endotoxina e, conseqüentemente, no espectro de atividade entomocida (recentemente revisado em Agaisse & Lereclus, 1995; Lereclus *et al.*, 1993). Estes devem ser considerados individualmente, quando se quer entender a toxicidade geral de uma cepa. Efeitos de titulação, tais como competição por fatores de transcrição, poderiam causar condições desfavoráveis àqueles genes portadores de seqüências promotoras homólogas e presentes em uma mesma cepa, porém com número de cópias mais baixo que os outros, e explicam, pelo menos em parte, a diferenciação na expressão.

### **Organismos Transgênicos**

Visando o aprimoramento da utilização de *B. thuringiensis* como ACB, diversos programas de isolamento de cepas e identificação de genes *cry*, com diferentes atividades entomocidas, têm sido desenvolvidos em todo o mundo. Essa bactéria é amplamente distribuída na natureza e tem sido encontrada, freqüentemente, associada a larvas mortas de insetos, aos resíduos associados ao armazenamento de grãos, plantas e solo dos mais distintos habitats.

As principais limitações das formulações convencionais de *B. thuringiensis* vêm a ser seu restrito espectro de ação, dificuldade de acesso às pragas (tais como aquelas que se alimentam de tecidos internos de plantas ou raízes), limitada persistência no campo (devido à

degradação por fatores ambientais diversos) e seu elevado custo de produção. Entretanto, acredita-se que essas restrições possam ser superadas através de processos biotecnológicos. A emergência da tecnologia do DNA recombinante (rDNA) e outras técnicas de manipulação gênica têm proporcionado alternativas, quer através da otimização do *B. thuringiensis* de per si, quer através da criação de organismos transgênicos.

A introdução da técnica de eletrotransformação de *B. thuringiensis* por diversos grupos (Bone & Ellar, 1989; Lereclus *et al.*, 1989; Mahillon *et al.*, 1989; Masson *et al.*, 1989), a transformação por transdução (Lecadet *et al.*, 1992), o desenvolvimento de vetores bifuncionais (*E. coli/B. thuringiensis*) estáveis (Baum *et al.*, 1990; Lereclus *et al.*, 1989) e recombinação homóloga *in vivo* (Lereclus *et al.*, 1992; Delécluse *et al.*, 1991) despontam como estratégias promissoras para a otimização do uso dessa bactéria como ACB. Esse grupo de técnicas, em conjunto com a engenharia de proteínas, permite que uma mesma cepa de *B. thuringiensis* expresse várias combinações de  $\delta$ -endotoxinas com atividade ampliada (por adição de uma nova atividade), ou ainda que haja sinergismo do efeito tóxico.

A composição de  $\delta$ -endotoxinas de uma determinada cepa pode ser ainda otimizada através da manipulação genética sem utilizar recombinação. A estratégia envolve a cura plasmidial, com o objetivo de eliminar genes com baixo envolvimento na atividade de interesse, e a conjugação, que vai permitir a introdução de plasmídeos portadores de genes com atividade desejada (Carlton *et al.*, 1990). Desde que a metodologia empregada não seja considerada rDNA, não há restrições por parte das agências que regulamentam produtos de origem biotecnológica. Existem vários biopesticidas desenvolvidos a partir desses princípios.

A expressão dos genes de  $\delta$ -endotoxinas tem sido analisada em outros organismos (revisto por Gelernter & Schwab, 1993). Esses sistemas são utilizados como alternativas mais apropriadas para a produção das proteínas Cry e sua veiculação.

*Clavibacter xyly* subsp. *cynodontis*, uma bactéria endofítica (colonizadora do sistema vascular de plantas), é usada para síntese e veiculação de toxinas empregadas no controle de pragas que se alimentam de tecidos internos de planta, como por exemplo a broca-do-milho. O produto foi registrado como *The InCide*<sup>®</sup> system (Crop Genetic International

Corporation) e é usado para inocular sementes, que vão dar origem a plantas contendo a bactéria recombinante produtora dessas toxinas. *Pseudomonas fluorescens* é utilizada como sistema de encapsulamento de diversas  $\delta$ -endotoxinas (CellCap™, Mycogen). Nessa formulação, a bactéria recombinante é inviabilizada durante a fase estacionária. O tratamento visa a estabilizar as toxinas, aumentando a persistência no meio-ambiente. Por tratar-se de um organismo recombinante, não vivo, não houve restrições para a liberação do produto e foi o primeiro biopesticida recombinante liberado comercialmente (Gelernter & Schwab, 1993).

Os biopesticidas derivados de *B. thuringiensis* apresentam baixa persistência na água, devido a uma rápida decantação, tornando os produtos imediatamente inacessíveis para as larvas de insetos, que se alimentam na interface ar/água. Além desse problema, as  $\delta$ -endotoxinas podem adsorver-se às partículas em suspensão, tornando-se inacessíveis como alimento, seja pelo grande tamanho ou por se tornarem pouco atrativas. Para contornar a questão, diversos grupos têm transferido genes das proteínas cristal para cianobactérias. Esse microrganismo, cujo habitat é a interface ar/água, permite uma eficiente opção para a produção e veiculação de toxinas utilizadas no controle de larvas de várias espécies de mosquito (Gerlenter & Schwab, 1993).

Plantas transgênicas expressando  $\delta$ -endotoxinas constituem efetivos sistemas de combate a insetos. Dentre as inúmeras vantagens na utilização desses recombinantes como ACB, destaca-se a capacidade de conferir proteção a tecidos usualmente inacessíveis, durante o controle com formulações convencionais de *B. thuringiensis*. A essa vantagem pode-se adicionar ainda a eficácia independente das condições climáticas, a limitada distribuição, a estabilidade das toxinas, a constante proteção por todo o período de cultivo e a restrição do controle aos insetos que se alimentam dessas plantas. No entanto, as plantas transformadas geneticamente podem contribuir para o desenvolvimento de resistência dos insetos, através da pressão de seleção. A alternância na utilização de formulações contendo toxinas derivadas de *B. thuringiensis* com outros pesticidas tradicionais, predadores naturais e outros ACB, é uma estratégia promissora para a prevenção do problema. Em 1996, foi liberada para uso comercial nos Estados Unidos a primeira planta transgênica. Após a licença do tomate transgênico, desenvolvido pela Monsanto, em agosto do mesmo ano, foi liberada a comercialização de um milho transgênico engenheirado pelas empresas Mycogen e Ciba Seeds (Fox & Hodgson, 1995).

## FUNGOS

### Estudos Genéticos de Fungos Usados em Controle Biológico

Fungos filamentosos vêm sendo aplicados na agricultura, no controle de pragas e doenças de plantas. Esses organismos foram os primeiros usados no controle biológico de insetos nocivos. Seu potencial de utilização no controle de pragas é conhecido desde o século XIX, quando *Metarhizium anisopliae* foi usado para controlar *Anisopliae austriaca* e *Cleonus punctiventris*. Desde então, muitas tentativas vêm sendo feitas no intuito de se incrementar o seu uso; no entanto, poucos são os produtos disponíveis no mercado. A utilização de fungos entomopatogênicos tem sido restrita, devido à limitação no conhecimento da complexa interação fungo/inseto. Os esporos são, em geral, unidade infectiva dos fungos, penetrando no inseto através do estômago, trato respiratório ou através da cutícula. O padrão mais usual de penetração é via cutícula, sendo esta uma das características que os tornam atraentes para o controle de insetos sugadores, para os quais os vírus e bactérias não apresentam eficiência. A penetração na cutícula de insetos é auxiliada por enzimas hidrolíticas. Estas últimas têm sido objeto de estudos, na tentativa de se obter uma correlação entre secreção de enzimas proteolíticas, quitinolíticas e lipolíticas com a patogenicidade. No entanto, a única evidência encontrada do envolvimento de enzimas proteolíticas na digestão de proteínas cuticulares foi obtida por Goettel *et al.* (1990), que utilizaram anticorpos marcados contra a protease PR1 purificada do fungo *M. anisopliae* em ensaios de infecção.

Diferente do que acontece com vírus e bactérias, o processo de infecção por fungos em insetos é muito mais complexo, sendo ainda desconhecidos os mecanismos envolvidos. Pouco se conhece da genética dos fungos entomopatogênicos, principalmente no que se refere à regulação e à expressão de genes nesses organismos.

Dentre os fungos entomopatogênicos, *Metarhizium* sp. tem sido o mais estudado. Ampla variabilidade genética é observada nos fungos desse gênero, embora mesmo os estudos relativos à taxonomia ainda não sejam muito específicos. Técnicas de RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) vêm sendo usadas com sucesso na caracterização de linhagens de *Metarhizium* sp. (Cobb & Clarkson, 1994; Fegan

*et al.*, 1993), *Beauveria* sp. (Bidochka *et al.*, 1994) e *Paecilomyces* sp. (Tigano-Milani *et al.*, 1995).

O melhoramento genético de linhagens baseia-se na criação de novos genótipos pelo uso de mutagênese e recombinação, a qual pode ser obtida via ciclo parassexual. Métodos de melhoramento envolvem a obtenção de mutantes, obtenção de híbridos, via heterocariose ou fusão de protoplastos e, ainda, a transferência de genes específicos. Graças a este último método, têm-se obtido dados relativos aos mecanismos de regulação e expressão de proteínas relacionadas ao processo de patogenicidade e à interação entre organismos controladores de doenças.

## Clonagem de Genes de Fungos

Diferentes métodos têm sido utilizados para clonagem de genes em fungos filamentosos. Dentre eles, destacam-se a clonagem por complementação, a hibridização diferencial com cDNA, expressão de cDNA e detecção de proteínas, oligonucleotídeos sintéticos baseados em seqüências de proteínas específicas e uso de sondas heterólogas (ver revisão de Turner, 1991; Green & Scazzochio, 1985). O uso de sondas heterólogas é provavelmente o método mais simples e, de acordo com Turner (1991), responsável pelo aumento da informação genética disponível em espécies fúngicas. Mais recentemente, com o advento das técnicas de PCR, o número de genes identificados em fungos filamentosos tem aumentado. Esse princípio permite rapidez no isolamento de seqüências homólogas, utilizando *primers* que anelam com os genes de interesse.

**Genes clonados de fungos entomopatogênicos.** A identificação e a clonagem de genes têm sido importantes em estudos do processo patogênico. O gene, que codifica para uma proteína estrutural PR1, foi clonado em *M. anisopliae* e vem sendo utilizado em estudos de regulação e expressão, bem como na tentativa de elucidar o efeito dessa proteína na digestão da cutícula de insetos (St. Leger *et al.*, 1992a). Outro gene, caracterizado nesse fungo, está relacionado ao processo de estresse pela depleção de nutrientes e que codifica uma proteína tipo hidrofobina (St. Leger *et al.*, 1992b). Genes ligados à produção de outras enzimas degradativas têm sido estudados e, mais recentemente, um gene codificando para produção de quitinase foi isolado e parcialmente seqüenciado (Valadares, 1995). A análise computacional da re-

gião seqüenciada mostrou intensa homologia deste último, encontrado em *Metarhizium* e outros genes do mesmo tipo, porém, localizados em outros fungos filamentosos.

Outro fator ligado à virulência de linhagens a insetos é a produção de metabólitos tóxicos, que parecem ser produzidos durante o estágio de colonização dos insetos pelo fungo. Estudos moleculares têm sido conduzidos, na tentativa de se isolar genes envolvidos com a biossíntese de destruxinas em *M. anisopliae* (Clarkson, comunicação pessoal).

Outros genes vêm sendo estudados em fungos entomopatogênicos, com o objetivo de se obter marcadores de linhagens com potencial comercial. Em *Beauveria bassiana*, cinco genes mitocondriais foram clonados e seqüenciados, demonstrando a presença de GGC, diferentes das seqüências GGU comumente encontradas na alça D do tRNA (Hegedus *et al.*, 1991).

**Clonagem de genes de fungos agentes de controle de doenças.** Os fungos, agentes de controle de doenças de plantas, também sintetizam enzimas hidrolíticas, que estão sendo objeto de estudos devido à sua importância na interação com os agentes patogênicos, seja na digestão da parede celular dos fungos ou na indução de mecanismos de resistência nas plantas infectadas.

Dentre os fungos agentes de controle de doenças de plantas, os pertencentes ao gênero *Trichoderma* têm sido os mais estudados a nível genético. Técnicas moleculares vêm sendo usadas, tendo sido clonados cerca de 42 genes de *Trichoderma* sp. (Tabela 2). Dentre os genes isolados estão aqueles que codificam para a produção de enzimas hidrolíticas, relacionadas à digestão da parede celular de organismos hospedeiros, como por exemplo aqueles relacionados à família das celulases e quitinases. Outros genes de importância, como aqueles que codificam as proteínas gliceraldeído fosfato desidrogenase (Watanabe *et al.*, 1993), orotato fosforibosil transferase (OPRTase) e oritidina fosfato descarboxilase (OMPdecase) (Berges *et al.*, 1990) e  $\beta$ -tubulina (Goldman *et al.*, 1993), foram isolados, visando ao uso em sistemas de transformação homóloga.

## Transferência de Genes em Fungos

De acordo com Rambosek & Leach (1987), a tecnologia do DNA recombinante oferece um grande potencial, que possibilita alterações

TABELA 2. Genes isolados e clonados em diferentes espécies do fungo filamentosso, *Trichoderma*, importante agente do controle biológico de doenças de plantas.

Gene	Espécie	Referência
endoglucanase	<i>T. reesei</i>	Penttilae <i>et al.</i> , 1986
celobiohidrolase II	<i>T. reesei</i>	Chen <i>et al.</i> , 1987
celobiohidrolase II	<i>T. reesei</i>	Teeri <i>et al.</i> , 1987
endoglucanase III	<i>T. reesei</i>	Saloheimo <i>et al.</i> , 1988
orotate phosphoribosyl transferase	<i>T. reesei</i>	Berges <i>et al.</i> , 1990
orotidine-5'-phosphate decarboxylase	<i>T. reesei</i>	Berges <i>et al.</i> , 1990
1,4-beta-D-celobiohidrolase	<i>T. viride</i>	Cheng <i>et al.</i> , 1990
<i>pyrG</i>	<i>T. reesei</i>	Gruber <i>et al.</i> , 1990
1,4-beta-celobiosidase	<i>T. viride</i>	Udaka, 1990
beta-glucosidase	<i>T. reesei</i>	Barnett <i>et al.</i> , 1991
3-phosphoglycerate kinase	<i>T. reesei</i>	Vanhanen <i>et al.</i> , 1991
endo-beta-1,4-xylanase II	<i>T. reesei</i>	Torronen <i>et al.</i> , 1992
protease alcalina	<i>T. harzianum</i>	Geremia <i>et al.</i> , 1993
beta-tubulina	<i>T. viride</i>	Goldman <i>et al.</i> , 1993
mRNA (L32)	<i>T. harzianum</i>	Lora <i>et al.</i> , 1993
beta-D-glucosidase glucohidrolase	<i>T. reesei</i>	Mach, 1993*
fator de alongação de tradução	<i>T. reesei</i>	Nakan <i>et al.</i> , 1993
5.8S ribosomal RNA	<i>T. longibrachiatum</i>	Ruiz-Sala <i>et al.</i> , 1993
piruvato kinase	<i>T. reesei</i>	Schindler <i>et al.</i> , 1993
beta-mananase	<i>T. reesei</i>	Stalbrand <i>et al.</i> , 1993
cellobiohidrolase II (promotor)	<i>T. reesei</i>	Stangl <i>et al.</i> , 1993
endoxilanase II	<i>T. reesei</i>	Saarelainen <i>et al.</i> , 1993
glyceraldehidophosphate dehidrogenase	<i>T. koningii</i>	Watanabe <i>et al.</i> , 1993
endoquitinase	<i>T. harzianum</i>	Carsolio <i>et al.</i> , 1994
endoquitinase	<i>T. harzianum</i>	Garcia <i>et al.</i> , 1994
cob4	<i>T. harzianum</i>	Goldman <i>et al.</i> , 1994
endoquitinase	<i>T. harzianum</i>	Hayes <i>et al.</i> , 1994
mRNA (QID3)	<i>T. harzianum</i>	Lora <i>et al.</i> , 1994
TS 1	<i>T. harzianum</i>	Muthumeekshi <i>et al.</i> , 1994
rRNA	<i>T. virens</i>	Rehner & Samuels, 1994
ITS 1 e ITS2	<i>T. harzianum</i>	Schlick <i>et al.</i> , 1994
proteina mRNA	<i>T. harzianum</i>	Harman & Hayes, 1995*
beta-xylanase (mRNA)	<i>T. reesei</i>	La Grange <i>et al.</i> , 1995*
proteina repressora - Cre1	<i>T. reesei</i>	Mach <i>et al.</i> , 1995*
actina	<i>T. reesei</i>	Matheucci <i>et al.</i> , 1995
INDA 1	<i>T. harzianum</i>	Vasseur <i>et al.</i> , 1995
endo-1,4-beta-glucanase	<i>T. longibrachiatum</i>	Perez-Gonzalez (não publicado)*
TS 1	<i>T. longibrachiatum</i>	Kuls (não publicado)*

definidas em um organismo. O isolamento de seqüências específicas de DNA de um organismo deve estar associado a um sistema de transferência, no qual genes isolados possam ser introduzidos em outro organismo para análise funcional de genes, bem como dos produtos gênicos envolvidos (Hynes, 1986). Assim, proteínas heterólogas e homólogas podem ser expressas em fungos filamentosos por transformação de linhagens receptoras com genes clonados em vetores de expressão, os quais permitem uma fácil seleção de novos genótipos.

Sistemas de transformação compreendem a existência de vetores, contendo marcas de seleção e mecanismos de introdução dos vetores nos hospedeiros. Vetores usados na transformação de fungos filamentosos são, em geral, DNA plasmidial de *E. coli*, nos quais são incorporadas marcas seletivas apropriadas para fungos. Grande atenção tem sido dada a vetores, que permitem integração do gene a nível cromossomal, embora muitos esforços se façam no sentido de se construir vetores para replicação autônoma. Plasmídeos, contendo seqüências de replicação autônoma (ARS), seqüências finais de cromossomos ou terminal de plasmídeos lineares, têm sido usados (Tsukuda *et al.*, 1988; Samac & Leong, 1989). Recentemente, Gems *et al.* (1991) descreveram um plasmídeo de replicação autônoma (*helper plasmid*), contendo uma seqüência invertida e repetida (*AMA1*), que aumenta a eficiência de transformação em *A. nidulans*. A eficiência de transformação está também relacionada ao destino do DNA transformante, sendo os mecanismos de integração extensivamente estudados (Fincham, 1989). A introdução de DNA transformante pode ser conduzida por diferentes métodos e agentes, como polietilenoglicol (PEG), lipossomos, acetato de lítio, eletroporação e bombardeamento das células com microprojéteis contendo o DNA. A seleção de fungos transformados é feita por dois métodos principais: marcas dominantes e marcas auxotróficas. A eficiência de transformação varia de organismo para organismo, dependendo também dos métodos utilizados para introdução dos genes, da homologia deste com o genoma do receptor, bem como do método de seleção de transformantes.

**Transformação em fungos entomopatogênicos.** *Metarhizium* e *Beauveria* têm sido os únicos estudados no que se refere a sistemas de transformação, e poucos são os trabalhos conduzidos com esses fungos até o momento. Utilizando-se de genes codificando para resistência a benomil (Benlate), foram estudados sistemas de transforma-

ção heteróloga em *M. anisopliae*. Goettel *et al.* (1990), usando o plasmídeo pBENA3, contendo o gene *benA3* de *A. nidulans*, obtiveram uma frequência de 0,18 transformantes por  $\mu\text{g}$  DNA, apresentando estabilidade em meio seletivo, não-seletivo e em tecidos de insetos. Dois dos transformantes analisados apresentaram patogenicidade a *Manduca sexta* e estruturas de diferenciação (apressório) e produção da enzima (quimioelastase), em presença de benomil. Resultados similares foram obtidos por Bernier *et al.* (1989), utilizando o gene de  $\beta$ -tubulina de *Neurospora crassa* para transformar *M. anisopliae*. Também foram observadas baixas frequências de transformantes (0,08 transformantes por  $\mu\text{g}$  DNA); entretanto, os transformantes, nesse caso, apresentavam redução de virulência, comparado ao parental, bem como redução no crescimento e germinação de esporos.

Mais recentemente St. Leger *et al.* (1995) utilizaram cotransformação para introdução do gene que codifica para a produção de  $\beta$ -glucuronidase em *M. anisopliae*. Cotransformantes foram obtidos pela introdução dos plasmídeos pNOM102 e pBENA3, contendo, respectivamente, os genes de  $\beta$ -glucuronidase e  $\beta$ -tubulina, por eletroporação e por biobalística. Esses métodos demonstraram maior eficiência que os previamente descritos, que usam  $\text{Ca}^{2+}$ /PEG. Cotransformantes estáveis apresentavam integração múltipla de cópias, com crescimento e capacidade infectiva a *Bombyx mori* normais.

Experimentos de transformação também vêm sendo conduzidos com o fungo entomopatogênico *B. bassiana*. Gene que codifica para nitrato redutase (*niaD*), isolado de *A. nidulans*, foi utilizado para transformar *B. bassiana*, tendo sido obtida uma frequência de 4 transformantes estáveis por  $\mu\text{g}$  de DNA (Daboussi *et al.*, 1989). Utilizando-se eletroporação, Pfeifer & Khachatourians (1992) transformaram *Beauveria* com o gene heterólogo,  $\beta$ -tubulina, isolado de *N. crassa*. Apesar da obtenção de transformantes estáveis, pela integração cromossomal do vetor, a frequência obtida foi bastante baixa (0,6 transformantes por  $\mu\text{g}$  DNA).

Os sistemas de transformação usados para fungos entomopatogênicos ainda não podem ser considerados eficientes, principalmente devido à baixa frequência obtida nos sistemas heterólogos. Apesar da importância destes fungos para a agropecuária, poucos são os estudos relacionados à caracterização de genes e ainda não foram isolados marcadores, para seleção, como a exemplo de genes codificando para nitrato redutase,  $\beta$ -tubulina e pirimidina, dentre outros.

**Transformação em fungos, agentes de controle de doenças de plantas.** Dentre os fungos agentes de controle de doenças de plantas, os pertencentes ao gênero *Trichoderma* vêm sendo os mais estudados quanto aos mecanismos de transferência e expressão de genes homólogos e heterólogos. Genes isolados de outros fungos filamentosos e mesmo de bactérias, codificando proteínas relacionadas à atividade biológica do parasitismo, são transferidos, com vista a aumentar a expressão destes em fungos.

*Trichoderma reesei* vem sendo transformado por genes homólogos e heterólogos. O plasmídeo p3SR2, contendo o gene de *amdS*, que permite o crescimento do fungo em presença de acetamida ou acrilamida, foi usado por Pentilla *et al.* (1987) para transformar a espécie. Berges *et al.* (1991) utilizaram os genes *ura3* e *ura5*, codificando, respectivamente, para orotidina 5'-fostato decarboxilase e orotato fosforibosil transferase para transformar *T. reesei*, via  $\text{CaCl}_2/\text{PEG}$ , obtendo altas freqüências de transformantes com os genes homólogos. Resultados similares foram obtidos por Gruber *et al.* (1990a,b) com alta freqüência de transformação em *T. reesei*, 12000 transformantes por  $\mu\text{g}$  DNA. Mediante utilização do gene homólogo, *pyrG*, observou-se integração ectópica do gene homólogo como responsável pela estabilidade genética dos transformantes. *T. harzianum* passou a ser estudado recentemente, e vários sistemas têm sido usados para transformar essa espécie. Ulhoa *et al.* (1992) desenvolveram um sistema de transformação para *T. harzianum* e *T. hamatum*, utilizando marcas dominantes seletivas para resistência a higromicina B-fosfoferase e benomil. Os genes *hph* de *E. coli* e *bml* de *Neurospora crassa* foram introduzidos nas linhagens via PEG, tendo sido observadas baixas freqüências de transformação (6 a 11 para benomyl e 1.3 a 61-7  $\mu\text{g}$  DNA).

Visando ao aumento da atividade lítica em *T. harzianum*, gene codificando para produção de quitinase *chiA*, isolado de *Serratia marcescens*, foi usado para transformação (Chet *et al.*, 1993). Transformação com um único plasmídeo, contendo o gene *chiA* de *Serratia* e o gene para seleção *amdS*, demonstrou que a integração ocorre em regiões não-específicas, não tendo sido obtida a expressão do gene de quitinase. Em experimentos de cotransformação, utilizando os diferentes plasmídeos contendo os genes mencionados acima, observou-se integração do gene *chiA* provavelmente por recombinação homóloga,

tendo sido também constatado o aumento da secreção de quitinase nos transformantes.

Outras espécies de *Trichoderma* vêm sendo utilizadas em estudos de transformação. Em *T. longibrachiatum*, um eficiente sistema de transformação foi recentemente desenvolvido, utilizando-se dos métodos de eletroporação e tratamento com PEG, tendo sido observada alta instabilidade mitótica dos transformantes, selecionados para resistência à higromicina B fosfotransferase (Sanchez-Torres *et al.*, 1994). Os mesmos autores obtiveram cotransformantes, contendo múltiplas cópias do gene codificando para  $\beta$ -(1,4)-endoglucanase e *lacZ*, de *E. coli*, sob o controle do promotor do gene *gpdA* de *A. nidulans*. A cotransformação também foi usada em *T. viride*, para estudos de expressão do gene de *takaamylaseA* isolado de *N. crassa* (Cheng *et al.*, 1990).

Novos métodos de transformação têm sido estudados. Recentemente, Lorito *et al.* (1993), usando biobalística e PEG, transformaram *T. harzianum* e *Gliocladium virens* com o gene que confere resistência à higromicina B. Observaram maior frequência e estabilidade genética com o método de biobalística.

O desenvolvimento de linhagens mais eficientes para o controle de pragas e doenças de plantas requer a compreensão dos mecanismos pelos quais produtos de genes específicos estão envolvidos no processo de interação entre organismos. Para tanto são necessários isolamento, clonagem e uso desses genes em eficientes sistemas de expressão. A elucidação dos fatores de patogenicidade poderá ser alcançada com estudos genéticos, envolvendo técnicas moleculares no mesmo nível desenvolvido para vírus e bactérias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, L.F.; BROWN, K.L.; WHITELEY, H.R. Molecular cloning and characterization of two genes encoding sigma factors that direct transcription from a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene promoter. *Journal of Bacteriology*, v.173, 3846-3854, 1991.
- AGAISSE, H.; LERECLUS, D. Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the *cryIIIA* toxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*, v.13, p.97-107, 1994a.
- AGAISSE, H.; LERECLUS, D. Expression in *B. subtilis* of the *Bacillus thuringiensis cryIIIA* toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in *spoA* mutant. *Journal of Bacteriology*, v.176, p.4734-4741, 1994b.
- AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produces so much insecticidal crystal protein. *Journal of Bacteriology*, v.177, p.6027-6032, 1995.
- ARIF, B.M. The structure of the viral genome. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v.31, p.21-29, 1986.
- BAUN, J.A.; COYLE, D.M.; GILBERT, M.P.; JANY, C.S.; GAWRON-BURKE, C. Novel cloning vectors of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, p.3420-3428, 1990.
- BECHTEL, D.B.; BULLA, L.A. Electron microscopic study of the sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, v.127, p.1472-1481, 1976.

- BERGES, T.; BARREAU, C. Isolation of uridine auxotrophs from *Trichoderma reesei* and efficient transformation with the cloned *ura3* and *ura5* genes. **Current Genetics**, v.19, p.359-365, 1991.
- BERGES, T.; PERROT, M.; BARREAU, C. Nucleotide sequences of the *Trichoderma reesei ura3* (OMPdcase) and *ura5* (OPRTase) genes. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.23, p.7183, 1990.
- BERLINER, E. Über die Schläffsucht der Mehlmotterraupe. **Zeitschrift für Gesamte Getreidewesen**, Berlin, v.3, p.63-70, 1911.
- BERNIER, L., COOPER, R.M., CHARNLEY, K.; CLARKSON, J.M. Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to benomyl resistance. **FEMS Microbiology Letters**, v.60, p.261-266, 1989.
- BIDOCHKA, M.J.; MACDONALD, 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**, v.25, p.107-113, 1994.
- BISHOP, D.H.L.; ENTWISTLE, P.F.; CAMERON, I.R.; ALLEN, C.J.; POSSEE, R.D. Field trials of genetically-engineered baculovirus insecticides. In: Release of Genetically-Engineered Micro-Organisms, New York: Academic Press, p.1988.
- BLISSARD, G.W.; ROHRMANN, G.F. Baculovirus diversity and molecular biology. **Annual Review of Entomology**, v.35, p.127-155, 1990.
- BONE, E.J.; ELLAR, D.J. Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. **FEMS Microbiology Letters**, v.58, p.171-178, 1989.
- BROWN, K.L.; WHITELEY, H.R. Isolation of the second *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase that transcribes from a crystal protein gene promoter. **Journal of Bacteriology**, v.172, p.6682-6688, 1990.
- BROWN, K.L.; WHITELEY, H.R. Isolation of a *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase capable of transcribing crystal protein genes. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.85, p.4166-4170, 1988.
- CARLTON, B.C.; GAWRON-BURKE, C.; JOHNSON, T.B. Exploiting the genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* for the creation of new insecticides. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 5., 1990, Adelaide. Proceedings. Adelaide, 1990. p.18-22.
- CAROZZI, N.B.; KRAMER W.G.; EVOLA, S.; KOZIEL, M.G. Prediction of the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.11, p.3057-3061, 1991.
- CHARLES, J.F.; DE BARJAC, H. Action des cristaux de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur l'intestin moyen des larves de *Aedes aegypti* L., en microscopie électronique. **Annual Microbiology** (Inst. Pasteur), v.134A, p.197-218, 1983.
- CHEN, C.M.; GRITZALI, M.; STAGGORD, D.W. Nucleotide sequence and deduced primary structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. **Biotechnology**, v.5, p.274-278, 1987.
- CHENG, C.; TSUKAGOSHI, N.; UDAKA, S. Nucleotide sequence of the cellobiohydrolase gene from *Trichoderma viride*. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.18, p.5559, 1990a.
- CHENG, C.; TSUKAGOSHI, N.; UDAKA, S. Transformation of *Trichoderma viride* using the *Neurospora crassa pyr4* gene and its use in the expression of a Taka-amylase A gene from *Aspergillus oryzae*. **Current Genetics**, v.18, p.453-456, 1990b.
- CHET, I.; BARAK, Z.; OPPENHEIM, A. Genetic engineering of microorganisms for improved biocontrol activity. **Biotechnology in Plant Disease Control**, p.211-235, 1993.
- CHISHOLM, G.E.; HENNER, D.J. Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene. **Journal of Virology**, v.62, p.3193-3200, 1988.
- COBB, B.; CLARKSON, J.M. Detection of molecular variation in the insect pathogenic fungus *Metarhizium* using RAPD-PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v.112, p.319-324, 1994.
- DABOUSSI, M.J.; DJEBALLI, A.; GERLINGER, C.; BLAISEAU, P.L.; BOUVIER, I.; CASSAN, M.; LEBRUN, M.H.; PARISOT, D.; BRYGOO, Y. Transformation of seven species of filamentous fungi using the nitrate reductase gene of *Aspergillus nidulans*. **Current Genetics**, v.15, p.453-456, 1989.
- DE BARJAC, H.; BONNEFOI, A. Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*. **Entomophaga**, v.7, n.1, p.5-31, 1962.
- DELÉCLUSE, A.; CHARLES, J.F.; KLIJER, A.; RAPOPORT, G. Deletions by in vivo recombination shows that the 28 kDa cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is not essential for the mosquitoicidal activity. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.3374-3381, 1991.
- DE-SOUZA, M.T.; AGAISSE, H.; LERECLUS, D. High-level transcription of the *cryIIIA* toxin gene of *Bacillus thuringiensis* depends on a second promoter located 600 bp Upstream of the Translational Start Site. **Revista Brasileira de Genética**, 1996, in press.
- DE-SOUZA, M.T.; LECADET, M.M.; LERECLUS, D. Full expression of the *cryIIIA* toxin gene of *Bacillus thuringiensis* requires a distant upstream DNA sequence affecting transcription. **Journal of Bacteriology**, v.175, p.2952-2960, 1993.
- DONOVAN, W.P.; RUPAR, M.J.C.; SLANEY, A.C.; GAWRON-BURKE, M.C.; JOHNSON, T.B. Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to coleopteran species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.3921-3927, 1992.
- ENGELHARD, E.K.; KAM-MORGAN, L.N.W.; WASHBURN, J.O.; 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.
- ENTWISTLE, P.F.; EVANS, H.F. Viral control. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I., ed. **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology** Oxford: Oxford University Press, 1985. p.347-412. (Insect Control, 12).

- FEGAN, M.; MANNERS, J.M.; MACLEAN, D.J.; IRWIN, J.A.G.; SAMUELS, K.D.Z.; HOLDOM, D.; LI, D.P. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of General Microbiology*, v.139, p.2075-2081, 1993.
- FINCHAM, J.R.S. Transformation in fungi. *Microbiological Reviews*, v.53, p.148-170, 1989.
- FOX, J.L.; HODGSON, J. EPA okays Bt corn; USDA eases plant testing. *Bio/technology*, v.13, p.1035-1036, 1995.
- FRIESEN, P.D.; MILLER, L.K. The regulation of baculovirus gene expression. *Current Topics on Microbiology and Immunology*, v.131, p.31-49, 1986.
- GARCIA, I.; LORA, J.M.; DE LA CRUZ, J.; BENITEZ, T.; LLOBELL, A.; PINTOR-TORO, J.A. Cloning and characterization of a chitinase (*chit42*) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics*, v.27, n.1, p.83-89, 1994.
- GELERTNER, W.; SCHWAB, G.E. Transgenic bacteria, viruses, algae and other microorganismos as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems. In: ENWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S., ed. *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*. West Sussex: John Wiley, 1993. p.89-104.
- GEMS, D.; JOHNSTONE, I.L.; CLUTTERBUCK, A.J. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene*, v.98, p.61-67, 1991.
- GEREMIA, R.A.; GOLDMAN, G.H.; JACOBS, D.; VILA, S.B.; ARDILES, W.; VAN MONTAGU, M.M.; HERRERA-ESTRELA, A. Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Molecular Microbiology* v.8, p.603-613, 1993.
- GLATRON, M.F.; RAPOPORT, G. Biosynthesis of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*: half-life of its corresponding messenger RNA. *Critical Review in Academic Science*, Paris, v.269, p.1338-1341, 1972.
- GOETTEL, M.S.; ST. LEGER, R.J.; BHAIRI, S.; JUNG, M.K.; OAKLEY, B.R.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stably transformed to benomyl resistance. *Current Genetics*, v.17, p.129-132, 1990.
- GOLDMAN, G.H.; TEMMERMAN, W.; JACOBS, D.; CONTRERAS, R.; VAN MONTAGU, M.; HERRERA-ESTRELA, A. A nucleotide substitution in one of the beta-tubulin genes of *Trichoderma viride* confers resistance to the antimitotic drug methyl benzimidazole-2-yl-carbamate. *Molecular and General Genetics*, n.240, v.1, p.73-80, 1993.
- GOLDMAN, G.H.; VASSEUR, V.; CONTRERAS, R.; VAN MONTAGU, M. Sequence analysis and expression studies of a gene encoding a novel serine + alanine-rich protein in *Trichoderma harzianum*. *Gene*, v.144, n.1, p.113-117, 1994.
- GONZÁLEZ JR., J.M.; BROWN, B.J.; CARLTON, B.C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v.179, p.6951-6955, 1982.
- GONZÁLEZ JR., J.M.; DULMAGE, H.T.; CARLTON, B.C. Correlation between specific plasmids and  $\delta$ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*, v.5, p.351-365, 1981.
- GRANADOS, R.R. Infectivity and mode of action of baculoviruses. *Biotechnology and Bioengineering*, v.22, p.1377-1405, 1988.
- GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. *The biology of baculoviruses*. Boca Raton: CRC Press, 1986.
- GREEN, P.M.; SCAZZOCHIO, C. A cloning strategy in filamentous fungi. In: BENNETT, J.W.; LASURE, L., ed. *Gene Manipulation in Fungi*. London: Academic Press, 1985. p.345-353.
- GRUBER, F.; VISSER, J.; KUBICEK, C.P.; DE GRAAF, L.H. The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a *pyrG*-negative mutant strain. *Current Genetics*, v.18, p.71-76, 1990a.
- GRUBER, F.; VISSER, J.; KUBICEK, C.P.; DE GRAAF, L.H. Cloning of the *Trichoderma reesei pyrG* gene and its use as a homologous marker for a high-frequency transformation system. *Current Genetics*, v.18, p.447-451, 1990b.
- GUARINO, L.A.; SUMMERS, M.D. Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *Journal of Virology*, v.57, p.563-571, 1986.
- HALDENWANG, W.G. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiology Reviews*, v.59, n.1, p.1-30, 1995.
- 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-encoding gene from a cDNA library of *Trichoderma harzianum*. *Gene*, v.138, n.1-2, p.143-148, 1994.
- HAWTIN, R.E.; POSSEE, R.D. Genetic manipulation of the baculovirus genome for insect pest control. In: *Parasites and pathogens of insects*. New York: Academic Press, 1993. v. 2.
- HEGEDUS, D.D.; PFEIFER, T.A.; MACPHERSON, J.M.; KHACHATOURIANS, G.G. Cloning and analysis of five mitochondrial rRNA-encoding genes from the fungus *Beauveria bassiana*. *Gene*, v.109, p.149-154, 1991.
- HENDRICKX, K.; DELOOF, A.; VAN MELLAERT, H. Effects of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin on the permeability of brush border membrane vesicles from tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut. *Comprehensive Biochemistry and Physiology*, v.95C, p.241-245, 1990.
- HÖFTE, H.; WHITLEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, v.2, p.242-255, 1989.
- HYNES, M.J. Transformation of filamentous fungi. *Experimental Mycology*, v.10, p.1-8, 1986.
- ISHIWATA, S. On a kind of severe flacherie (sotto disease). *Danihon Sanshi Kaiho*, v.114, p.1-5, 1901.
- JUTSUM, A.R. Commercial application of biological control: status and prospects. In: WOOD, R.K.S.; WAY, M.J. ed. *Biological control of pests, pathogens and weeds: development and prospects*. London: The Royal Society, London, 1988. p.247-263.

- KALMAN, S.; KIEHNE, K.L.; LIBS, J.L.; YAMAMOTO, T. Cloning of a novel *cryI/C*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.4, p.1131-1137, 1993.
- KELLY, D.C.; LESCOTT, T. Baculovirus replication: protein synthesis in *Spodoptera frugiperda* cells infected with *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus. **Microbiologica**, v.4, p.35-47, 1981.
- KNOWLES, B.H.; DOW, J.T. The crystal  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. **BioEssays**, v.15, n.7, p.469-476, 1993.
- KNUDSON, D.; HARRAP, K. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell culture of *Spodoptera frugiperda*: microscopy study of the sequence of events of the virus infection. **Journal of Virology**, v.17, p.254-268, 1976.
- LECADET, M.M.; CHAUFAX, J.; RIBIER, J.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activity by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.840-849, 1992.
- LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M.M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S. ed. ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. West Sussex: John Wiley, 1993. p.37-69.
- LERECLUS, D.; AGAISSE, H.; GOUMINET, M.; CHAUFAX, J. Overproduction of encapsulated insecticidal proteins cristal in a *Bacillus thuringiensis* *spaA* mutant. **Bio/Technology**, v.13, p.67-71, 1995.
- LERECLUS, D.; VALLADE, M.; CHAUFAX, J.; ARANTES, O.; RAMBAUD, S. Expansion of the insecticidal host range of *Bacillus thuringiensis* by *in vivo* genetic recombination. **Bio/Technology**, v.10, p.418-421, 1992.
- LERECLUS, D.; ARANTES, O.; CHAUFAX, J.; LECADET, M.M. Transformation and expression of a cloned  $\delta$ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.60, p.211-218, 1989.
- LI, J.; ELLAR, D. Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, v.353, p.815-821, 1991.
- LORA, J.M.; DE LA CRUZ, J.; BENITEZ, T.; LLOBELL, A.; PINTOR-LORO, J.A. A putative catabolite-repressed cell wall protein from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. **Molecular and General Genetics**, v.242, n.4, p.461-466, 1994.
- LORA, J.M.; GARCIA, I.; BENITEZ, T.; LLOBELL, A.; PINTOR-TORO, J.A. Primary structure of *Trichoderma harzianum* ribosomal protein L32. **Nucleic Acids Research**, v.21, n.14, p.3319, 1993.
- LORITO, M.; HAYES, C.K.; PIETRO, A.D.I.; HARMAN, G.E.; DI-PIETRO, A. Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Glucocladium virens* using plasmid and genomic DNA. **Current Genetics**, v.24, n.4, p.349-356, 1993.
- LOSICK, R.; YOUNGMAN, P.; PIGGOT, P.J. Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*. **Annual Review of Genetics**, v.20, p.625-659, 1986.
- LUCKOW, V.A.; SUMMERS, M.D. Trends in the development of baculovirus expression vectors. **Biotechnology**, v.6, p.47-55, 1988.
- MAEDA, S. Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. **Annual Review of Entomology**, v.34, p.351-372, 1989.
- MAHILLON, J.; REZSÖHAZY, R.; HALLET, B.; DELCOUR, J. IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: a review. **Genetica**, v.93, p.13-26, 1994.
- MAHILLON, J.; CHUNGJATUPORNCHAI, W.; DECOCK, J.; DIERICKX, S.; MICHIELS, F.; PEFFEROEN, M.; JOOS, H. Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. **FEMS Microbiology Letters**, v.60, p.205-210, 1989.
- MARCH, R.L. Klonierung und charakterisierung einiger gene des kohlenstoffmetabolismus von *Trichoderma reesei*. s.l.: Inst. Biochem. Technol., 1993. Thesis.
- MARUNIAK, J.E.; SUMMERS, M.D. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus phosphoproteins and synthesis of intracellular proteins after virus infection. **Virology**, v.109, p.25-34, 1981.
- MASSON, L.; PRÉFONTAINE, G.; BROUSSEAU, R. Transformation of *Bacillus thuringiensis* vegetative cells by electroporation. **FEMS Microbiology Letters**, v.60, p.273-278, 1989.
- MATHEUCCI JR., E.; HENRIQUE-SILVA, F.; EL-GOGARY, S.; ROSSINI, C.H.; LEITE, A.; VERA, J.E.; URISTE, J.C.; CRIVELLARO, O.; EL-DORRY, H. Structure, organization and promoter expression of actin-encoding gene in *Trichoderma reesei*. **Gene**, v.161, n.1, p.103-106, 1995.
- MATHUMEENAKSHI, S.; MILLS, P.R.; BROWN, A.E.; SEABY, D.A. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in British Isles. **Microbiology**, v.140, p.769-777, 1994.
- MILLER, L.K. Baculovirus as gene expression vectors. **Annual Review of Microbiology**, v.42, p.177-199, 1988.
- MORAN JR., C.P. RNA polymerase and transcriptional factors. In: SONENSHEIN, A.L.; HOCH, J.A.; LOSICK, R. ed. ***Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics**. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p.653-667.
- MOSCARDI, F. Utilização de vírus para o controle da lagarta da soja. In: ALVES, S.B., ed. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Manole, 1986. p.188-202.
- MURPHY, F.A.; FAUKQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. eds. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In: **Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. New York: Springer-Verlag, 1995. p.104-113.
- NISSEN, M.S.; FRIESEN, P.D. Molecular analysis of the transcriptional regulatory region of an early baculovirus gene. **Journal of Virology**, v.63, p.493-503, 1989.
- OOI, B.G.; RANKIN, C.; MILLER, L.K. Downstream sequences augment transcription from essential initiation site of a baculovirus polyhedrin gene. **Journal of Molecular Biology**, v.210, p.721-736, 1989.
- O'REILLY, D.R.; MILLER, L.K.; LUCKOW, V.A. **Baculovirus expression vectors - a laboratory manual**. New York: W.H. Freeman, 1992.

- PENTILLAE, 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** v.45, p.253-263, 1986.
- PENTILLA, M.; NEVALAINEN, H.; RAITO, M.; SALMINEN, E.; KOWELS, J. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Genetics**, v.61, p.155-164, 1987.
- PFEIFER, T.O.; KHACHATOURIANS, G.G. *Beauveria bassiana* protoplast regeneration and transformation using electroporation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.38, p.376-381, 1992.
- RAMBOSEK, J.; LEACH, J. Recombinant DNA in filamentous fungi: Progress and Prospects. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, v.6, p.357-393, 1987.
- RHENER, S.A.; SAMUELS, G.J. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analyzed by nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. **Mycological Research**, v.98, p.625-643, 1994.
- RIBIER, J.; LECADET, M.M. Etude ultrastructurale et cinétique de la sporulation de *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* 1715. Remarques sur la formation de l'inclusion parasporale. **Annual Microbiology**, v.124A, p.311-344, 1973.
- ROHRMANN, G.F. Polyhedrin structure. **Journal of General Virology**, v.67, p.1499-1513, 1986.
- RUIZ-SALA, P.; PEREZ-GONSALES, J.A.; RAMON-VIDAL, D. Nucleotide sequence of a *Trichoderma longibrachiatum* DNA fragment encoding the 5.8S rRNA gene. **Nucleic Acids Research**, v.21, p.741-741, 1993.
- SAARELAINEN, R.; PALOHEIMO, M.; FAGERTROM, R.; SUOMINEN, P.L.; NEVALAINEN, K.M. Cloning, sequencing and enhanced expression of the *Trichoderma reesei* endoxylanase II (p19) gene *xln2*. **Molecular and General Genetics**, v.241, n.5-6, p.497-503, 1993.
- SACCHI, V.F.; PARENTI, P.; HANOZET, G.M.; GIORDANA, B.; LÜTHY, P.; WOLFERSBERGER, M. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K<sup>+</sup>-gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pteris brassicae* midgut cells. **FEBS Letters**, v.204, p.213-218, 1986.
- SALOHEIMO, A.; HENRISSAT, B.; HOFFRE, A.M.; TELEMAN, O.; PENTILLA, M. A novel, small endoglucanase gene, *egl5*, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast. **Molecular Microbiology**, v.13, n.2, p.219-228, 1994.
- SALOHEIMO, M.; LEHTOVAARA, P.; PENTILLAE, M.; TEERI, T.T.; SATHLBERG, J.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G.; CLAEYSSENS, M.; TOMME, P.; KNOWLES, J.K.C. EGIII, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: The characterization of both gene and enzyme. **Gene** v.63, p.11-22, 1988.
- SAMAC, D.A.; LEONG, S.A. Characterization of the termini of linear plasmids from *Nectria haemotococcus* and their use in construction of an autonomously replicating transformation vector. **Current Genetics**, v.16, p.187-194, 1989.
- SANCHEZ-TORRES, P.; GONZALEZ, R.; PEREZ-GONZALEZ, J.A.; GONZALES-CANDELAS, L.; RAMON, D. Development of transformation system for *Trichoderma longibrachiatum* and its use for construction multicopy for the *egl1* gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.41, n.4, p.440-446, 1994.
- SCHINDLER, M.; MACH, R.L.; VOLLENHOFER, S.F.; HODITS, R.; GRUBER, F.; VISSER, J.; DE GRAAFF, L.; KUBICEK, C.P. Characterization of the pyruvate kinase-encoding gene (*pk1*) of *Trichoderma reesei*. **Gene**, v.130, n.2, p.271-275, 1993.
- SEKAR, V. The insecticidal crystal protein gene is expressed in vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. **Current Microbiology**, v.17, p.347-349, 1988.
- SEKAR, V.; THOMPSON, D.V.; MARONEY, M.J.; BOOKLAND, R.G.; ADANG, M.J. Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. **Proceeding of the National Academy of Science USA**, v.84, p.7036-7040, 1987.
- SHIN, B.S.; PARK, S.H.; CHOI, S.K.; KOO, B.T.; LEE, S.T.; KIM, J.I. Distribution of *cryV*-type insecticidal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.6, p.2402-2407, 1995.
- STANGL, H.; GRUBER, F.; KUBICEK, C.P. Characterization of the *Trichoderma reesei* *cbh2* promoter. **Current Genetics**, v.23, n.2, p.115-122, 1993.
- ST. LEGER, R.J.; FRANK, D.C.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. Molecular-cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **European Journal of Biochemistry**, v.204, p.991-1001, 1992a.
- ST. LEGER, R.J.; SHIMIZY, S.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Co-transformation of *Metarhizium anisopliae* by electroporation or using the gene gun to produce stable GUS transformants. **FEMS Microbiology Letters**, v.131, p.289-294, 1995.
- ST. LEGER, R.J.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v.120, p.119-124, 1992b.
- SUMMERS, M.D.; SMITH, G.E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. **Texas Agricultural Experiment Station Bulletin**, n.1555, 1987.
- TAILOR, R.; TIPPET, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**, v.6, n.9, p.1211-1217, 1992.
- TEEREI, T.T.; LEHTOVAARA, P.; KAUPPINEN, S.; SALOVUORI, I.; KNOWLES, J. Homology domains in *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes: genes sequence and expression of cellobiohydrolase II. **Gene**, v.51, p.43-45, 1987.
- THIEM, S.M.; MILLER, L.K. Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, v.63, p.2008-2018, 1989.
- TIGANO-MILANO, M.S.; HONEYCUTT, R.J.; LACEY, L.A.; ASSIS, R.; McCLELLAND, M.; SOBRAL, B.W.S. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.65, p.274-282, 1995.

- TORRONEN, A.; MACH, R.L.; MESSNER, R.; GONZALEZ, R.; KALKKINEN, N.; HARKKI, A.; KUBICEK, C.P. The two major xylanases from *Trichoderma reesei*: characterization of both enzymes and genes. **Biotechnology**, v.10, n.11, p.1462-1465, 1992.
- TSUKUDA, T.; CARLETON, S.; FOTHERINGHAM, S.; HOLLOMAN, W.K. Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. **Molecular and Cellular Biology**, v.8, p.3703-3709, 1988.
- TURNER, G. Strategies for cloning genes from filamentous fungi. In: PEBERDY, J.F.; CATEN, C.E.; OGDEN, J.E.; BENNETT, J.W. ed. **Applied molecular genetics of fungi**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991, p. 29-43.
- ULHOA, C.J.; VAINSTEIN, M.H.; PEBERDY, J.F. Transformation of *Trichoderma* species with dominant selectable markers. **Current Genetics**, v.21, p.21-23, 1992.
- VALADARES, M.C.C. The chitinolytic system in *Metarhizium anisopliae*. Nottingham University, 1995. 193p. Dissertação, PhD.
- VANHANEN, S.; SALOHEIMO, A.; KNOWLES, J.K.C.; PENTTILAE, M.; ILMEN, M. Promotor structure and expression of the 3-phosphoglycerate kinase-encoding gene (*pgk1*) of *Trichoderma reesei*. **Gene**, v.106, p.129-133, 1991.
- WATANABE, H.; HASUMI, K.; FUKUSHIMA, Y.; SAKAI, K.; ENDO, A. Cloning of two isozymes of *Trichoderma koningii* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with different sensitivity to koningic acid. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v.1172, p.43-48, 1993.
- WEY, T.T.; HSEU, T.H.; HUANG, L. Molecular cloning and sequence analysis of the cellobiohydrolase I gene from *Trichoderma koningii* G-39. **Current Microbiology**, v.28, n.1, p.31-39, 1994.
- WEYER, U.; KNIGHT, S.; POSSEE, R.D. Analysis of very late gene expression by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and the further development of multiple expression vectors. **Journal of General Virology**, v.71, p.1525-1534, 1990.
- WONG, H.C.; CHANG, S. Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.83, p.3233-3237, 1986.
- WONG, H.C.; SCHNEPF, H.E.; WHITELEY, H.R. Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. **Journal of Biological Chemistry**, v.258, p.1960-1967, 1983.

# 8

## UTILIZAÇÃO DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE DE PRAGAS: MERCADO, RISCOS E REGULAMENTAÇÕES

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

### INTRODUÇÃO

O conceito de controle de pragas com o uso exclusivo de pesticidas químicos está mudando; métodos de controle menos agressivos ao ambiente e à saúde humana são exigidos, principalmente, pela forte opinião pública e pelas agências ambientalistas, acopladas com a ação de vários governos.

Novas opções de controle de pragas tornam-se necessárias e, atualmente, o Manejo Integrado das Pragas (MIP), que usa diferentes métodos de controle, inclusive os pesticidas químicos convencionais, está ganhando adeptos no âmbito global. Dentro dessa nova abordagem, as tecnologias biológicas que se utilizam de organismos vivos, como os inimigos naturais (predadores, parasitóides e microrganismos), são as mais utilizadas ou pelo menos desejadas, e apresentam grande potencial de uso futuro. Tais tecnologias representam um novo segmento comercial e muitas indústrias, inclusive produtoras de pesticidas químicos, já estão no mercado com vários produtos disponíveis para a agricultura.

Dentre os produtos biológicos disponíveis no mercado, os biopesticidas, ou seja, aqueles que contêm como ingrediente ativo um microrganismo que pode ser vírus, bactéria, fungo ou protozoário, formulados ou não, aplicados de maneira similar a um pesticida químico, normalmente usado para uma redução rápida da população de uma praga (FAO, 1996), representam aproximadamente 1% do mercado mundial de pesticidas, e têm crescimento anual de 10 a 25% (Newton *et al.*, 1996).

A adoção de um biopesticida como prática tem sido mais frequente quando o uso dos pesticidas químicos não é possível devido à resistência da praga ao produto, baixa demanda de mercado ou porque economicamente o custo do pesticida químico é alto demais comparado ao valor econômico da cultura. Nessas situações as vantagens dos pesticidas biológicos são maiores em relação aos químicos convencionais, além de possuírem um histórico de segurança sobre o ambiente e a saúde humana.

Entretanto, não se deve esperar que os biopesticidas sejam totalmente inócuos a organismos não-alvo. As mesmas propriedades que lhes conferem eficiência como agentes de controle, ou seja, patogenicidade, toxicidade e deslocamento competitivo, são as mesmas que estão associadas a seus danos potenciais a organismos benéficos. A utilização de um biopesticida implica na possibilidade de uma ampla distribuição ambiental do agente microbiano e, conseqüentemente, na exposição de organismos benéficos, surgindo a necessidade de uma avaliação de risco do uso desses agentes de controle, previamente ao seu registro para uso comercial. Compete aos órgãos públicos ligados à Defesa Fitossanitária, Meio-Ambiente e Saúde estabelecerem os critérios para a avaliação desses produtos, através da elaboração de regulamentações e normas específicas compatíveis com os padrões internacionais que regulamentam o mesmo assunto.

O Brasil dispõe de regulamentações próprias relacionadas com a comercialização de produtos contendo agentes microbianos de controle. O Cone Sul também está implementando regulamentações e diretrizes harmonizadas para a Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, dentro das diretrizes do Mercosul.

Neste capítulo serão abordados alguns aspectos relevantes da utilização e mercado dos produtos microbianos para controle de pragas,

aspectos de riscos, das regulamentações vigentes e das perspectivas de uso.

## COMERCIALIZAÇÃO DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE

Segundo Rice *et al.* (1988), um agente microbiano de controle de pragas (AMC), para ter sucesso como um produto comercial de proteção de plantas deve satisfazer os critérios abaixo relacionados:

- Eficiência
- Segurança
- Passível de ser patenteado
- Produção em quantidade suficiente e com baixo custo
- Ser vendável
- Permitir retorno financeiro

As exigências acima são justificadas no sentido de proteger o enorme investimento exigido para se colocar um novo produto no grande mercado de proteção de plantas, de manter a infra-estrutura das corporações, financiar novas áreas de pesquisas futuras e, também, para atender as exigências dos órgãos de regulamentação durante o processo de registro do produto, e de garantir a segurança ambiental.

Uma visão geral do mercado de biopesticidas será abordada a seguir.

### Mercado Global

O mercado já estabelecido para os AMC representou, em 1995, US\$ 200 milhões ou 0,7% dos US\$ 30 bilhões do mercado mundial de pesticidas (Newton *et al.*, 1996; Congress, 1995). O percentual é aparentemente pequeno, porém este mercado está crescendo entre 10 e 25% ao ano, ao passo que o mercado de pesticidas químicos vem crescendo a taxas entre 1 a 2% ao ano (Starnes *et al.*, 1993, Newton *et al.*, 1996).

Segundo Lysansky & Coombs (1992), o mercado mundial dos pesticidas biológicos está representado por dois grandes grupos de produtos, sendo que a grande fatia deste mercado cabe atualmente aos produtos à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* através de suas diferentes variedades (Tabela 1).

TABELA 1. Divisão do mercado mundial de produtos biológicos (adaptado de Lysansky &amp; Coombs, 1992).

Agente microbiano	Mercado mundial (%)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	80
Nematóides	13,3
Outros	6,7

Um panorama mundial de comercialização para produtos à base de *B. thuringiensis* estabelecido por Lambert (1992) é apresentado na Tabela 2, e mostra a liderança do mercado norte-americano para esse produto.

TABELA 2. Mercado mundial de *B. thuringiensis* (adaptado de Lambert, 1992).

Região ou país	Mercado (US\$ milhões/ano)
América do Norte	57
Leste Europeu	24
África e Oriente Médio	12
América do Sul e Central	8
Austrália	2
Europa Ocidental	1

Pelo fato do mercado norte-americano ser muito maior do que o do restante dos países, algumas observações com relação a tendências de mercado futuro podem ser feitas baseando-se naquele país. Dentre os diversos produtos biológicos comercializados nos EUA, a maioria se aplica ao controle de insetos, diferentemente dos pesticidas químicos convencionais, cujo maior mercado é para controle de plantas invasoras, como se observa na Fig. 1. Isto certamente é ocasionado pelo grande mercado de inseticidas à base de *B. thuringiensis*.

Um panorama mais abrangente do tipo de microrganismos em uso nos Estados Unidos é apresentado no Anexo I, onde se encontram os produtos à base de AMCs registrados naquele país até agosto de 1997. O que deve ser destacado é o elevado número de produtos à base de bactérias, principalmente *Bacillus* e a ampla gama de pragas e doenças a que se aplicam.

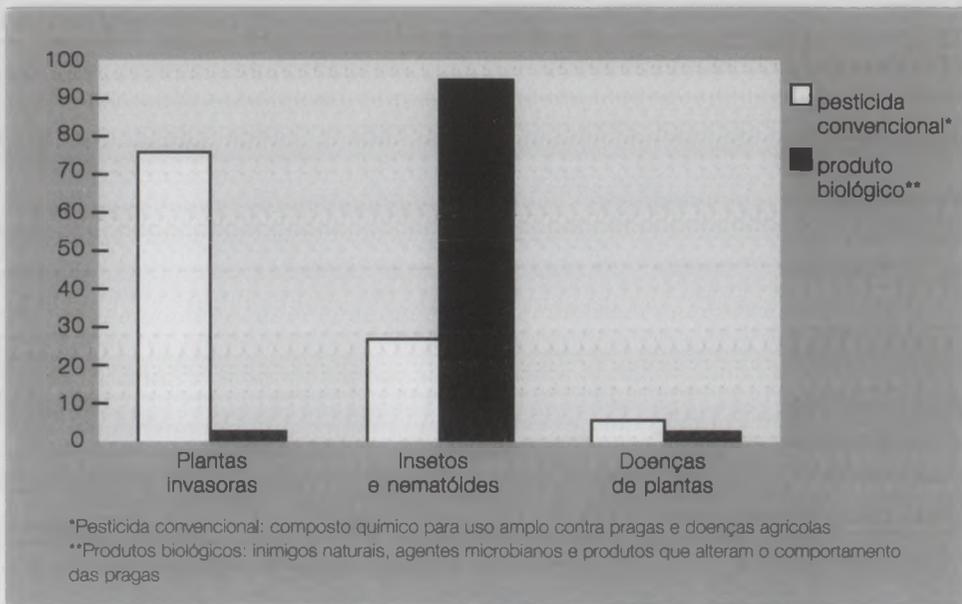


FIGURA 1. Comparação entre volume de vendas para pesticidas convencionais e biológicos segundo a praga a ser controlada. (Fonte: Congress, 1995)

Paralelamente à produção comercial atual de biopesticidas, uma grande variedade de microrganismos está sendo estudada no mundo, tanto em instituições de pesquisa como em algumas indústrias, com o objetivo de desenvolver novos produtos à base de bactérias e fungos (Congress, 1995). Quando esses produtos chegarem ao mercado espera-se que ocorra uma maior expansão do uso de produtos microbianos.

Em seguida, são discutidos, resumidamente, o mercado e as perspectivas para os diferentes grupos de AMCs (bactérias, vírus, fungos e protozoários), separadamente.

## Bactérias

O desenvolvimento de *B. thuringiensis* como biopesticida marcou o início da prática comercial do controle microbiano. O primeiro produto à base de *B. thuringiensis* — Sporeine — foi comercializado na França em 1938. Desde então seu mercado cresceu gradativamente até alcançar o patamar atual de líder dos AMCs. Indústrias de pequeno e grande porte estão envolvidas nesta produção, sendo que cerca de 80% da produção mundial deste bacilo se concentra em grandes indústrias.

A partir dos anos 80 o mercado de *B. thuringiensis* tomou novo impulso quando se verificou que novas linhagens apresentavam um espectro de atuação mais variado, atingindo dípteros, coleópteros e, mais recentemente, nematóides e ácaros. Mais detalhes sobre espectro de atuação das diferentes linhagens desta bactéria são apresentados em Adang (1991).

Também, um maior conhecimento da genética de *B. thuringiensis* e seu modo de ação, no início dos anos 90, estimularam a pesquisa sobre melhoramento de genes, aumentando a produção de toxinas, melhorando a virulência e ampliando o espectro de ação contra pragas (Lacey & Goethel, 1995). Esse conhecimento foi também a base para a incorporação de genes de toxinas em outras bactérias endofíticas e plantas, surgindo as plantas transgênicas ou plantas-pesticidas que expressam as toxinas de *B. thuringiensis*, fornecendo uma proteção constante contra as pragas-alvo. As plantas contendo toxinas de *B. thuringiensis* já existem no mercado norte-americano desde 1995 e, até meados de 1997, nove delas já estavam registradas pela Agência de Proteção Ambiental americana – EPA com ação contra larvas de lepidópteros nas culturas de milho, algodão e batata (Anexo I).

O mercado de plantas transgênicas apresenta tendência a aumentar consideravelmente, mas é dependente de estratégias de manejo de resistência das pragas às toxinas de *B. thuringiensis*; da aprovação de regulamentações específicas na maioria dos países permitindo seu registro comercial; da demonstração de sua segurança a organismos benéficos (avaliação do impacto ambiental); e da aceitação do público em geral, para sua adoção efetiva.

Futuras gerações de isolados de *B. thuringiensis* deverão ter habilidade para melhorar a capacidade de produção da  $\delta$ -endotoxina através da mutação genética, potencializar os esporos gerados na fermentação e controlar precisamente o conteúdo e o nível de expressão dos genes. Com essas características será possível construir isolados de *B. thuringiensis* com ação e espectro de atividade muito além daqueles isolados atualmente comercializados (Newton *et al.*, 1996).

Além de *B. thuringiensis*, cinco outros *Bacillus* são comercializados no âmbito mundial: *Bacillus popilliae* Dutky, no mercado desde 1948, sendo o primeiro biopesticida registrado nos Estados Unidos para o controle de coleópteros-praga; *Bacillus lentimorbus*, também utilizado para controle de coleópteros; *Bacillus sphaericus*, com atividade contra

larvas de mosquitos principalmente dos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* (Davidson, 1985; Lacey, 1990); *B. subtilis* se destaca no controle de fitopatógenos; *B. cereus* com características úteis para controle de crescimento de plantas, pois produz hormônios vegetais. Seu mercado é limitado devido ao espectro reduzido de atuação, e em decorrência disso, têm recebido menor atenção comercial que *B. thuringiensis*.

Outras bactérias produzidas comercialmente são: *Serratia entomophila* para controle de insetos-pragas em turfas e *Pseudomonas syringae*, *P. fluorescens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Candida oleophila* e *Bukholderia cepacia*, todas com atividade sobre fitopatógenos.

## Vírus

Apesar da existência de um grande número de vírus entomopatogênicos, somente dois grupos têm sido explorados como agentes de controle de pragas: vírus da poliedrose nuclear (VPN) e vírus da poliedrose citoplasmática (VPC). No entanto, é na família Baculoviridae que a maioria das pesquisas tem sido realizada.

Cerca de 600 espécies de insetos, incluindo lepidópteros, himenópteros, coleópteros e dípteros foram relatadas como susceptíveis aos Baculoviridae (Granados & Frederici, 1986). Entretanto, a maioria dos baculovírus é bastante específica, afetando geralmente uma única espécie de inseto dentro de um gênero (Gröner, 1986). Devido à sua alta especificidade são considerados extremamente seguros, não existindo nenhum relato de efeito adverso de baculovírus em campo sobre polinizadores, predadores e parasitóides adultos, nem tampouco sobre a saúde humana (Gröner, 1990). Em condições de laboratório e condições de máximo risco já foram detectados efeitos adversos em predadores (Nardo *et al.*, 1997).

Vários vírus têm sido registrados para uso nos Estados Unidos (Anexo I) e na Europa (OECD, 1995), mas na realidade poucos são comercialmente produzidos no mundo. O melhor exemplo poderia ser atribuído ao uso do vírus da poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg) para o controle da lagarta desfolhadora *Anticarsia gemmatalis* na cultura da soja no Brasil. Mais de um milhão de hectares são pulverizados anualmente com resultados satisfatórios de controle e retorno estimado de 50 milhões de dólares/ano (Moscardi, 1986, 1993, 1997). As principais razões para a pequena comercialização de vírus, em geral,

apontadas por Wood (1994), são alto custo de produção, tanto *in vivo* como *in vitro*, e a demora para matar a praga, característica geralmente não aceita pelos agricultores. Outros fatores negativos apontados são a alta especificidade, falta de formulações apropriadas, com proteção a radiações ultravioleta, pequena atividade residual sobre as superfícies das folhas, exigências de cuidados na aplicação em termos de horário do dia e detalhes de conhecimento da biologia da praga-alvo.

Entretanto, devido às características positivas apresentadas quanto à segurança e seletividade, espera-se um aumento na sua utilização nos próximos anos dentro do contexto de MIP e para aquelas culturas de alto valor econômico e de cultivo em pequenas áreas, onde um produto de proteção de plantas mais caro é viável de ser utilizado.

Como aconteceu com as bactérias, também os Baculovírus têm sido alvo de estudo da tecnologia de DNA recombinante, com o objetivo principal de reduzir o tempo de mortalidade da praga-alvo e aumentar seu espectro de ação. Alguns dos estudos realizados envolveram deleção de genes que atrasam a mortalidade e/ou inserção de genes que codificam produtos inseticidas como proteínas, toxinas específicas para insetos e enzimas modificadoras (Wood, 1995). Um dos exemplos mais recentes é a incorporação de genes que codificam uma parte da neurotoxina do escorpião, específica para insetos lepidópteros, reduzindo em 50% o tempo efetivo de mortalidade. Indústrias como DuPont e Cianamid estão envolvidas com esse projeto. A avaliação de risco dos vírus geneticamente engenheirados tem sido uma das maiores restrições que os órgãos de regulamentação têm imposto para a liberação desses organismos para testes de campo. Até o momento não existe nenhum vírus engenheirado registrado para comercialização no mercado mundial. Outro grande desafio técnico é a produção dos vírus *in vitro*, ou seja, por cultura de células. A produtividade necessita ser melhorada e efetivada em grande escala, empregando volumes de até 100.000 litros. Sendo este um território pouco explorado, não há ainda garantia de sucesso (Rice *et al.*, 1998).

## Fungos

Apesar dos fungos apresentarem um grande potencial para o desenvolvimento como AMC, somente alguns têm sido utilizados em uma escala comercial. Um dos melhores exemplos é o do Brasil com o uso

do fungo *Metarhizium anisopliae* para o controle das cigarrinhas-da-cana-de-açúcar (*Mahanarva fimbriolata* e *M. posticata*) (Marques, 1992). Outros exemplos de uso podem ser encontrados em McCoy *et al.* (1988), Zimmermann (1993) e Feng *et al.* (1994).

Dentre os fungos mais usados no âmbito mundial, estão os gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Verticillium*, *Nomurae*, *Entomophthora*, *Trichoderma*, *Aschersonia*, *Paecylomices* e *Lagenidium*, embora haja inúmeros outros em desenvolvimento. No mercado americano, até meados de 1997, existiam 31 produtos registrados à base de fungos (Anexo I), sendo que aqueles à base de *Beauveria* e *Metarhizium* predominavam com 8 e 5 produtos respectivamente. É nos fungos que existe maior número de produtos utilizados como antagonistas de fitopatógenos, sendo aqueles à base de *Trichoderma* os que predominam com 6 produtos registrados no mercado americano. Também para o controle de ervas-daninhas, dentre os AMCs, os fungos são os mais utilizados, com 5 produtos registrados nos Estados Unidos (Anexo I).

Quanto às perspectivas de mercado futuro de fungos como AMC, existem uma série de dificuldades a serem ultrapassadas. Muitas delas poderão ser superadas com estratégias de formulação e aplicação, porém um maior conhecimento da biologia do microrganismo e da praga-alvo são cruciais, envolvendo comportamento do hospedeiro, idade e vigor do patógeno, resistência à temperatura, radiação solar, umidade e tamanho do inóculo, entre outros (Lacey & Goethel, 1995). Outro aspecto ainda pouco explorado é a capacidade que os fungos possuem de produzir metabólitos em grande variedade, com ação antagônica a insetos, fungos e bactérias, com grande potencial de mercado futuro.

Quanto às melhorias na eficiência e outras características, através de manipulação genética nos genomas dos fungos, elas têm sido bem menores em relação àquelas realizadas com as bactérias e vírus. Maiores informações sobre o assunto podem ser encontradas em Ferron *et al.* (1991); Riba *et al.* (1994) e St. Leger (1994).

## Protozoários

Os protozoários são organismos geralmente hospedeiros específicos em insetos, de ação lenta, freqüentemente produzindo infecções crônicas caracterizadas pela debilidade do hospedeiro, redução de seu crescimento, vigor, alimentação, fecundidade e longevidade.

Apesar de numerosas espécies de protozoários serem patogênicas a insetos, poucas têm sido consideradas ou utilizadas como agentes de controle, sendo *Nosema locustae* o único protozoário registrado comercialmente, utilizado há vários anos nos Estados Unidos, Canadá e África no controle de gafanhotos de pastagens (Mason & Erlandson, 1994). As maiores dificuldades relacionadas a esse agente de biocontrole se referem às técnicas de produção, otimização de virulência e persistência além dos conhecimentos de epizootiologia.

Quanto às perspectivas de mercado, o interesse maior do uso de protozoários é em estratégias de longo prazo, principalmente no controle biológico clássico, deixando um panorama ainda pouco claro para os pesquisadores da área.

## Mercado no Brasil

As informações sobre volumes de vendas no mercado brasileiro de biopesticidas são escassas devido à falta de publicações sobre o assunto e à dificuldade de serem obtidas junto aos fabricantes. Dados apresentados por Dias (1991) mostraram que, para o ano de 1990, US\$ 350 milhões foram comercializados em inseticidas em geral, sendo apenas US\$ 2 milhões referentes aos bioinseticidas. Como um dos motivos da baixa utilização foi apontado o alto custo de importação e distribuição e, também, a incerteza da disponibilidade do produto quando necessário. A ausência de normas adequadas à avaliação do biopesticida, seu registro e comercialização no início dos anos 90 também podem ter concorrido para os baixos índices encontrados (Nardo *et al.*, 1995).

Em 1991, existiam 7 produtos microbianos registrados no Brasil, todos inseticidas à base de *B. thuringiensis*. Essa situação permaneceu até o ano de 1995, quando uma proposta de regulamentação específica para registro de biopesticidas foi elaborada para os Órgãos Federais Registrantes (Nardo *et al.*, 1995) e uma maior atenção começou a ser dada para esses produtos. Novos registros foram concedidos, elevando-se para 18 o número de formulações registradas até fevereiro de 1998. Dessas, 14 formulações são à base de *Bacillus* e suas diferentes variedades e as quatro restantes se referem ao *Baculovirus* VPN de *A. gemmatalis* (Quadro 1). Não há nenhum fungo registrado para comercialização como biopesticida no Brasil.

A produção ou comercialização de *B. thuringiensis* se concentra nas empresas multinacionais (Quadro 1), enquanto que para VPN de *A. anticarsia*, diferentes categorias de unidades produtoras estão envolvidas no processo de formulação e comercialização, tais como empresas privadas de pequeno porte e cooperativas. Dentre as empresas privadas envolvidas, além das apresentadas na Tabela 3, temos a J&A, que produz "lagarta *in natura*" e a empresa sucessora da GERATEC, que assumiu uma nova razão social.

O conjunto dessas empresas de diferentes naturezas constitui um pequeno parque industrial instável, tanto no que se refere à sua permanência no mercado, quanto no dimensionamento da oferta do produto e, até mesmo, em relação ao tipo de produto oferecido (Echeverria *et al.*, 1998).

Atualmente, VPN de *A. anticarsia* é aplicado em cerca de 1 milhão de ha/ano, sendo que para 50% dessa área são utilizados os produtos comerciais (Quadro 1) e no restante se utiliza o produto distribuído pela EMBRAPA ou o extrato bruto produzido localmente pelos pequenos produtores ou Cooperativas (Echeverria *et al.*, 1998). Estima-se uma ampliação da oferta deste AMC de 732.700 doses produzidas na safra 95/96 para 1.325.000 doses, que estarão disponíveis para venda na safra 97/98 (Moscardi, 1997). Tal previsão, somada ao número de agricultores que utilizam o produto *in natura*, traz uma perspectiva da área tratada com esse produto elevar-se para 1.500.000 ha em 1998 (Tabela 3).

Um outro AMC utilizado em larga escala no país é o fungo *M. anisopliae* para o controle de cigarrinha-da-cana-de-açúcar. A partir de 1973 foi iniciado estudo para o cultivo massal desse fungo. Resultados promissores levaram o antigo Planalsucar a executar em 1976 um programa de controle integrado destas cigarrinhas em diversos estados do Brasil. De 1970 a 1991, foram produzidos pelo Instituto do Açúcar de do Alcool, Planalsucar e Instituto de Pesquisas Agropecuárias de Pernambuco, entre outros laboratórios, aproximadamente 38.000 kg de conídios de *M. anisopliae*, possibilitando o tratamento de uma área de mais de 470.000 ha em Pernambuco (Marques, 1992). No estado de Alagoas, de 1977 a 1991, foram pulverizados 670.000 ha. Esse programa pode ser considerado, no âmbito global, como o maior na utilização de um fungo como AMC. Atualmente, com a diminuição do nível de ataque das pragas, a utilização do AMC foi reduzida drasticamente para 12.000 ha e é aplicada somente na época de chuvas (Alves &

TABELA 3. Produção de VPN de *A. anticarsia* por unidade produtora (adaptado de Echeverria et al., 1998).

Unidades produtoras	Doses produzidas (safra 95/96)	Doses estimadas (safra 97/98)*
TECNIMTA	–	160.000
NOVA ERA**	37.700	60.000
COODETEC**	360.000	450.000
NITRAL**	200.000	450.000
CPAO***	40.000	80.000
AEE/CNPSO	95.000	125.000
Total	732.700	1.325.000

Estimativa de produção de vírus safra 97/98: 1.750.000 doses

\*Estimados por Flávio Moscardi - CNPSO.

\*\*Pesquisados junto às unidades produtoras.

\*\*\*Estimados junto à unidade de produção no CNPSO.

Lecuona, 1996). Para as cigarrinhas-das-pastagens (*Zulia enteriana* e *Deois flavopicta*), *M. anisopliae* também tem sido utilizado.

Os resultados animadores e a possibilidade de utilização do fungo *M. anisopliae* no controle de cigarrinhas-das-pastagens logo mobilizaram interesses do setor empresarial e de pesquisas financiadas pelo setor público (Futino & Salles Filho, 1991). Até meados de 80, sete empresas de pequeno a médio porte iniciaram a produção industrial deste fungo, entretanto apenas uma manteve a produção até recentemente. Os insucessos comerciais deste biopesticida podem ter ocorrido por causa da fragilidade do microrganismo no campo, da grande variabilidade natural do fungo, e principalmente por causa da falta de uma padronização (controle de qualidade) para sua comercialização, devido à falta de regulamentações específicas para o registro de biopesticidas no país (Futino & Salles Filho, 1991).

Em termos gerais, um setor com futuro bastante promissor para a comercialização de AMCs no Brasil é o da Saúde Pública, para o controle de insetos vetores de doenças como malária, dengue, oncocercose e também de pernilongos e borrachudos, pois os órgãos ligados à saúde pública demandam urgência na substituição dos produtos químicos. *B. thuringiensis* var. *israelensis* e *B. sphaericus* são os AMCs que vêm sendo utilizados ou estudados para esta área de controle, com resultados promissores. Além disso, indústrias estão se associando aos grupos de pesquisa nos estudos de AMCs eficientes (Quadro 1).

QUADRO 1. Biopesticidas registrados no Brasil até fevereiro de 1998 (adaptado de Jungles, 1998).

Órgão <sup>1</sup>	Empresa produtora	Nome comercial	Ingrediente ativo	Classe	Cultura a que se aplica	Organismo alvo	Ano de reg. <sup>2</sup>
M.A.A. <sup>3</sup>	Abbott Lab.	DIPEL	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , HD-1	Inseticida	soja, trigo, repolho, citros, melão	Lepidópteros	1991
Ibama <sup>4</sup>	Abbott Lab.	DIPEL F	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , HD-1	Inseticida	eucalipto	<i>Thyrinteina arnobia</i>	1991
M.A.A.	Abbott Lab.	DIPEL TÉCNICO	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , HD-1	Inseticida			1981
M.A.A.	Abbott Lab.	DIPEL PM	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , HD-1	Inseticida	citros, abóbora, abacaxi	Lepidópteros	1989, 1992
M.A.A.	Agri-control	BAC-CONTROL PM	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , 3a, 3b	Inseticida	soja, algodão, gramíneas, fumo, alfafa, mandioca, amendoim, crucíferas, tomate, coqueiro, citros cucurbitáceas,	Lepidópteros	1987, 1991
M.A.A.	Novartis S.A. Biociências	AGREE	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> , GC 91	Inseticida	citros, melão, pepino, tomate, repolho	Lepidópteros	1995
Ibama	Novartis S.A. Biociências	AGREE N.A.	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> , GC 91	Inseticida	eucalipto	<i>T. arnobia</i>	1995
M.A.A.	Geratec	PROTEGE	Virus da Poliedrose Nuclear de <i>Anticarsia gemmatilis</i>	Inseticida	soja	<i>A. gemmatilis</i>	1996
M.A.A.	Geratec	BACTUR PM	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , H-3a, 3b	Inseticida	soja	<i>A. gemmatilis</i>	1996
M.A.A.	Nitral	BACULO VIRUS NITRAL	VPN de <i>A. gemmatilis</i>	Inseticida	soja	<i>A. gemmatilis</i>	1996
M.A.A.	Nova Era	BACULO SOJA	VPN de <i>A. gemmatilis</i>	Inseticida	soja	<i>A. gemmatilis</i>	1995
M.A.A.	Novartis S.A. Biociências	THURICIDE	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , HD-1, 3a, 3b	Inseticida	alfafa, algodão, amendoim, arroz, batata, cana-de-açúcar, citros, coqueiro, crucíferas, fumo, mandioca, maracujá, milho, pastagens, soja, trigo	Lepidópteros	1991
Ibama	Novartis S.A. Biociências	THURICIDE PM	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	Inseticida	eucalipto, seringueira, pinus	Lepidópteros	1997

Órgão <sup>1</sup>	Empresa produtora	Nome comercial	Ingrediente ativo	Classe	Cultura a que se aplica	Organismo alvo	Ano de reg. <sup>2</sup>
M.A.A.	Solvay do Brasil	BACTOSPEIN E PM	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	Inseticida	saúde pública	emprego domissanitário, controle <i>Aedes aegypti</i> e culicídeos	1991
M.A.A.	Coodetec	COOPER VÍRUS PM	VPN de <i>A. gemmatalis</i>	Inseticida	soja	<i>A. gemmatalis</i>	1996
M.A.A.	Hoechst & Schering Agrevo	ECOTECH PRO	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , EG 2348	Inseticida		Lepidópteros	1998
M. Saúde <sup>5</sup>	Novartis S.A. Biociências	TEKNAR	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	Inseticida	campanhas de saúde pública e entidades especializadas	<i>Culex</i> , <i>Aedes</i> , <i>Anopheles</i> , simuliídeos	1989
M. Saúde	Geratec	SPHERICO	<i>Bacillus sphaericus</i>	Inseticida	campanhas de saúde pública e entidades especializadas	<i>Aedes aegypti</i> e Culicídeos	1995

<sup>1</sup>Órgão Federal Registrante

<sup>2</sup>Ano em que o registro foi autorizado

<sup>3</sup>Ministério da Agricultura e do Abastecimento

<sup>4</sup>Instituto Brasileiro do Meio-Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

<sup>5</sup>Ministério da Saúde

## AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE UTILIZADOS E EM DESENVOLVIMENTO NO BRASIL

O Brasil é reconhecido por suas intensas pesquisas em controle microbiano de pragas, dispondo de 123 laboratórios trabalhando nesta área em 1993 (Dias *et al.*, 1993); atualmente, somam-se mais de 150 (Dias, comunicação pessoal). Embora a maioria dos programas biológicos no Brasil estejam direcionados ao controle de insetos-pragas, já existem vários deles para o controle de fitopatógenos e ervas-daninhas.

Exemplos de agentes microbianos disponíveis no comércio (agentes de uso extensivo) e daqueles que ainda estão em desenvolvimento no país, para diferentes culturas e aplicações, são apresentados no Quadro 2.

O quadro mostra alguns exemplos da enorme variedade de microrganismos em estudo ou uso no país. Mesmo que apenas uma parcela destes venha a se transformar em produto comercial no futuro próximo, a perspectiva de disponibilidade de AMC para programas de MIP é bastante promissora.

QUADRO 2. Exemplos de microrganismos utilizados extensivamente ou em desenvolvimento para controle de pragas no Brasil.

Patógeno	Praga	Cultura	Situação*	Referência selecionada
<b>Bactérias</b>				
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> e <i>aizawai</i>	Lepidópteros	diversas	1	Jungles, 1998; Padilha, 1996
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	<i>Culex</i> , <i>Aedes</i> , <i>Anopheles</i> e simúlideos	saúde pública	1	Vilarinhos <i>et al.</i> , 1997
<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>Aedes aegypti</i> e <i>Culicídeos</i>	saúde pública	1	Regis, 1996
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Uromyces</i> <i>phaseoli</i>	feijão	3	Bettiol, 1991
<i>Agrobacterium</i> <i>radiobacter</i>	<i>A.</i> <i>tumefaciens</i>		2	citado por Bettiol, 1991
<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>		mal-do-trigo	1	Luz, 1993
<b>Fungos</b>				
<i>Metarhizium</i> <i>anisopliae</i>	<i>Deois flavopicta</i> e <i>Zulia enterrana</i>	pastagens	1	Marques, 1992
	<i>Mahanarva</i> <i>fimbriolata</i> e <i>M. posticata</i>	cana-de-açúcar	1	Marques, 1992
	<i>Panstrongylus</i> <i>megistis</i>	vetor doença de Chagas	2	Messias <i>et al.</i> , 1998
	<i>Sphenophorus</i> <i>levis</i>	citros	3	Campanhola <i>et al.</i> , 1998
	<i>Diploschema</i> <i>rotundicollis</i> e <i>Hypothenemus</i> <i>hampei</i>	café	3	Neves, 1997; Machado <i>et al.</i> , 1992
	<i>Heterotermes</i> <i>tenuis</i>	cana-de-açúcar	2	Neves, 1997
	<i>Boophilus</i> <i>microplus</i>	pecuária	3	Bittencourt, 1996
	<i>Triatoma infestans</i>	ambientes urbanos	2	Neves, 1997
	<i>Cornitermes</i> <i>cumulans</i> e <i>C. bequerti</i>	cupim	2	Alves <i>et al.</i> , 1992
<i>Metarhizium</i> <i>flavoviridens</i>	<i>Rhammatocerus</i> <i>schistocercoides</i>	várias	2	Magalhães, 1997
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Metamasius</i> <i>hemipterus</i>	cana-de-açúcar	2	Neves, 1997
	<i>Tetranychus</i> <i>urticae</i>	várias	2	Neves, 1997

Patógeno	Praga	Cultura	Situação*	Referência selecionada
	<i>Anthonomus grandis</i> e <i>Eutinobothrus brasiliensis</i>	algodão	2	Neves, 1997
	<i>Rhammatocerus schistocerus</i>	várias	2	Neves, 1997
	<i>Sitophilus</i> spp.	grãos armazenados	2	Neves, 1997
	<i>Rhizoperta dominica</i> , <i>Acromyrmex</i> spp. e <i>Atta</i> spp.	várias	2	Neves, 1997
	<i>Oryzophagus oryzae</i> , <i>Lissorhoptrus tibialis</i> e <i>Helodytes faveolatus</i>	arroz	2	Neves, 1997
<i>Trichoderma viride</i>	Tombamento	fumo	2	Melo, 1991
	<i>Phytophthora cactorum</i>	maçã	2	Valdebenito-Sanhueza, 1991
	<i>Crinipellis pernicioso</i>	cacau	2	Bastos, 1996
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Sclerotinia</i> spp.	diversas	2	Cassiolato <i>et al.</i> , 1996
<i>Duddingtonia flagrans</i>		nematóide em gado	3	Padilha, 1998
<i>Alternaria cassiae</i>	<i>S. obtusifolia</i>	erva-daninha	2	Pitelli, 1996
<i>Cercospora</i> sp.	<i>Cyperus rotundus</i>	erva-daninha	2	Pitelli, 1996
<i>Bipolaris euphorbiae</i>	<i>Euphorbia heterophylla</i>		2	Gazziero & Yorinori, 1993
<i>Gliocladium roseum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	morango e roseira	2	Valdebenito-Sanhueza, 1991
<i>Acremonium alternatum</i> e <i>A. persiciunum</i>	<i>Catacauma torrendiela</i> e <i>C. palmicola</i>	côco	2	Sudo, 1989
<i>Monacrosporium</i> sp., <i>M. ellipsorum</i> e <i>Verticillium chlamydosporium</i>	<i>Meloidogyne incognita</i> raça 3		3	Dalla Pria & Ferraz, 1996
<i>Sporothrix insectorum</i>	<i>Leptophensa hevea</i>	seringueira	2	Junqueira <i>et al.</i> , 1987
<i>Neozygitis</i> spp.	<i>Mononychellus tanajoaz</i>	mandioca	3	Delalibera <i>et al.</i> , 1992; Moraes & Delalibera, 1992
<i>Nomurea rileyi</i>	<i>A. gemmatalis</i>	soja	2	Moscardi <i>et al.</i> , 1981
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	milho	3	
<i>Zoophthora radicans</i>	<i>Empoasca</i> sp.	feijão e caupi	2	Neves, 1997

Patógeno	Praga	Cultura	Situação*	Referência selecionada
<i>Hirsutella</i> spp.	<i>Phyllocoptrura oleivora</i>	citros	2	Neves, 1997
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Orthezia praelonga</i>	citros	3	Batista & Bezerra, 1966; Cesnik <i>et al.</i> , 1996
<i>C. cladosporioides</i>	pulgões	fumo	3	Neves, 1997
<b>Vírus</b>				
<i>Baculovirus erhyne</i>	<i>Erynes</i>	mandioca	2	Schiditt, 1988
<i>Baculovirus spodoptera</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	milho	2	Valicente, 1997
<i>Baculovirus anticarsia</i>	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	soja	1	Moscardi, 1986

\* 1 - uso extensivo

2 - em escala intermediária de desenvolvimento

3 - em fase inicial de estudo

## RISCOS ASSOCIADOS AO USO DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE

A grande preocupação associada ao uso de AMCs, seja ele em pequena ou grande escala, é o fato deles poderem persistir, multiplicar, disseminar no ambiente e causar doenças e epizootias em organismos benéficos não visados. Quatro efeitos adversos potenciais são associados ao uso de AMCs sobre organismos benéficos: alergenicidade, toxicidade, patogenicidade e deslocamento competitivo. Com exceção da alergenicidade, todos os outros riscos são os mesmos atributos que conferem a eficiência do agente microbiano no controle da praga-alvo (Cook *et al.*, 1996).

A probabilidade da ocorrência de um efeito adverso por um AMC pode ser em função de sua origem geográfica ou de uma característica geneticamente adicionada ou modificada, mas os riscos associados são os mesmos, seja o AMC nativo, exótico ou geneticamente modificado (quer seja pelas tecnologias tradicionais ou pela técnica do DNA recombinante). Da mesma maneira, a probabilidade de ocorrer algum dano pode variar com o método de aplicação (aspersão, tratamento de solo, sementes ou iscas) e pode aumentar com a escala de uso, mas os riscos ainda são os mesmos (Cook *et al.*, 1996).

Apesar das preocupações relacionadas aos danos potenciais dos AMCs, a prática tem provado poucos exemplos de efeitos adversos sobre organismos benéficos. Populações de microrganismos aplicados

no ambiente normalmente diminuem para uma densidade natural de equilíbrio, freqüentemente para níveis não detectáveis (Podgwaite, 1981; TeBeest, 1982; Cook *et al.*, 1991).

Os casos mais bem documentados de efeitos a longo prazo no ecossistema são os efeitos indiretos de AMCs sobre predadores e parasitóides da praga-alvo (Goethel *et al.*, 1990). Algumas preocupações também têm surgido com o uso de *B. thuringiensis* para o controle de lagartas desfolhadoras, devido ao fato desta bactéria ser ativa contra larvas de outros lepidópteros que são fontes de alimento para pássaros (Miller, 1990). Entretanto, há evidências de que o efeito é de curta duração e que a população do organismo não-alvo se estabiliza relativamente rápido, após a descontinuidade da aplicação (Peacock *et al.*, 1993; Wagner *et al.*, 1996).

No Brasil, o estudo da avaliação de risco de AMCs é bastante recente, alguns trabalhos foram e estão sendo desenvolvidos em condições de laboratório (Nascimento *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 1997; Nardo *et al.*, 1998). Estudos de impacto ambiental no campo são praticamente inexistentes.

De forma concisa são apresentados no Quadro 3 alguns exemplos de riscos potenciais de uso de AMCs; eles indicam que o potencial de risco existe, porém em vários casos não há relato de impacto detectado e, em outros casos, este impacto é reversível tão logo se interrompa a aplicação do AMC.

Os riscos potenciais associados ao uso de AMCs devem ser adequadamente identificados e comparados com o impacto de outras opções de manejo de pragas, inclusive a de não se controlar a praga. Aos órgãos de regulamentação cabe avaliar os AMCs e fazer o balanço risco-benefício quando do registro dos produtos para comercialização (Nardo & Capalbo, 1998b).

## **REGULAMENTAÇÕES SOBRE COMERCIALIZAÇÃO DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE DE PRAGAS NO BRASIL E REGIÃO DO CONE SUL**

O Brasil dispõe de regulamentações próprias relacionadas à comercialização de AMCs e, no âmbito regional do Cone Sul, também estão sendo estabelecidas regulamentações e diretrizes harmonizadas

QUADRO 3. Exemplos de riscos potenciais associados ao uso de agentes microbianos no controle de pragas (baseado em Congress, 1995).

Microrganismo	Impactos potenciais	
	no ambiente	na saúde humana
Bactérias	impactos adversos sobre lepidópteros não visados e suas aves predadoras declínio de curta duração de certos insetos não visados resistência da praga ao patógeno detectada no campo	mínimo risco: alguns dados sugerem possíveis infecções em indivíduos imunodeficientes
Fungos	possíveis efeitos sobre organismos não visados algumas evidências de resistência	algumas alergias em seres humanos e produção de metabólitos tóxicos
Vírus	mínimos efeitos sobre organismos não visados possibilidade de resistência ao patógeno no futuro se o uso se expandir	nenhum risco documentado já detectado em laboratório
Protozoários	possíveis efeitos sobre espécies não visadas	nenhum risco documentado

para a Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, as quais deverão ser implementadas pelas Organizações Nacionais de Proteção Fitosanitária (ONPF) de cada país a partir de 1998. Estas regulamentações são descritas a seguir.

## Legislação Brasileira

De acordo com a Lei Federal 7.802, de 11 de junho de 1989, os agrotóxicos, seus componentes e afins, dentre os quais os produtos contendo agentes microbianos de controle, só poderão ser produzidos se previamente registrados de acordo com as diretrizes e exigências dos órgãos federais registrantes.

No Brasil, são três as instituições envolvidas no registro de um biopesticida. O Ministério da Agricultura e Abastecimento (MA) registra produtos para uso agrícola ou em pastagens, avaliando a eficiência do produto, e solicita para o Ministério da Saúde (MS) e Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) a

avaliação toxicológica e ambiental respectivamente. O IBAMA registra produtos para proteção de florestas, ambientes hídricos e outros ecossistemas; neste caso, o órgão avalia a eficiência e impacto ambiental, ao mesmo tempo que solicita para o MS uma avaliação toxicológica. O MS registra produtos de uso domiciliar, público ou privado, ou aqueles utilizados em campanhas de saúde pública e em tratamento de água, avaliando a eficiência e o risco à saúde humana e solicita ao IBAMA uma avaliação ambiental.

Dentre os órgãos registrantes, somente o IBAMA dispõe de uma regulamentação específica para o registro de produtos contendo AMCs: a Portaria 131, de 3 de novembro de 1997, que foi totalmente baseada na proposta elaborada por Nardo *et al.* (1995) para os órgãos federais registrantes e é válida somente para microrganismos naturais não manipulados geneticamente através de sua molécula DNA.

A legislação usada pelo MA e MS para o registro de produtos biológicos é aquela estabelecida para a avaliação de produtos químicos, que não leva em conta muitas das características inerentes aos produtos contendo microrganismos, embora já exista uma nova regulamentação regional sobre o assunto a ser implementada ainda em 1998 (COMITE, 1997).

## **Organismos Geneticamente Modificados (OGMs)**

No caso dos OGMs, a Lei de Biossegurança nº 8974, de 5 de janeiro de 1995, estabelece normas especiais de segurança (Valle, 1996). Todo OGM nativo ou exótico requer uma avaliação inicial da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), ligada ao Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT), antes que o MA aprove o Permite de introdução ou uso. A instituição solicitante deve possuir um Comitê Interno de Biossegurança (CIB) e também um Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) emitido pela CTNBio.

A avaliação de microrganismos geneticamente modificados é baseada em protocolos harmonizados no âmbito mundial, tendo grande influência daqueles utilizados pela Austrália. Até o final de 1997, a CTNBio aprovou a importação de 2 espécies de plantas transgênicas: fumo resistente a fungos e milho resistente a insetos.

Maiores informações poderão ser obtidas na homepage da CTNBio: <http://www.mct.gov.br/ctnbio/ctnbio/htm>.

## Legislação Regional

Com o início das atividades do Mercado Comum do Cone Sul (Mercosul) entre Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, foi necessária uma padronização de regulamentações fitossanitárias para a região. Tal harmonização está sendo buscada pelo Comitê de Sanidade Vegetal do Cone Sul (COSAVE), que é formado pelos responsáveis pelos Serviços de Inspeção e Vigilância Fitossanitária dos cinco países, dando subsídio técnico ao MERCOSUL. O COSAVE é constituído de Grupos Permanentes de Trabalho (GTP), sendo que um deles é dedicado a assuntos de controle biológico (GTP-CB). O objetivo principal deste grupo é a harmonização de regulamentações na área de controle biológico e a otimização da capacidade regional já instalada (Dias *et al.*, 1996).

Um dos "standards" elaborado pelo GTP-CB e aprovado pelo Comitê Diretivo do COSAVE é sobre "Requisitos para el Registro de Agentes de Control Biologico Microbiano, Productos Tecnicos Microbianos y Productos Microbianos Formulados" (COMITE, 1997). Esse "standard" detalha os requisitos exigidos para o registro de um produto fitossanitário contendo AMC na região. Com a implementação dessa regulamentação harmonizada, espera-se que os testes exigidos para o registro de um AMC em um dado país sejam os mesmos exigidos pelos outros países da região, e que existam laboratórios credenciados no âmbito regional, aptos para avaliação dos AMCs. O objetivo é evitar a exigência de duplicidade de testes e, conseqüentemente, reduzir custos e tempo.

Para maiores informações sobre as atividades do COSAVE-GTP-CB consultar <http://www.bdt.org.br/bdt/biocontrol>.

## Avaliação de AMCs para Fins de Registro Comercial

As exigências para registro de produtos fitossanitários contendo AMCs incluem informações detalhadas sobre a identificação do AMC e de seu processo de produção (Análise do Produto), além de testes de segurança em mamíferos e organismos benéficos não visados (Avaliações Toxicopatológicas e Ecotoxicológicas, respectivamente) (Nardo *et al.*, 1995; Nardo & Capalbo, 1998a,b; COMITE, 1997).

A *análise do produto* inclui informações e testes necessários para identificar o ingrediente ativo e qualquer substância inerte que tenha sido adicionada, como também o processo de produção do agente

microbiano. O objetivo desta exigência é permitir a identificação de possíveis contaminantes químicos ou biológicos que possam aparecer no processo de fabricação do biopesticida.

A *avaliação toxicopatológica* em mamíferos inclui testes para avaliar o potencial de infectividade, patogenicidade e toxicidade dos AMCs à saúde humana. Esses testes são realizados em três fases hierárquicas excludentes.

A *avaliação ecotoxicológica* inclui testes para avaliar o potencial de infectividade, patogenicidade e toxicidade dos AMCs a organismos benéficos não-alvo, presentes no ambiente terrestre e aquático. Essa avaliação também se realiza em diferentes fases hierárquicas excludentes, utilizando organismos representantes do ambiente terrestre (aves, artrópodes benéficos) e aquático (peixes e invertebrados).

O objetivo de se trabalhar em fases hierárquicas é a redução de testes, custos e tempo exigido para o registro dos produtos fitossanitários. Para maiores detalhes sobre os testes de avaliação, recomenda-se a leitura dos trabalhos de Nardo *et al.*, 1995, 1998; Capalbo *et al.*, 1998, Jonsson *et al.*, 1998 e Castro *et al.*, 1998.

## PERSPECTIVAS DO USO DE AGENTES MICROBIANOS

Vários são os fatores que contribuem para o uso e comercialização dos AMCs, e é preciso analisá-los para se poder obter uma perspectiva realista de seu mercado futuro. Talvez a principal força propulsora do controle microbiano seja a resistência das pragas aos pesticidas químicos. Quando resultados razoáveis de controle com os produtos químicos não podem mais ser obtidos, as alternativas biológicas têm se mostrado muito úteis. O controle de pragas como *Bemisia tabaci*, *Liriomyza trifolii*, *L. huidobrensis* e *Frankliniella occidentalis* são alguns exemplos onde atualmente o controle biológico é praticamente o único viável.

Também o desenvolvimento de novos pesticidas químicos está se tornando mais caro, resultante de requisitos mais restritivos para registro, bem como da maior dificuldade em se detectar novas moléculas químicas; conseqüentemente poucos pesticidas novos estão entrando no mercado.

A preocupação ambiental tornou-se um assunto de decisão política, e os órgãos governamentais de fiscalização estão apoiando a racionalização de uso de químicos, como é o caso do Programa "Protocolo

Verde”, implantado pelo governo brasileiro, o que pode resultar em uma demanda crescente pelos produtos biológicos. Aliada a essa demanda, uma mudança de atitude do agricultor, e do próprio consumidor, buscando processos e produtos menos agressivos ao homem e ao ambiente, favorecerá a implementação de práticas do MIP (Ravensvberg, 1994). Outro fator favorável é o número crescente de produtos contendo AMCs e de muitos outros em estágio promissor, como apresentado neste capítulo.

Fatores limitantes ao crescimento do mercado se relacionam aos aspectos técnicos e legislativos. Uma série de barreiras devem ser superadas, visando a obtenção de produtos mais competitivos no mercado. Para a maioria dos AMCs, a falta de formulações e tecnologias de aplicação mais adequadas e o alto custo de produção do produto ainda são os grandes empecilhos para seu desenvolvimento. Uma estratégia de marketing com a mesma agressividade daquela utilizada para produtos químicos, além de investimentos na área de educação sobre o controle microbiano, podem favorecer o uso de AMCs.

No Quadro 4 são apresentados alguns fatores que podem afetar a aceitação e o uso de AMCs no futuro.

Resumidamente, os fatores de mercado que favorecem os produtos contendo AMCs 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 MIP, estabilização e harmonização de regulamentação governamental para registro de biopesticidas contendo microrganismos de ocorrência natural ou engenheirados, presença de muitas companhias de grande porte no mercado de biopesticidas e legislação adequada.

As indústrias de pesticidas têm desenvolvido pesquisa, porém com pouco marketing especialmente para AMCs, mas muitos outros fatores influenciam a comercialização destes produtos, entre os quais incluem-se programas de manejo e políticas públicas.

Com certeza, a adoção do controle microbiano será maior onde o uso de pesticidas químicos for: *ineficiente*, por resistência da praga ou tamanho reduzido do mercado para aquela cultura; *inaceitável*, por sensibilidade do ambiente ou onde o contato com o ser humano é muito grande; *inviável* economicamente, por custos muito elevados dos pesticidas em relação ao valor econômico da cultura. Nesses ca-

QUADRO 4. Fatores que afetam o uso de agentes microbianos de controle no futuro (adaptado de Harris, 1990; Ravensberg, 1994; Watson, 1983; Congress, 1995).

<b>Ação, evento ou tendência</b>	<b>Efeito previsto</b>	<b>Causa para o evento</b>
<b>Percepção pública</b>		
aumento da demanda por alimentos orgânicos	positivo	cuidados com a saúde humana
aumento da preocupação com doenças e microrganismos	negativo	cuidados com a saúde humana
falta de conhecimento profundo do MIP e da biotecnologia	negativo	
demanda por produtos sem danos (plantas ornamentais, frutas e hortaliças)	negativo	fatores de mercado
maior divulgação pela mídia dos danos causados pelo uso de pesticidas químicos	positivo	cuidados com a saúde humana e o ambiente
demanda pública por altos padrões para alimentos e de segurança ambiental	positivo	
<b>Setor privado</b>		
implementação de controle de qualidade na produção de AMC	positivo	transferência de tecnologia mais eficiente ou pressão dos órgãos regulamentadores
introdução de novos pesticidas convencionais, ambientalmente mais seguros	negativo	
aumento da confiança do produtor nos extensionistas e no MIP	positivo	treinamento de extensionistas em controle biológico e MIP
indústrias processadoras de alimentos mais exigentes quanto à presença de resíduos de pesticidas	positivo	mudanças na rotulagem de alimentos
aumento das taxas de juros pelo uso de pesticidas químicos	positivo	política ministerial
sucesso das plantas geneticamente modificadas para resistência a insetos	negativo	
<b>Inovações tecnológicas</b>		
menores custos de produção e aplicação de AMC	positivo	pesquisa ou apoio à indústria nacional
barateamento no processo de registro de AMC	positivo	política pública

Ação, evento ou tendência	Efeito previsto	Causa para o evento
maior eficiência dos AMC — novos isolados, melhoria genética, melhor formulação, maior espectro de ação etc.	positivo	pesquisa e apoio à pesquisa
aumento da oferta de organismos geneticamente modificados	positivo	
<b>Políticas públicas</b>		
melhoria no processo de registro para AMC	positivo	mudanças internas nos órgãos de registro
elevação dos custos de registro de pesticidas convencionais por necessidade de revisão dos procedimentos já estabelecidos quanto à segurança de uso	positivo	política ministerial e mudanças nos órgãos de registros
coordenação entre o setor público, a pesquisa e a indústria	positivo	políticas internas dos três setores

tos, especialmente, os AMCs têm vantagem comparativa pois apresentam, em geral, histórico de segurança para o homem e o ambiente.

A disponibilização dos AMCs é fator primordial — se um pesticida não está disponível no mercado, como utilizá-lo?

## CONCLUSÕES

Microrganismos como agentes de controle de pragas são ferramentas valiosas para programas de MIP. Entretanto, para os AMCs de ocorrência natural ou os OGMs alcançarem seu potencial total, uma série de atividades adicionais são necessárias.

Existem várias considerações de regulamentação que poderiam acelerar a implementação dos AMCs. Certamente uma regulamentação clara e consistente atendendo as características dos microrganismos é desejável pela maioria das indústrias que comercializam microrganismos.

Para o uso de microrganismos geneticamente modificados, além de legislações, o entendimento e aceitação pública desses produtos deve ser levado em consideração; instituições científicas e pessoas que representam as indústrias devem tornar-se habilitados para mostrar os benefícios e segurança das novas tecnologias.

Embora algumas pesquisas básicas sejam feitas nas indústrias, a maior parte da pesquisa básica é feita em universidades e instituições de pesquisa. Recursos adequados devem ser alocados para estas pesquisas básicas, em tópicos como: mecanismos de ação, fatores que afetam crescimento celular ótimo, fatores ambientais e de virulência que afetam a eficiência, estratégias de monitoramento e manejo de resistência (Starnes *et al.*, 1993). Também pesquisa sobre avaliação de impactos ambientais dos AMCs e metodologias adequadas para os testes de avaliação de risco devem ser fomentados, assim como estudos do impacto sócio-econômico desta atividade.

O uso de AMCs exige atenção ao comportamento da praga, biologia e otimização do uso de microrganismos. Isto significa que os agricultores devem ser educados para entender as diferenças entre produtos químicos e biológicos e que há a necessidade de atenção especial na aplicação. Muitos agricultores desejam experimentar tecnologias novas; se estas falharem na primeira vez, dificilmente tentarão novamente. Da mesma maneira, as indústrias que comercializarão os agentes de controle microbiano devem apresentar uma figura realística da nova tecnologia e incrementar uma rede de técnicos treinados em repassar essa tecnologia para os extensionistas, que são aquelas pessoas que estão realmente junto dos agricultores. Uma estratégia de marketing similar à dos produtos químicos é altamente desejável para o incremento do uso de agentes microbianos.

A mudança do manejo de controle de pragas visando redução do uso de pesticidas químicos depende do desenvolvimento de tecnologias alternativas. A política governamental através de seus diversos papéis na pesquisa, desenvolvimento, implementação, regulamentação e estabelecimento de padrões de mercado para exportação e importação de insumos e produtos agrícolas, exerce uma forte influência na adoção de tecnologias biológicas. O ajuste de políticas federais e programas de controle de pragas em várias áreas facilitará e incentivará a utilização de tecnologias biológicas, entre elas os AMCs.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Gilberto J. de Moraes e Dra. Rosa Frighetto pelas valiosas sugestões na elaboração do capítulo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B.; LECUONA, R.E. Utilización de hongos entomopatógenos. In: LECUONA, R.E. **Microorganismos insectos ampliados en el control microbiano de insectos plaga**. Buenos Aires: Edição do autor, 1996. p.241-254.
- ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOIND JR., A.; STIMAC, J.L.; PEREIRA, R.M. Use of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* for control of *Cornitermes cumulans*. In: ANNUAL MEETING. SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 25., 1992, Heidelberg. **Abstracts**. Heidelberg, 1992. p.199.
- ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOIND JR., A.; STIMAC, J.L.; PEREIRA, R.M. Use of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* for control of *Cornitermes cumulans* in pastures. **Ecossistema**, v.20, p.50-57, 1995.
- ADANG, M.J. *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: gene structure, action and utilization. In: MARAMOROSHI, K., ed. **Biotechnology for biological control of pests and vectors**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.3-24.
- BASTOS, C.N. A natureza micoparasítica do antagonismo entre *Trichoderma viride* e *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.1, p.50-54, 1996.
- BATISTA, A.C.; BEZERRA, J.L. Sobre o parasitismo de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. e outros fungos, em *Orthezia praelonga* Douglas. **Broteria**. Lisboa, v.35, p.1-2, 1966.
- BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**, Jaguariúna, EMBRAPA-CNPMA, 1991, 388p.
- BITTENCOURT, V.R.E.P. Controle biológico de carrapatos de importância veterinária. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu. **Anais: Conferências e Palestras**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1996. p.214-218.
- CAMPANHOLA, C.; RODRIGUES, G.S.; BETTIOL, W. Biotechnology and crop protection in Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON SUSTAINABLE AGRICULTURE IN TROPICAL AND SUBTROPICAL HIGHLANDS WITH SPECIAL REFERENCE TO LATIN AMERICA, 1998, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro, 1998. Não paginado.
- CAPALBO, D.M.F.; NARDO, E.A.B.de; MORAES, G.J.de; OLIVEIRA, M.C.B.; CASTRO, V.L.S.S. Avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro como biopesticidas: informações sobre o produto e análise de resíduos. v.1. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. No prelo.
- CASSIOLATO, A.M.R.; BAKER, R.; MELO, I.S. Parasitismo de *Sclerotinia sclerotiorum* e *S. minor* por mutantes de *Trichoderma harzianum* em segmentos de aipo. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.1, p.120-122, 1996.
- CASTRO, V.L.S.S.; CAPALBO, D.M.F.; MORAES, G.J.de; NARDO, E.A.D.de; OLIVEIRA, M.C.B.de. Avaliação de agentes microbianos de controle de praga para registro como biopesticida: testes toxicopatológicos em mamíferos. v.2. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. No prelo.
- CESNIK, R.; FERRAZ, J.M.G.; OLIVEIRA, R.C.A.L.; ARELLANO, F.; MAIA, A.H.N.M. Controle de *Orthezia praelonga* com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Orthezia*, na região de Limeira, SP. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5. Foz do Iguaçu, PR. **Anais: sessão de posters**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1996. p.363.
- COMITE DE SANIDAD VEGETAL DEL CONO SUR.GTP.CB. **Requisitos para el registro de agentes de control biológico microbiano, productos técnicos microbianos y productos microbianos formulados**. [S.l.: s.n.], 1997. paginação irregular.
- 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.; 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 microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. **Biological Control**, v.7, p.333-351, 1996.
- COOK, R.J.; WELLER, D.M.; KOVACEVICH, P.; DRAHOS, D.; HEMMING, B.; BARNES, G.; PIERSON, E.L. Establishment, monitoring and termination of field tests with genetically altered bacteria applied to wheat for biological control of take-all. In: MackENSIE, D.R.; HENRY, S.C., ed. **Biological monitoring of genetically engineered plants and microbes**: proceedings of the Kiawah Island Conference November 27-30, 1990. Bethesda: Agricultural Research Institute, 1991. p.177-187.
- DALLA PRIA, M.; FERRAZ, S. Controle biológico de *Meloidogyne incognita*, raça 3, por seis espécies de *Monacrosporium*, isoladas ou combinadas com *Verticillium chlamydosporium*. **Fitopatologia brasileira**, v.21, n.1, p.30-34, 1996.
- DAVIDSON, E.W. *Bacillus sphaericus* as a microbial control agent for mosquito larvae. In: LAIRD, M.; MILES, J. ed. **Integrated mosquito control methodologies**. London: Academic Press, v.2, p.213-226.
- DELALIBERA JR., I.; SOSA GOMEZ, S.R.; MORAES, G.J.de; ALENCAR, J.A.; FARIAS ARAUJO, W. Infection of the spider mite *Mononychelus tanajoa* (Acari: Tetranychidae) by the fungus *Neozygites* sp. (Entomophthorales) in northeast Brazil. **Florida Entomologist**, v.75, n.1, p.145-147, 1992.
- DIAS, J.M.C.S. Os bioinseticidas no Brasil. **Cenargen Informa**, dezembro, 1991, p.9.
- DIAS, J.M.C.S.; PIRES, C.S.S.; MAGALHÃES, B.P.; FONTES, E.M.G. **Catálogo de instituições brasileiras que trabalham em controle biológico de insetos**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 1993. 151p. (EMBRAPA-CENARGEN, Documentos, 17).
- DIAS, J.M.C.S.; MONDACA-RIVAS, P.S.; ARES, M.I.; PASSALACQUA, S.A.; STELLATO, B.; NARDO, E.A.B.de; BUSTAMANTE, R.A.; CHIARAVALLE, W.; FALCO, M.G.; PENA CANDIA, J.P. Grupo de trabalho permanente em controle biológico do Comitê de Sanidade Vegetal do Cone Sul (COSAVE) - atividades do biênio 1993/95. In: SICONBIOL - SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu. **Anais: sessão de posters**. Curitiba: EMBRAPA-CNPSo/COBRAFI, 1996. p.211.
- ECHEVERRIA, T.M.; KITAMURA, P.C.; NARDO, E.A.B.de; MORALES, L.C. Etnografia da tecnologia de controle biológico da lagarta-da-soja: *Baculovirus anticarsia*, 1998. **Arquivos do Instituto Biológico**. No prelo

- FAO. Code of conduct for the import and release of exotic biological control agents. Rome: FAO, 1996. 12p.
- FENG, M.G.; POPRAWSKI, T.J.; KHATCHATOURIANS, G.G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. **Biocontrol Science Technology**, v.4, p.3-34, 1994
- FERRON, P.; FARGUES, J.; RIBA, S. Fungi as microbial insecticides against pests. In: ARORA, D.K.; AJELIO, L.; MUKERJI, K.G., ed. **Handbook of applied mycology**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.665-706.
- FUTINO, A.M.; SALES FILHO, S. A biotecnologia na agricultura brasileira: a indústria de defensivos agrícolas e o controle biológico. **Agricultura em São Paulo**, v.38, tomo especial, p.45-88, 1991.
- GAZZIERO, D.L.P.; YORINORI, J.T. Experiência sobre controle biológico de *Euphorbia heterophylla* no Brasil. Jaboticabal: UNESP/FCAVJ. 1993. 11p.
- 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.
- GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. **The biology of Baculovirus**. Boca Raton: CRC Press, v.1-2, 1986.
- GRÖNER, A. Safety to nontarget invertebrates of baculoviruses. In: LAIRD, M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W., ed. **Safety of microbial insecticides**. Boca Raton: CRC Press, 1990. P.135-202.
- GRÖNER, A. Specificity and safety of baculovirus. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A., ed. **The Biology of baculoviruses**. Practical application for insect control. Boca Raton: CRC Press, 1986. p.177-202.
- HARRIS, P. Environmental impact of introduced biological control agents. In: MACKAUER, M.; EHLE, L.E.; ROLAND, E.D. **Critical issues in biological control**. Andover: Intercept Limited, 1990, p.289-300.
- JONSSON, C.M.; MAIA, A.H.N.; NARDO, E.A.B.de; MORAES, G.J.de; OLIVEIRA, M.C.B.de; FERREIRA, C.J.A.; CAPALBO, D.M.F. Avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro como biopesticidas. Testes toxicopatológicos em organismos não visados do ambiente aquático: organismos zooplancônicos, fitoplancônicos e vertebrados, v.3. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. No prelo.
- JUNGLES, M.A. Ofício n.2-04/M/98DIRCOF/DEAMB. Brasília, 1998. (Comunicação Pessoal).
- JUNQUEIRA, N.T.V.; LIMA, M.I.P.M.; MARTINS, M.A.M.; MAGALHÃES, F.E.L. Isolamento e cultivo do fungo *Sporotrix insectorum* a ser utilizado para o controle da mosca-de-renda da seringueira. Manaus: EMBRAPA/CNPDS, 1987. 4p. (Comunicado Técnico, 56).
- LACEY, L.A.; GOETTEL, M.S. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. **Entomophaga**, v.40, n.1, p.3-27, 1995.
- LACEY, L.A. Persistence and formulation of *Bacillus sphaericus*. In: BARJAC, H.de; SUTHERLAND, D., ed. **Bacterial control of mosquitoes and black flies**: biochemistry, genetics and applications of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus*. New Brunswick: Rutgers University Press, 1990. p.284-294
- LAMBERT, B.; PFEROEN, M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis* - facts and mysteries about a successful biopesticide. **BioScience**, v.42, p.112-122, 1992
- LYSANSKY, S.G. International harmonization in biopesticide registration and legislation. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE. Pests and diseases, Brighton. **Proceedings**. Farnham:BCPC, 1994. p.1397-1402.
- LYSANSKY, S.G.; COOMBS, J. Technical improvements to biopesticides. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE. Pests and diseases. **Proceedings**. Farnham: BCPC, 1992, p.345-350.
- LUZ, W.C. Controle microbiano do mal-do-pé-do-trigo pelo tratamento de sementes. **Fitopatologia Brasileira**, 1993, v.18, p.80-85.
- MACHADO, L.A.; LEITE, L.G.; CRUZ, B.P.B.; SILVA, E.M. Utilização do fungo *Metarhizium anisopliae* para controle da broca dos citros, *Diploschema rotundicolle*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3., 1992, Águas de Lindóia. **Anais**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1992, p.273.
- MAGALHÃES, B.P. Microbial control of grasshoppers in Brazil with the use of entomopathogenic fungi. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 7., 1995, Santos, SP **Proceedings**. Santos: Brazilian Society for Microbiology, 1997. p.429-433.
- MARQUES, E.J. Controle microbiano de cigarrinhas (Hemiptera: Cercopidae) com *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.: eficiência e limitações. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3., 1992, Águas de Lindóia. **Anais**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1992. p.73-78.
- MASON, P.G.; ERLANDSON, M.A. The potential of biological control for management of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) in Canada. **Canadian Entomologist**, v.126, p.1459-1491. 1994
- MCCOY, C.W.; SAMSON, R.A.; BOUCIAS, D.G. Entomogenous fungi. In: IGNOFFO, M.; MANDAVA, N.B. eds. **Handbook of natural pesticides, microbial insecticides, part A: entomogenous protozoa and fungi**. Boca Raton: CRC Press, 1988. v.5, p.151-236.
- MELO, I.S. Potencialidade de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (org). Controle biológico de doenças de plantas, 1991. p.135-156. (EMBRAPA-CNPMA, Documentos 15).
- MESSIAS, C.L.; FOFERRAS, A.N.; RODRIGUES, V.L.C.C.; DESTEFANO, R.H.R.; PIEDRABUENA, A.E. Potencial of control of Chagas/vector disease by the fungus *Metarhizium anisopliae*; 1998. No prelo.
- MESSIAS, C.L.; DAOUST, R.A.; ROBERTS, D.W. Virulence of a natural isolate, auxotrophic mutants and a diploid of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* to *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.47, p.231-233, 1986.
- MILLER, J.S. Field assessment of the effect of a microbial pest control agent on nontarget lepidopteran. **American Entomologist**, v.36, p.135-139, 1990.
- MORAES, G.J.de; DELALIBERA, J.J. Specificity of a strain of *Neozygites* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) to *Mononychellus tanajopa* (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.14, n.2, p.89-94, 1992.
- MOSCARDI, F.; ALLEN, E.G.E.; GREENE, G.I. Control of the velvetbean caterpillar by nuclear polyhedrosis virus and insecticides and impact for treatments on the natural incidence of the entomopathogenic fungus *Normurea riley*. **Journal of Economic Entomology**, v.74, p.480-485, 1981

- MOSCARDI, F. Desenvolvimento de bioinseticidas a base de vírus. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador. **Resumos**. Salvador: SEB, EMBRAPA-CNPMPF, 1997. p.13.
- MOSCARDI, F. Utilização de vírus para o controle da lagarta da soja. In: ALVES, S.B., ed. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. p.188-202.
- MOSCARDI, F. Soybean integrated pest management in Brazil. **FAO Plant Protection Bulletin**, v.41, p.91-100, 1993.
- NARDO, E.A.B.de; CAPALBO, D.M.F. Análise de risco do uso de agentes microbianos de controle: testes ecotoxicológicos sobre organismos não visados. **Arquivos do Instituto Biológico**, 1998a. No prelo
- NARDO, E.A.B.de; CAPALBO, D.M.F. O processo de avaliação de risco do uso de agentes microbianos de controle de pragas: conceitos e testes ecotoxicológicos. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998b. No prelo.
- NARDO, E.A.B.de; CAPALBO, D.M.F.; MORAES, G.J.; OLIVEIRA, M.C.B.; coord. 1995. **Requisitos para a análise de risco de produto contendo AMCs de organismos nocivos**: uma proposta para os órgãos federais registrantes. Jaguariúna, EMBRAPA-CNPMA, 1995. 42p. (EMBRAPA-CNPMA, Documentos, 2).
- NARDO, E.A.B.de; WATANABE, M.A.; MARIAGO, A.L.S.; NAKAMURA, V.V.; UCHINO, E.M. Efeito de formulações com *Baculovirus anticarsia* ativo e inativo sobre o predador *Podisus nigrispinus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador. **Resumos**. Salvador: SEB/EMBRAPA-CNPMPF, 1997. p.148.
- NARDO, E.A.B.de; SÁ, L.A.N.; LENCIONE, F.; MORAES, G.J.de; OLIVEIRA, M.C.de; CAPALBO, D.M.F.; WATANABE, M.A.; MAIA, A.H.; JONSSON, C.M. Avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro como biopesticidas. Testes toxicopatológicos em organismos terrestres: aves, artrópodos benéficos, organismos de solo e plantas, v.4. Jaguariúna, EMBRAPA-CNPMA, 1998. No prelo.
- NASCIMENTO, M.L.; CAPALBO, D.M.F.; MORAES, G.J.de; NARDO, E.A.B.de. Effect of a formulation of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* on *Podisus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae: Asopinae). **Journal of Invertebrate Pathology**, 1998. No prelo.
- NEVES, P.S. Controle microbiano de pragas no Brasil. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS, 5., 1997, Campinas. **Anais**. Campinas: Instituto Biológico, 1997. p.52-59.
- NEWTON, P.J.; NEALE, M.C.; ARSLAN-BIR, M.; BRANDE, M.; FIDGETT, M.J.; GREATREX, R.M. Full range pest management with IPM systems an industry view of the options for non-indigenous biopesticides. In: WAAGE, J.K. **Biological control introductions**: opportunities for improved crop production. Wallingford: British Crop Protection Council, 1996. p.79-97. (Symposium Proceedings, 67).
- OECD Environment Monograph. Data requirements for registration of biopesticides in OECD member countries, survey results. Paris: OECD, 1995.
- PADILHA, T. Comunicação pessoal, 1998.
- PADILHA, T. Possibilities for biocontrolling trichostrongylid nematodes of ruminants. In: SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu. **Anais: conferências e palestras**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1996. p.207-213.
- PEACOCK, J.W.; WAGNER, D.L.; SCHWEITZER, D.F.; TALLEY, S.E. Impacts of Bt on non-target *Lepidoptera*. In: ANNUAL GYPSY MOTH REVIEW, 1993, Harrisburg. **Proceedings**
- PITELLI, R.A. Controle biológico de plantas daninhas. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu. **Anais: conferências e palestras**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1996. p.3-4.
- PODGWAITE, J.D. Environmental persistence of gypsy moth NPV. In: DOANE, C.C.; McMANUS, M.L. ed. **The gypsy moth: research toward integrated pest management**. Washington: USDA, 1981. p.479-481. (USDA. Technical Bulletin, 1584).
- RAVENSBERG, W.J. Biological control of pests: current trends and future prospects. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE. Pests and Diseases. **Proceedings**. Farnham: BCPC, 1994. v.2, p.591-600.
- REGIS, L.; SILVA-FILHA, M.H.N.L.; OLIVEIRA, C.M.F.de; FURTADO, A.F. Vantagens e limitações do uso de *Bacillus sphaericus* no controle de *Culex quinquefasciatus* em áreas urbanas. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu. **Anais: conferências e palestras**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1996. p.432-437.
- RIBA, G.; COUTEAUDIER, Y.; MAURER, P.; NEUVÉGLISE, C. Molecular methods offer a new challenge for fungal bioinsecticides. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY, 6., 1994. **Proceedings** p.16-22.
- RICES, M.J.; LEGG, M.; POWELL, K.A. Natural products in agriculture - a view from the industry. **Pesticide Science**, 1998, v.52, p.184-188.
- SCHIDT, A.T. Using *Baculovirus erinnyis* in the biological control of cassava hornworm. **Cassava Newsletter**, v.12, n.1, p.1-4, 1988.
- ST. LEGER, R.J. Mycoinsecticides: an opportunity for genetic engineering. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY, 6., 1994. **Proceedings** p.299-304.
- STARNES, R.L.; LIU, C.; MARNONE, P.G. History, use and future of microbial insecticides. **American Entomologist**, v.39, n.2, p.83-91, 1993.
- SUDO, S. Biocontrole de *Catacauma torrendiella* e *Coccostrongylis palmicola*, agentes causadores da lixa-preta do coqueiro. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 3., 1989, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba: USP/EMBRAPA, 1989. p.57-59.
- TEBEEST, D.O. Survival of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* in rice irrigation water and soil. **Plant Disease**, v.66, p.469-472, 1982.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. Possibilidades do controle biológico de *Phytophthora* em macieira. In: BETTIOL, W., coord. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1991. p.303-305.
- VALICENTE, F.H. Desenvolvimento do *Baculovirus spodoptera* para o controle da lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador. **Resumos**. Salvador: SEB/EMBRAPA-CNPMPF, 1997. p.18.

- VALLE, S., org. **Regulamentação da biossegurança em biotecnologia: legislação brasileira**. Rio de Janeiro: ABRASCO, 1996. n.p.
- VILARINHOS, P.T.R.; DIAS, J.M.C.S.; ANDRADE, C.F.S.; COUTINHO, C.J.P.C. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simuliídeos. In: ALVES, S.B., coord. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986.
- WAGNER, D.L.; PEACOCK, J.W.; CARTER, J.L.; TALLEY, S.E. Field assessment of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on non-target Lepidoptera. **Environmental Entomology**, v.25, n.6, p.1444-1454, 1996.
- WATANABE, M.A.; NARDO, E.A.B.de; MORAES, G.J. Avaliação do efeito do *Baculovirus anticarsia* sobre *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851), predador da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hubner, 1818). EMBRAPA-CNPMA, 1997. 4p. (EMBRAPA-CNPMA. Pesquisa em andamento, 1).
- WATSON, A.K. The classical approach with plant pathogens. In: CHARUDATTAN, R.; WALKER, H. ed. **Biological control of weeds with plant pathogens**. New York: John Wiley, 1983. p.3-23.
- WOOD, H.A. Recombinant baculovirus pesticides: protecting our crops and our environment. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY, 6., 1994. **Proceedings** p.428-429.
- WOOD, H.A. Development and testing of genetically improved baculovirus insecticides. In: SHULER, M.L.; WOOD, H.A.; GRANADOS, R.R.; HAMMER, D.A. **Baculovirus expression systems and biopesticides**. New York: Wiley-Liss, 1995. p.91-102, 1995.
- ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. **Pesticide Science**, v.37, p.375-379, 1993.

## ANEXO I

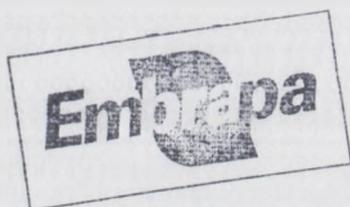
Agentes microbianos de controle de pragas registrados para uso nos Estados Unidos até agosto de 1997 (EPA, 1997, comunicação pessoal).

Agente Microbiano de Controle	Ano do registro	Nº de produtos	Praga ou doença controlada pelo AMC
<b>Bactérias</b>			
<i>Bacillus popilliae</i> e <i>B. lentimorbus</i>	1948	2	Larvas de besouro japonês
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	1961	127	Larvas de lepidópteros
<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	1979	2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (galha da coroa)
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	1981	26	Larvas de dípteros
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>san diego</i>	1988	1	Larvas de coleópteros
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i>	1988	6	Larvas de coleópteros
<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain EG1053	1988	2	Tombamento de plântulas
<i>P. fluorescens</i> A506	1992	2	Espécie de <i>Pseudomonas</i> ativa para nucleação de gelo
<i>P. fluorescens</i> 1629RS	1992	2	Espécie de <i>Pseudomonas</i> ativa para nucleação de gelo
<i>P. syringae</i> 742RS	1992	2	Espécie de <i>Pseudomonas</i> ativa para nucleação de gelo
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> EG 2348	1989	4	Larva de lepidópteros
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> EG 2424	1989	1	Larva de lepidópteros
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> EG 2371	1990	3	Larva de lepidópteros



Agente Microbiano de Controle	Ano do registro	Nº de produtos	Praga ou doença controlada pelo AMC
<i>B. sphaericus</i>	1991	1	Larvas de dípteros
<i>B. subtilis</i> GBO3	1992	2	Tombamento de plântulas
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> GC-91	1992	2	Larva de lepidópteros
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	1992	2	Larva de lepidópteros
<i>Burkholderia cepacia</i> type Wisconsin	1992	2	Tombamento de plântulas, nematóides
<i>Streptomyces griseoviridis</i> K61	1993	5	Tombamento de plântulas
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> BMP123	1993	5	Larva de lepidópteros
<i>B. subtilis</i> MBI 600	1994	1	Tombamento de plântulas
<i>P. fluorescens</i> NCIB 12089	1994	1	Podridão parda de cogumelos comestíveis
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> EG7673 C	1995	2	Besouro-de-batata-do Colorado
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> EG7673 L	1995	2	Larva de lepidópteros
<i>P. syringae</i> ESC 10	1995	2	Doenças de pós-colheita
<i>P. syringae</i> ESC 11	1995	2	Doenças de pós-colheita
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> M-200	1996	2	Larva de lepidópteros
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> EG7841	1996	1	Larva de lepidópteros
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> EG7826	1996	3	Larva de lepidópteros
<i>Burkholderia cepacia</i> type Wisc., isol. J82	1996	1	Tombamento de plântulas
<i>Bacillus cereus</i> strain BP01	1997	1	Regulador de crescimento de planta
<b>Leveduras</b>			
<i>Candida oleophila</i> I-182	1995	2	Doenças de pós-colheita
<b>Fungos</b>			
<i>Phytophthora palmivora</i> MWV	1981	1	Erva-daninha
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f.sp. <i>aeschynomene</i> ATCC 20358	1982	3	Erva-daninha
<i>Trichoderma harzianum</i> ATCC 20476	1989	1	Declínio de plantas arbóreas (ferimentos)
<i>Trichoderma polysporum</i> ATCC 20475	1989	1	Podridão da madeira
<i>Gliocladium virens</i> G-21	1990	2	<i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i>
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai KRL-AG2	1990	4	Tombamento de plântulas
<i>Lagenidium giganteum</i>	1991	3	Larvas de mosquitos
<i>Metarhizium anisopliae</i> ESF1	1993	5	Baratas e moscas <i>Puccinia canaliculate</i> (Schweinitz)
<i>Langerheim</i> ATCC 40199	1993	1	Tiririca
<i>Ampelomyces quisqualis</i> M10	1994	2	Mildio pulverulento
<i>Beauveria bassiana</i> GHA	1995	6	Gafanhotos, grilos e mosca-branca
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 74040	1995	2	Mosca branca, bicudo-do-algodoeiro

Agente Microbiano de Controle	Ano do registro	Nº de produtos	Praga ou doença controlada pelo AMC
<b>Protozoários</b>			
<i>Nosema locustae</i>	1980	3	Gafanhotos
<b>Vírus</b>			
<i>Heliothis</i> Nucleopolyhedrosis virus (NPV)	1975	1	Bicudo-do-algodoeiro
Douglas fir tussock moth NPV	1976	1	Douglas fir tussock moth
Gypsy moth NPV	1978	3	Lagarta cigana
Beet armyworm NPV	1993	1	Lagarta soldada da beterraba
<i>Autographa californica</i> NPV	1994	1	<i>Autographa californica</i>
<i>Anagrapha falcifera</i> NPV	1995	2	Lepidópteros
<i>Cydia pomonella</i> Granulosis virus	1995	1	<i>Cydia pomonella</i>
<b>Pesticidas Microbianos Não-Viáveis</b>			
Delta-endotoxina de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> em <i>P. fluorescens</i> não viável	1991	2	Larvas de lepidópteros
Delta-endotoxina de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>san diego</i> em <i>P. fluorescens</i> não-viável	1991	1	Larvas de coleópteros
Delta-endotoxina de <i>Bt. CryI(A)(b)</i> & <i>Cry II(c)</i> em <i>P. fluorescens</i> não-viável	1995	1	Larvas de lepidópteros
Delta-endotoxina de <i>Bt CryI(c)</i> em <i>P. fluorescens</i> não-viável	1996	1	Larvas de lepidópteros
Sólidos e solúveis inviáveis da fermentação <i>Myrothecium verrucaria</i>	1996	3	Nematóides
<b>Plantas Pesticidas</b>			
Delta-endotoxina de <i>Bt. CryIIA</i> e o material genético necessário para sua produção em batata	1995	1	Besouro-da-batata do-Colorado
Delta-endotoxina de <i>Bt. CryI(A)(b)</i> e o material genético necessário para sua produção em milho	1995	2	Larvas de lepidópteros
Delta-endotoxina de <i>Bt. CryI(A)(c)</i> e o material genético necessário para sua produção em algodão	1995	1	Larvas de lepidópteros
Delta-endotoxina de <i>Bt. CryI(A)(b)</i> e o material genético necessário para sua produção em milho	1996	2	Larvas de lepidópteros
Delta-endotoxina de <i>Bt. Cry IA(c)</i> e o material genético necessário para sua produção em milho	1997	1	Larvas de lepidópteros





**EMBRAPA** 632.96 M528c v.1 e.6

FICHA DO LIVRO

**AUTOR:**

**MELO, I.S. de et al., eds.**

**TÍTULO: Controle biológico.**

DEVOLVER EM

**NOME DO LEITOR**



Impresso em off set



Rua Bogert, 64 - V Vermelha  
04298-020 São Paulo - SP  
Fone (011) 6946-0233  
Telex (011) 6914-4773  
E-mail hamburg@uol.com.br

com filias conhecidas pelo editor

**Outras Publicações  
da Embrapa  
Meio Ambiente**

Microbiologia Ambiental

Ecologia Microbiana

Controle Biológico vol. 2  
(prelo)

Controle Biológico vol. 3  
(prelo)



---

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**  
**Centro Nacional de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental**  
Ministério da Agricultura e do Abastecimento

O controle biológico deixou de ser, em muitos casos, um método alternativo de controle. É, hoje, uma realidade em muitos agroecossistemas. As perdas agrícolas causadas por problemas fitossanitários têm exigido o uso, muitas vezes indiscriminado, de pesticidas químicos com impacto negativo à vida selvagem.

Este livro, o primeiro da série sobre controle biológico, fornece informações detalhadas sobre a utilização de microrganismos para o controle de doenças de plantas, insetos, ervas daninhas e de vetores transmissores de doenças, além de incorporar dois capítulos sobre o melhoramento e engenharia genética de agentes de biocontrole.

O assunto é de interesse para estudantes e profissionais especializados, como microbiologistas, entomologistas, fitopatologistas, ecologistas etc.

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

ISBN 85-85771-02-X



9 788585 771027

COLLEGE  
BIOLOGICAL  
CONTROL

632.96  
M528c  
2000  
v. 1 ex. 1  
LV-PP-19