

Controle biológico.  
2000 LV-2000.00559



CNPMA-3536-5

# CONTROLE BIOLÓGICO

Editores

ITAMAR SOARES DE MELO

JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

*Baculovirus*

*Bacillus thuringiensis*

*clianum*

# CONTROLE BIOLÓGICO

*Pseudomonas p*

VOLUME  
**3**

00559

# *Gliocladium roseum*

## *ria penetrans*

O controle biológico, utilizando microrganismos, é uma fascinante alternativa de proteção de plantas, animais e o homem contra pragas, doenças e vetores e, às vezes, o único método disponível para o controle eficaz. O

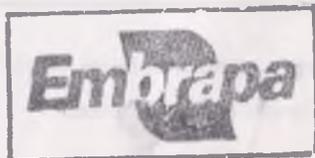
*Saccharis sabalis*  
manejo de pragas e vetores deve ser priorizado, no sentido de atender a expansão da população humana. Substituindo, muitas vezes, os produtos químicos, o biocontrole é pouco ou nada prejudicial ao meio ambiente, desde que ele seja feito com o necessário embasamento científico, que permite prever e evitar riscos. E é nesse aspecto que está a grande contribuição deste livro, ao apresentar com grande riqueza de detalhes e informações científicas, os princípios que norteiam o controle biológico.

Bernardo van Raij  
Chefe Geral  
Embrapa Meio Ambiente

*B. Sphaer*

# CONTROLE BIOLÓGICO

---



CLASS. 632.96  
CUTTER M 5280 -v.3  
TOMBO 043/2000

**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**

Presidente: Fernando Henrique Cardoso

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

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa**

Presidente: Alberto Duque Portugal

Diretores: Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Elza Angela Battaglia Brito da Cunha

**Embrapa Meio Ambiente**

Chefe Geral: Bernardo van Raij

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento: Deise Maria Fontana Capalbo

Chefe Adjunto Administrativo: Vander Roberto Bisinoto



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

# CONTROLE BIOLÓGICO

---

Editores

Itamar Soares de Melo  
João Lúcio de Azevedo

3

Embrapa Meio Ambiente

Exemplares dessa publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP 340 - km 127,5 - Tanquinho Velho

Caixa Postal 69 13820-000, Jaguariúna, SP

Fone: (19) 3867-8750 Fax: (19) 3867-8740

*sac@cnpma.embrapa.br*

[www.cnpma.embrapa.br](http://www.cnpma.embrapa.br)

Revisão: Maria Cristina Tordin e Denise Moraes de Oliveira

Normatização: Maria Amélia de Toledo Leme

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

Capa: idéia Itamar Soares de Melo e arte Franco Ferreira de Moraes

Tiragem: 1000 exemplares

C764

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

ISBN 85-85771-08-9

Inclui bibliografia

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

CDD-632.96

# AUTORES

## **Alejandra Bravo**

Universidad Nacional Autonoma de México, CP 62250, Cuernavaca, Mor./  
México

## **Ana Maria R. Cassiolato**

Departamento de Biologia, UNESP, Campus de Ilha Solteira  
Caixa Postal 31, CEP 15385-000, Ilha Solteira, SP

## **Cláudio Martin Jonsson**

Embrapa Meio Ambiente  
Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000  
Caixa Postal 69, Jaguariúna, SP

## **Cleusa Maria Mantovanello Lucon**

Centro de Sanidade Vegetal - Instituto Biológico  
Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, Caixa Postal 7119, CEP 04014-002 São Paulo,  
SP

## **Itamar Soares de Melo**

Embrapa Meio Ambiente  
Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000  
Caixa Postal 69, Jaguariúna, SP

## **Ivan Cruz**

Embrapa Milho e Sorgo  
Caixa Postal 151, 35701-970 Sete Lagoas, MG

## **João Lúcio Azevedo**

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

## **Marcelo Rossato**

Departamento de Ciências Biomédicas e Instituto de Biotecnologia da Universidade  
de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS.

## **Marciel J. Stadnik**

BOLSISTAS DO CNPq  
Embrapa Meio Ambiente  
Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000  
Caixa Postal 69, Jaguariúna, SP

**Neiva Monteiro de Barros**

Departamento de Ciências Biológicas e Instituto de Biotecnologia da  
Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS.

**Nilton Luiz de Souza**

Departamento de Defesa Fitossanitária, UNESP  
C.P. 237, CEP 18603-970 Botucatu, SP

**Rosa Maria Valdebenito Sanhueza**

Embrapa Uva e Vinho, CEP 95700-000  
Caixa Postal 130, Bento Gonçalves, RS.

**Rose Monnerat**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, SAIN Parque Rural CP 02372,  
Brasília, DF

**Sideney Becker Onofre**

Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná - Unidade de Ensino de  
Pato Branco, Pato Branco - PR.

**Vera Lúcia S. S. de Castro**

Embrapa Meio Ambiente  
Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000  
Caixa Postal 69, Jaguariúna, SP

**Wagner Bettiol**

Embrapa Meio Ambiente  
Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000  
Caixa Postal 69, Jaguariúna, SP

**Walter Maccheroni Jr**

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

**Wellington Luiz de Araujo**

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

# PREFÁCIO

A produtividade na agricultura moderna tem sido, tradicionalmente, dependente do uso de pesticidas sintéticos, com graves problemas de ordem ambiental. O uso de estratégias biológicas oferece várias vantagens sobre os métodos de controle fitossanitário convencionais que, primariamente consistem de pesticidas de amplo espectro. É sabido, todavia, que o controle biológico é um fenômeno corriqueiro nos centros de origem das plantas cultivadas e, portanto, quando do surgimento de uma determinada epidemia ou surto de uma praga, as primeiras providências de controle deveriam ser aquelas que restabelecessem o equilíbrio natural.

O controle biológico é uma fascinante área de estudo, sendo o desenvolvimento de biopesticidas uma frustrante e difícil tarefa; mormente porque as interações microbianas são complexas e estudos sobre ecologia de agentes de biocontrole ainda são negligenciados. A produção de inoculantes e formulações microbianas são áreas carentes e pouco desenvolvidas; apesar da enorme informação científica disponível. Além disso, tem-se verificado pouco progresso no desenvolvimento de métodos precisos de isolamento de microrganismos com potencial de biocontrole e que operem em condições de campo. Muitos organismos que operam naturalmente não são cultiváveis, por isso, não são isolados em meios de cultura. A cobertura muito compreensiva de temas importantes, como por exemplo, sideróforos, controle biológico de oídio, leveduras no biocontrole, engenharia genética, dentre outros, reflete a extraordinária competência dos profissionais que contribuíram com esta publicação. A todos eles nosso reconhecimento e agradecimento.

Itamar Soares de Melo  
João Lúcio de Azevedo



# SUMÁRIO

## Capítulo 1

### Isolamento de agentes de biocontrole da rizosfera

---

*Itamar Soares de Melo*

Introdução	15
Isolamento de microrganismos da rizosfera	19
Remoção de microrganismos	20
Diluições	24
Isolamento seletivo de microrganismos	25
Monitoramento de microrganismos na rizosfera	29
Estratégias de seleção de linhagens efetivas	32
Referências bibliográficas	33
Apêndice	35

## Capítulo 2

### Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos

---

*Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza*

Introdução	41
Principais características das leveduras	44
Controle biológico de doenças obtido pelas leveduras	46
Comentários finais	51
Referências bibliográficas	54

## Capítulo 3

### Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos

---

*João Lúcio Azevedo*

*Wellington Luiz de Araujo*

*Walter Maccheroni Jr.*

Introdução	57
Microrganismos endofíticos	58
Os primeiros relatos de microrganismos endofíticos atuando no controle de insetos-praga	59
Efeitos da presença de microrganismos endofíticos em insetos	62

Endofíticos e diminuição de incidência de insetos nas plantas hospedeiras	62
Endófitos não atuando na redução de ataque de insetos em seus hospedeiros	65
Como é efetuado o controle de insetos pelos fungos endofíticos	69
Alterações genéticas e do ambiente no controle de insetos por microrganismos endofíticos	73
Ocorrência de fungos entomopatogênicos endofíticos e sua inoculação em plantas	75
Outras interações entre microrganismo endofíticos afetando o controle de insetos	77
Efeitos de fungos endofíticos em parasitóides e ectoparasitas de animais domésticos	78
Efeitos indiretos no controle de doenças por eliminação de insetos vetores e formação de galhas por insetos-praga	80
Efeitos na disseminação de sementes e proteção de plantas	82
Efeitos na fisiologia da planta hospedeira afetando o controle de insetos	80
Utilização direcionada dos microrganismos endofíticos: a tecnologia do recombinante	81
Considerações finais	86
Referências bibliográficas	87

## Capítulo 4

### Controle biológico de oídios

---

*Marciel J. Stadnik*

*Wagner Bettiol*

Introdução	95
Mecanismos de interações antagônicas	97
Antibiose	98
Hiperparasitismo	98
Indução de resistência	98
Agentes de biocontrole	99
Fungos e leveduras	99
Bactérias	110
Outros agentes de biocontrole	111
Conclusões	112
Referências bibliográficas	112

## Capítulo 5

### Controle biológico de *Rhizoctonia solani* por isolados de *Rhizoctonia* spp. não-patogênicos ou hipovirulentos

---

Ana Maria R. Cassiolato

Nilton Luiz de Souza

Introdução	117
Controle biológico	120
Hipovirulência	123
Competição por nutrientes e sítios de infecção	125
Indução de resistência	127
Degradação das camadas da cutícula	129
Produção de enzimas líticas por antagonistas	130
Sobrevivência no solo	132
Atuação como promotores de crescimento de plantas	134
Referências bibliográficas	135

## Capítulo 6

### Sideróforos e controle biológico de fitopatógenos

---

Cleusa Maria Mantovanello Lucon

Introdução	141
Sideróforos e controle biológico	143
Mecanismos gerais de transporte de ferro por microrganismos	148
Nutrição de plantas	153
Absorção de ferro pelas plantas a partir de sideróforos	156
Referências bibliográficas	158

## Capítulo 7

### Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência

---

Rose Monnerart

Alejandra Bravo

Introdução	163
Toxinas produzidas por <i>Bacillus thuringiensis</i>	164
Estrutura tridimensional das toxinas Cry	171

Mecanismo de ação das proteínas Cry	173
Resistência	187
Referências bibliográficas	192

## Capítulo 8

### Utilização do *Baculovirus* no controle da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*

*Ivan Cruz*

Introdução	201
Variabilidade genética	204
Sensibilidade de lagartas	204
Efeito da idade da lagarta	204
Efeito de temperatura	205
Efeito da formulação pó-molhável	207
Armazenamento do <i>Baculovirus</i>	208
Resultados de campo	210
Distribuição do <i>Baculovirus</i> em diferentes partes da folha	213
Efeito do estágio de desenvolvimento da planta, da dose e do intervalo de aplicação	214
Resistência ao vírus	215
Melhoramento da eficácia de <i>Baculovirus</i>	216
Produção do <i>Baculovirus</i>	218
Efeito da idade da lagarta <i>Spodoptera frugiperda</i> na produção de <i>Baculovirus</i>	222
Recomendações finais	224
Referências bibliográficas	224

## Capítulo 9

### *Nomuraea rileyi* como agente de controle microbiano da lagarta-da-soja

*Neiva Monteiro de Barros*

*Marcelo Rossato*

*Sideney Becker Onofre*

Introdução	231
Produção de enzimas extracelulares e virulência	232
Variabilidade genética entre linhagens do fungo <i>N. rileyi</i>	

isoladas de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	235
Metabólitos secundários produzidos pelo fungo	240
Conclusão	244
Referências bibliográficas	245

## Capítulo 10

### Avaliação de risco ecotoxicológico de biopesticidas – mamíferos e organismos aquáticos

---

*Vera L. de Castro*

*Cláudio Martin Jonsson*

Introdução	251
Protocolos de avaliação toxicopatológica	252
Testes da Fase I	258
Testes da Fase II	276
Estudos da Fase I	286
Perspectivas em relação a testes com organismos geneticamente modificados (OGM)	301
Referências bibliográficas	306



# 1

## ISOLAMENTO DE AGENTES DE BIOCONTROLE DA RIZOSFERA

Itamar Soares de Melo

### INTRODUÇÃO

Nas plantas estão presentes populações de microrganismos não-patogênicos, como epífitas e endófitas, ambas no filoplano e na rizosfera. A **rizosfera** é a região do solo sujeita à influência de exsudados que promovem ou inibem a atividade microbiana (Curl, 1982). A Tabela 1 apresenta, resumidamente, algumas das principais características microbianas da rizosfera. Solo rizosférico refere-se, portanto, à fina camada aderente à raiz. Porções da rizosfera são designadas, por exemplo, como **micorrizosfera**, quando da presença de fungos micorrízicos associados às raízes (Linderman, 1988), ou **actinorizosfera**, quando actinomicetos estão associados com nódulos (Torrey & Tjepkema, 1979). É um habitat ocupado por microrganismos saprófitos, cuja proliferação se dá principalmente pela abundante disponibilidade de **compostos orgânicos** facilmente assimiláveis liberados pelas raízes. Estes materiais foram classificados por Rovira (1979) da seguinte forma:

1. **Exsudados:** compostos de baixo peso molecular, como açúcares e aminoácidos.
2. **Secreções:** compostos que são liberados ativamente das células radiculares.
3. **Mucilagem vegetal**, com fontes provenientes de várias partes da raiz:
  - a) Secreções de corpos de golgi, originadas das células apicais da raiz;

- b) hidrolisados da parede celular localizados entre a coifa e a epiderme;
  - c) secreções de células epidérmicas e pêlos radiculares de células primárias;
  - d) compostos resultantes da degradação microbiana e modificação de células epidérmicas mortas.
4. **Mucigel:** material gelatinoso presente na superfície das raízes, composto de mucilagem vegetal, células bacterianas, metabólitos e material mineral e orgânico coloidal.
5. **Lisados:** material liberado através da lise de células epidérmicas mais velhas.

A composição dos exsudados é um parâmetro importante na seleção de espécies ativas que compõem a comunidade da rizosfera e, também, a diversidade dessa comunidade. Segundo Alexander (1977), a composição dos exsudados radiculares varia com as condições de crescimento da planta e seu estágio de desenvolvimento, e lista uma série de fontes de carbono liberadas pelas raízes de plantas cultivadas axenicamente, quais sejam:

- **Aminoácidos:** todos os aminoácidos de ocorrência natural.
- **Ácidos orgânicos:** ácidos acético, butírico, cítrico, fumárico, glicólico, láctico, málico, oxálico, propiônico, succínico, tartárico e valérico.
- **Pentoses e hexoses:** arabinose, desoxiribiose, frutose, galactose, glucose, maltose, manose, rafinose, raminose, ribose, sucrose e xilose.
- **Pirimidinas e purinas:** adenina, citosina, guanina e uridina.
- **Vitaminas:** p-aminobenzoato, biotina, colina, inositol, ácido nicotínico, pantotenato, piridoxina e tiamina.
- **Enzimas:** amilase, invertase, fosfatase e protease.

TABELA 1. Características microbianas da rizosfera.

<b>Composição (prevalência)</b>	Bactérias gram-negativas; bactérias não-esporulantes do tipo bastonetes
<b>Número total</b>	Muitas vezes é maior o número de bactérias na rizosfera do que em solo não rizosférico. O número de fungos é pouco afetado
<b>Requisitos nutricionais</b>	Bactérias que requerem aminoácidos são mais abundantes na rizosfera e no rizoplano do que em solos sem vegetação
<b>Produtores de antibióticos</b>	Actinomicetos produtores de antibióticos são mais abundantes na rizosfera do que em solos sem vegetação
<b>Efeitos da umidade</b>	O número de microrganismos é favorecido na rizosfera de trigo, soja e linho em solos mais secos do que em solos úmidos (Clark, 1940; Timonin, 1940)
<b>Quantificação</b>	Em geral, é encontrada e estimada uma proporção de 10:1 ou 20:1 (rizosfera: solo) de microrganismos

O termo **rizoplano** refere-se à superfície radicular que fornece uma base nutricional altamente favorável para muitos microrganismos. É um habitat especial para atividade de algumas espécies de bactérias. O rizoplano reflete mais sensitivamente o efeito da raiz sobre a microbiota do solo, sendo, no entanto, difícil distinguir o rizoplano da rizosfera. Assim, com relação aos microrganismos presentes no rizoplano, é de supor que estes sejam assim localizados, mais especificamente, aderidos em sítios da superfície radicular. Para seu isolamento são necessários, portanto, métodos especiais, como ultra-sonicação.

De acordo com Curl (1982), a rizosfera pode ser dividida em três distintas, mas inter-relacionadas, fases: 1) efeitos de raízes sobre os microrganismos habitantes do solo, 2) efeito de microrganismos da rizosfera sobre o crescimento de plantas e 3) influência da rizosfera sobre patógenos habitantes de solo. Poder-se-ia ainda acrescentar a influência de microrganismos da rizosfera na mineralização de poluentes orgânicos, principalmente herbicidas. Esse último enfoque tem influência fundamental na proteção de plantas cultivadas

contra os efeitos danosos de pesticidas. Assim, os benefícios na agricultura causados pela introdução de microrganismos do solo (*Rhizobium*, *Frankia*, *Azospirillum*, fungos micorrízicos, bactérias promotoras do crescimento de plantas e agentes de biocontrole) recaem no estabelecimento desses organismos na rizosfera, pois a colonização radicular é um pré-requisito para o sucesso de controle biológico de pragas e de fitopatógenos habitantes do solo. Weller (1988) comentou que uma colonização variável do sistema radicular por rizobactérias é a principal causa para um controle inconsistente.

O solo é o principal reservatório de agentes microbianos de controle de insetos-praga, microrganismos causadores de doenças e nematóides, sendo o solo rizosférico preferido para isolamento de bactérias colonizadoras de raízes. Dentre essas bactérias, encontram-se dois grupos que têm sido testados com razoável eficiência no controle, tanto de insetos como de fungos e bactérias fitopatogênicas. O primeiro grupo compreende espécies não-formadoras de endósporos da família *Pseudomonadaceae*, tendo como principal representante o gênero *Pseudomonas*. O segundo grupo compreende as bactérias esporulantes da família *Bacillaceae*, tendo o gênero *Bacillus* como o principal representante e as espécies *B. subtilis*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis* e *B. popilliae* como as mais estudadas em relação ao controle biológico.

A maioria dos fungos agentes de biocontrole também têm seu habitat no solo. Segundo Hall & Papierok (1982), têm-se relatado mais de 400 espécies de fungos entomopatogênicos, sendo poucas empregadas com sucesso no biocontrole, como *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, *Paecilomyces* sp., *Entomophthora* spp., *Neozygites*, *Hirsutella* spp., *Nomuraea rileyi*. Entre as espécies fúngicas antagonistas a patógenos de plantas, encontram-se *Gliocladium virens*, *G. roseum*, *Trichoderma* spp., *Talaromyces flavus*, *Coniothyrium minitans*, *Pythium oligandrum*, *Sporidesmium sclerotivorum*, *Acremonium* sp. etc.

Bactérias que infectam fitonematóides têm seus "habitats" na rizosfera; colonizam o sistema radicular e, portanto, é na rizosfera que devem ser isoladas. O representante mais estudado é *Pasteuria penetrans*, que tem sido encontrado

infectando mais de 200 espécies de nematóides (Stirling, 1991; Sayre & Starr, 1988). Um grande número de fungos ataca nematóides no solo. Exemplos de algumas espécies são: *Arthrobotrys oligospora*, *Dactylella elliopsospora*, *Momocrosporium* sp., *Nematoctonus* sp., *Paecilomyces lilacinus* etc.

## ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DA RIZOSFERA

### Coleta e transporte de amostras

Os métodos de amostragens de solos rizosféricos devem garantir que tanto o número como a atividade de microrganismos sejam pouco alterados. Do mesmo modo, devem assegurar que as subamostras sejam representativas do ecossistema em estudo. Se, no entanto, o objetivo do isolamento for a busca de microrganismos úteis, de interesse industrial ou agrícola, como por exemplo controle biológico, biorremediação, produtores de metabólitos secundários (enzimas, antibióticos, ácidos etc.), então não será necessário obter amostras representativas.

Amostras de solo rizosférico devem ser acondicionadas em sacos plásticos finos, para permitir que haja trocas gasosas ( $O_2$ ,  $CO_2$ ), evitando que o solo seque rapidamente. O transporte das amostras até o local de processamento deve assegurar a viabilidade de organismos úteis de interesse. Uma maneira eficaz é manter as amostras a baixa temperatura, evitando luz solar direta. É aconselhável transportar as amostras de solo em caixas de isopor. Deve-se ter sempre o cuidado de coletar segmentos de raiz com solo aderido. Quando não for possível, deve-se coletar todo o sistema radicular.

No caso de não ser possível o isolamento imediato após a coleta, deve-se armazenar as amostras de modo a não permitir secagem excessiva do solo, pois essa condição diminuirá o número de bactérias e poderá aumentar o número de contaminantes, como também se tornar dominante em populações de leveduras.

## Remoção de microrganismos

Como, por definição, solo rizosférico refere-se àquela fina camada de solo aderente às raízes, é esta pequena quantidade de solo que deve ser amostrada, levando-se sempre em conta que, dependendo da textura do solo e do conteúdo de umidade, essa quantidade pode variar. Se o trabalho de pesquisa necessitar relatar o número de microrganismos por grama de solo rizosférico, subamostras do solo deverão ser pesadas, secas e pesadas novamente, a fim de determinar o conteúdo de umidade.

A eficiência de recuperação de microrganismos é altamente dependente da composição química (Tabela 2) e concentração osmótica do diluente, tempo de homogeneização (Tabela 3), da temperatura, composição química do dispersante e do grau de agitação. Jensen (1968), numa série de experimentos, determinou, além de outros fatores, o efeito da homogeneização (trituração) do solo através de um "mix" sobre o número de células viáveis de bactérias.

TABELA 2. Efeito da composição química do diluente sobre o número de células viáveis de bactérias do solo.

Diluente	Número de células ( $1/g$ ) isoladas em meio extrato de solo-ágar e incubadas por 8 dias a $25^{\circ}C$
Água de torneira	$1,9 \times 10^7$
Pirofosfato 0,1%	$2,3 \times 10^7$
Solução de Ringer	$1,6 \times 10^7$
Solução de Winogradsky	$3,0 \times 10^7$

Fonte: Jensen (1968)

TABELA 3. Efeito do tempo de homogeneização sobre viabilidade de células bacterianas do solo.

Tempo de homogeneização em liquidificador	Contagem de células viáveis (g) em extrato de solo-ágar incubadas por 12 dias a $25^{\circ}C$	
	Solo 1	Solo 2
15 seg.	$7,4 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$
1min.	$8,1 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$
2min.	$8,7 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$
4min.	$8,4 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6$
8min.	$7,1 \times 10^6$	$7,1 \times 10^6$

Fonte: Jensen (1968)

Em geral, os métodos conhecidos para separar microrganismos da rizosfera incluem lavagem em frascos *Erlenmeyers* ou tubos de ensaio, agitação com ou sem esferas de vidro e sonicação. Quaisquer que sejam os métodos escolhidos para remoção de microrganismos, eles afetarão, sem dúvida, a recuperação de populações microbianas.

A maioria das bactérias presentes no solo está aderida às partículas do solo e é formalmente extraída dessas. Além disso, muito poucas dessas bactérias são cultiváveis em meios de cultura e aquelas cultiváveis compreendem somente de 0,01 – 0,1% (Faegri et al., 1977; Zuyagintsev & Zeitseva, 1979).

Os agregados do solo com diferentes diâmetros determinam, sobretudo, a distribuição e recuperação de microrganismos, mormente quando se utilizam diferentes métodos. Hattari (1973) e Hattari & Hahori (1976) desenvolveram o método da “lavagem e vibração sônica” para fracionar microrganismos localizados em pequenos poros de agregados de solo. Kilbertus & Proth (1979) e Kilbertus et al. (1982) usaram microscopia eletrônica de varredura para distinguir habitats dentro de agregados e habitats em espaços entre agregados da estrutura do solo. Com relação ao tamanho de agregados do solo, Draskiewicz (1994) estudou exaustivamente a distribuição de microrganismos em dois tipos de solo: rendizina húmica (*heavy loam*) e podzólico (*silt loam*), chegando às seguintes conclusões: o número de bactérias, actinomicetos e fungos no solo rendizina húmica, localizados ou agrupados de 3 a 1 e 0,5mm, foi maior do que em agregados medindo de 7 a 5mm. No solo podzólico, bactérias aeróbicas formadoras de esporos, habitam preferencialmente agregados medindo de 7 a 5mm.

Os procedimentos de amostragens de solos rizosféricos são, na grande maioria, arbitrários, e existem muitas maneiras para separar fisicamente solo e raízes.

O método relatado a seguir é laborioso, mas muito utilizado para isolamento de microrganismos para diversos propósitos de estudos, incluindo isolamento de linhagens efetivas no controle biológico. Inicialmente, após escolhida a área, procede-se da seguinte forma: cavar um buraco no solo ao redor da planta e, assepticamente, remover o solo a uma distância de,

aproximadamente, 1cm da raiz. Também, quando possível, a planta pode ser removida do solo. O solo aderido às raízes é coletado cuidadosamente em um recipiente esterilizado. Para isso, basta agitá-las ou coletar partículas e torrões de solo aderentes às raízes com uma pinça. É possível incluir alguns passos em diferentes fases dos procedimentos de isolamento a fim de maximizar uma maior recuperação de microrganismos, tanto de solo rizosférico como de solo não-rizosférico. O isolamento de microrganismos pode não somente ter como objetivo a busca de agentes de controle biológico, como também o monitoramento de microrganismos liberados no ambiente. Daí porque a necessidade de adotar métodos eficientes de isolamento, uma vez que certos microrganismos podem se tornar indetectáveis devido à sua morte ou por não serem extraíveis pelos métodos-padrões. Com esse propósito, Hopkins et al. (1991) incorporaram passos e procedimentos disponíveis na literatura a fim de produzir máxima dispersão de agregados do solo.

O protocolo básico consiste em agitação do solo com um detergente aniônico e uma resina de troca iônica, seguido por várias centrifugações sucessivas, em que o sobrenadante pode ser coletado e plaqueado nas diversas fases das centrifugações. Com essas modificações, os autores conseguiram aumentar o número total de células recuperadas, particularmente em solos argilosos.

A homogeneização mecânica do solo é um passo inicial importante. Kanazawa et al. (1986) encontraram maior eficiência na dispersão do solo utilizando um liquidificador. Esse procedimento foi mais útil para solos orgânicos.

Alguns autores consideram que o solo em contato com as raízes que não pode ser desagregado por agitação, mas que pode ser lavado para permitir melhor aproveitamento, é considerado solo de rizoplano. Em nosso laboratório, isolamos microrganismos do rizoplano após lavagem contínua do sistema radicular com água corrente. Em seguida, segmentos de raízes (1 grama) são colocados em banho de ultra-sonicação em tubos de ensaio contendo 9ml de solução tampão esterilizada por, aproximadamente, 30-60 segundos. Esse procedimento permite

desalojar bactérias aderidas à superfície radicular. O tratamento por ultra-sonicação não pode ser excessivo, pois pode danificar as células bacterianas. Mas então quais seriam as condições ótimas de sonicação para recuperar bactérias do solo? Ramsay (1984) recuperou 97% de *Bacillus cereus* introduzido em um solo argiloso, após ultra-sonicação (desintegrador ultra-sônico, 150W).

O autor descobriu que, 30seg. a 10.5mm são as melhores condições de ultra-sonicação para recuperar bactérias do solo. No entanto, observou-se que uma ultra-sonicação por 2min. a 5mm causou mais danos às células que 30seg. a 10.5mm. A Figura 1 sumariza os passos mais importantes para isolamento de microrganismos do solo.

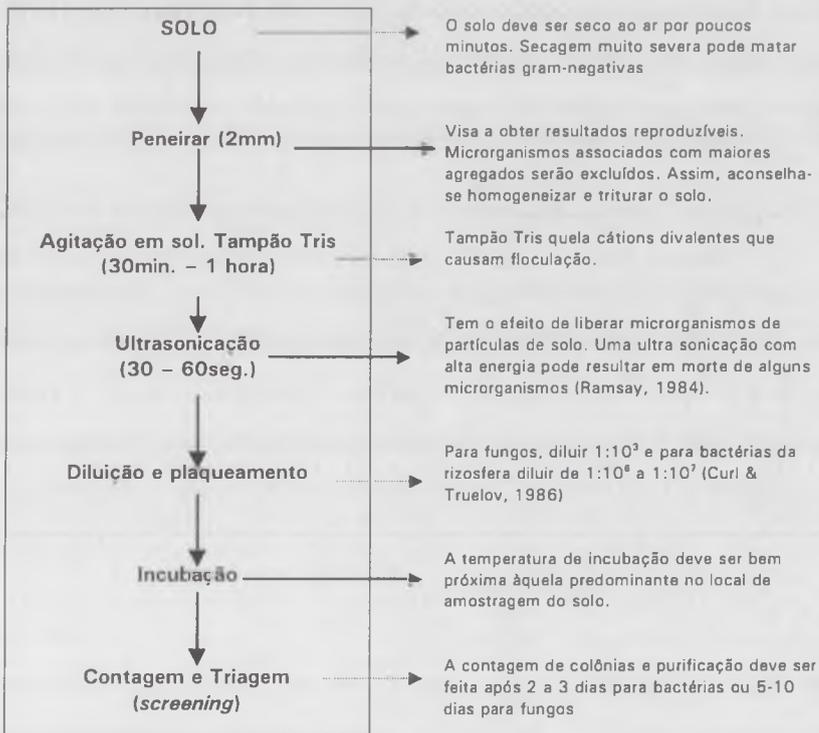


FIGURA 1. Diagrama mostrando os passos para dispersão e separação de células de agregados do solo.

Em se tratando de isolar microrganismos do rizoplano, deve-se proceder ao plaqueamento de suspensões mais concentradas, em geral as diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ .

A seleção de microrganismos eficientes no controle biológico pode ser tanto da rizosfera, do rizoplano ou do solo não-rizosférico. Desse modo, a distinção entre solo rizosférico e solo do rizoplano não teria nenhum significado. No entanto, bactérias que colonizam agressivamente e se aderem às raízes são preferidas às bactérias sem esses atributos, pois um sistema radicular colonizado eficientemente forneceria uma barreira mecânica evitando o ataque de patógenos, nematóides e insetos.

## Diluições

Dois métodos são disponíveis para estimar quantitativamente populações de microrganismos: **métodos diretos**, através da visualização por meio de microscopia de fluorescência, microscopia eletrônica ou microscopia confocal a laser e **métodos indiretos**, através do plaqueamento de células ou estimativa do número mais provável (MNP). Os métodos indiretos são seletivos para certos microrganismos, sendo essa seletividade desvantajosa quando se pretende estimar a biomassa total viável. Em se tratando da triagem (*screening*) de microrganismos úteis, o mais importante é a recuperação máxima de células viáveis. A contagem total de microrganismos através de visualização (método direto) fornece informação sobre habitats específicos de microrganismos e é importante nos estudos de efeitos de nutrientes, poluentes e também sobre o "comportamento" de certos grupos de microrganismos.

Microrganismos presentes em amostras de solo normalmente devem ser concentrados ou diluídos. Neste último caso, amostras com abundância de microrganismos são processadas a fim de encontrar concentrações apropriadas através de diluições em série, ou seja, proceder a diluições sucessivas com um diluente apropriado. Alternativamente, amostras com poucos microrganismos podem ser concentradas por centrifugação ou por filtração. Para esse fim, os filtros de policarbonato (Nuclepore) são superiores aos filtros de nitrocelulose

(Millipore), pois aqueles apresentam uniformidade dos poros.

O método de plaqueamento por diluição leva em conta somente microrganismos cultiváveis e, assim, subestima o número de microrganismos presentes na amostra. Muitas células metabolicamente ativas não formam colônias em meio sólido. Nesse caso, o método é válido para isolamento de agentes de controle biológico, cujo interesse fundamental é a produção de inoculantes em meios de cultura diversos. Além disso, o microrganismo deve ter uma boa taxa de crescimento em requisitos nutricionais simples e não-onerosos.

Diluições em série são feitas pipetando-se a amostra através de uma série de 1:10 do diluente (solução tampão) até atingir uma diluição adequada para fungos, bactérias e actinomicetos.

Das diluições, amostras de 0,1 ml são espalhadas (com alça de Drigalsky) em meios de cultura apropriados. É muito importante usar um número de placas relativamente grande, aproximadamente 5-10 por diluição, para permitir o aparecimento de colônias com atividade biológica de interesse no controle biológico.

A observação de colônias bacterianas é feita após 2 a 3 dias de incubação e após 7-10 dias, para fungos. Actinomicetos apresentam crescimento extremamente lento e, por isso, o período de incubação deve ser maior. A população microbiana é expressa através do número de microrganismos por grama de solo rizosférico.

### **Isolamento seletivo de microrganismos**

Muitos grupos de microrganismos de importância para o controle biológico de pragas, doenças e nematóides, assim como de bactérias e actinomicetos produtores de antibióticos e fixadores de nitrogênio são comuns na rizosfera. O isolamento seletivo desses microrganismos é uma tarefa fundamental, existindo, atualmente, muitos meios de cultura seletivos (Apêndice) que favorecem o isolamento e monitoramento de organismos específicos no ambiente.

Determinados microrganismos requerem elementos traços, vitaminas, aminoácidos e outros. Assim, os meios de cultura são constituídos por compostos químicos **definidos** – os chamados **meios sintéticos**. Alternativamente, quando microrganismos se desenvolvem em meios nutritivos contendo substâncias tais como peptona, extrato de levedura, extrato de malte, suco de vegetais, melação de cana-de-açúcar, extratos de carne etc., esses meios são denominados **meios complexos** ou meios **não-definidos**.

Atualmente, são conhecidos meios semi-seletivos específicos para isolamento de um grupo de organismos de interesse (Tabela 4). Outros tratamentos seletivos podem ser usados em conjunto ou separadamente dos meios seletivos, como suplementação com antibióticos ou inibidores (Tabela 5) e pré-tratamentos, como, por exemplo, aquecimento das amostras de solo, que selecionam bactérias formadoras de esporos como *Bacillus*, *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Microbispora*, *Rhodococcus* (Labeda & Shearer, 1990; Araujo, 1998). O aquecimento das amostras a 80°C por 10min. permitirá a seleção de *Bacillus*. Após o tratamento, é importante assegurar boas condições de incubação, a fim de induzir a germinação dos esporos.

TABELA 4. Meios de cultura empregados para isolamento de grupos de microrganismos.

Meios de cultura	Descrição
Meio B de King (King's B)	Isolamento de pseudomonas fluorescentes
Nutriente - ágar	Isolamento e cultivo de bactérias. Bactérias que formam esporos são isoladas, aquecendo a suspensão de solo por 10min. a 80°C.
Amido-Caseína-Ágar	Isolamento de actinomicetos. Amido e Caseína são fontes com alta proporção de carbono - nitrogênio que reduz o número de bactérias nas placas de isolamento, pois algumas destas não degradam polímeros de alto peso molecular (Gray & Williams, 1971)
Trypticase soy-ágar	Isolamento de bactérias heterotróficas
Violeta cristal-ágar	Isolamento de bactérias gram-negativas
Vermelho de metila-ágar	Isolamento de bactérias gram-positivas. Esse corante inibe bactérias que formam esporos
Celulose microcristalina-ágar	Meio Czapek-ágar, excluindo a dextrose e adicionando celulose microcristalina. Para isolamento de fungos celulolíticos e antagonísticos (degradadores de paredes de células de oomicetos)
Czapek-ágar	Usado para o isolamento e crescimento de fungos
Extrato de malte-ágar	Ideal para o cultivo de fungos, particularmente Basidiomicetos
Meio de Martin (Rosa de Bengala - Estreptomicina - Ágar)	Isolamento de fungos do solo

TABELA 5. Inibidores microbianos usados em diferentes meios de cultura para isolamento seletivos de bactérias e fungos do solo e da rizosfera.

INIBIDORES	FUNÇÃO/AÇÃO DOS INIBIDORES
Cicloheximida	Inibe fungos em geral. Cicloheximida é extremamente tóxico ao ser humano. Usar capela ao lidar com o produto (Porter et al., 1960)
Nistatina	Inibe bactérias gram-negativas, especialmente <i>Pseudomonas</i> e fungos. Atua destruindo as membranas celulares
Rosa-de-bengala	Inibe alguns fungos de crescimento rápido. De modo geral, evita o crescimento de bactérias, mas não de Actinomicetos.
Benomil, Carbendazim, Tiofanato metílico (1-10mg/L)	Inibe seletivamente alguns grupos de fungos, como a maioria dos Deuteromicetos ( <i>Verticillium dahlia</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Gliocladium</i> )
Ácido Láctico (0,1%)	Inibe bactérias em geral. Como a adição de ácidos abaixa o pH do meio, aconselha-se adicionar esse inibidor após esterilização.
Violeta cristal (10mg/L)	Inibe bactérias gram-positivas. Pode ser autoclavado junto com o meio. É extremamente tóxico, podendo ser fatal se ingerido e causar irritação nos olhos.
Dicloran (2-6-dicloro-4-nitroanilina) (25mg/L) Rifampicina (25mg/L)	Inibe o crescimento de <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i> Inibe a maioria das bactérias, porém é indicado especialmente para bactérias gram-positivas. Usado seletivamente para <i>Actinomadura</i> . Inibe a síntese de RNA (Chormonova, 1979)
Ácido nalidíxico (20mg/L)	Para bactérias em geral, porém inibe especialmente bactérias gram-negativas. Usado seletivamente para <i>Rhodococcus</i> . Inibe a síntese de RNA (Barton & Hughes 1981).
Penicilina G (1mg/L) e Polymyxina B (5mg/L)	Para isolamento seletivo de Actinomicetos. São efetivos contra bacilos e gram-positivos em geral (Williams & Davies 1965).
Kanamicina, streptomina, neomicina (100mg/L)	Inibe bactérias gram-negativas. Kanamicina (25mg/mL) e streptomina (25mg/mL) são usadas separadamente para isolamento seletivo de <i>Actinomadura</i> . Inibem a síntese de proteínas por ligar-se à subunidade ribossomal 30S (Chormonova, 1979; Lavrova, 1971)
Chloramfenicol, aureomicina Tetraciclina (25-200 mg/L)	Para inibição de bactérias em geral. São antibióticos de amplo espectum que inibem a síntese de proteínas, ligando-se à subunidade ribossomal 50S
Triton X-100 (0,01 – 0,04%)	Redutor do crescimento de <i>Fusarium solani</i> e <i>Trichoderma</i> (Van Etter & Kolmark, 1977; Melo et al., 1997)
Desoxicolato de sódio (1mg/L)	Inibe o crescimento de fungos, sem inibir, todavia, a esporulação
Dodine (650mg/mL)	Inibe fungos de crescimento rápido, particularmente Zigomicetos (Beilharz et al., 1982)

Nota: Tetraciclina e Aureomicina devem ser adicionadas ao meio após autoclavagem e Chloramfenicol pode ser autoclavado junto com o meio.

Além desses tratamentos, é possível suprimir bactérias baixando-se o pH do meio para 4,5-5,5. A título de exemplificação, pode-se aferir que a maioria das bactérias prefere valores de pHs mais alcalinos (Tabela 6), havendo, no entanto, exceções com relação a poucas bactérias acidofílicas. Os fungos, por sua vez, preferem pHs mais baixos.

Fungos contaminantes, como *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Aspergillus* são considerados um problema quando se pretende isolar bactérias e fungos antagonistas do solo, pois eles apresentam crescimento extremamente rápido. Uma maneira de inibi-los é suplementar o meio de cultura com fungicidas ou com redutores de crescimento, como Rosa-de-Bengala, oxgal e desoxicolato de sódio. Além disso, quando o objetivo é o isolamento de microrganismos específicos, o ideal é a utilização de meios semi-seletivos (Apêndice).

TABELA 6. Efeitos de pHs sobre o crescimento de diferentes grupos e espécies de bactérias.

<b>Acidófilas (pH 2,0 - 5,5)</b>
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
<i>Acetobacter</i>
<i>Lactobacillus</i>
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
<i>Pyrodictium occultum</i>
<i>Sarcina ventriculi</i>
<b>Neutrófilas (pH 6,5 - 8,0)</b>
<i>Alcaligenes</i>
<i>Pseudomonas</i>
<i>Rhizobium</i>
<i>Actinomicetos</i>
<b>Alcalifílas (pH 9,0 - 11)</b>
<i>Natronobacterium</i>
<i>Ectothiorhodospira</i>
<i>Bacillus spp.</i>

## MONITORAMENTO DE MICRORGANISMOS NA RIZOSFERA

### Obtenção de mutantes resistentes a antibióticos

Mutantes espontâneos de bactérias resistentes a antibióticos são obtidos a partir de linhagens indígenas sensíveis. Uma suspensão de células é plaqueada em meio de cultura, geralmente KB-ágar, suplementado com o antibiótico que, em geral, é de amplo espectro de ação. Alguns autores têm preferido usar em

seus trabalhos rifampicina e ácido nalidíxico nas concentrações de 100 ou 150mg/L. Os mutantes selecionados são comparados com a linhagem selvagem quanto a diferentes características de interesse, como por exemplo, taxa de crescimento, produção de metabólitos, antagonismo, promoção de crescimento etc.

Como há a possibilidade de resistência natural a esses antibióticos em bactérias na rizosfera, é aconselhável a obtenção de mutantes com dupla marca de resistência.

A resistência a antibióticos pode ser ocasionada por vários mecanismos. Um deles, uma mutação no DNA, poderia modificar o sítio-alvo de ação do antibiótico ou dos mecanismos de transporte, levando a uma ação menor do antibiótico sobre a célula. Outro mecanismo seria que um produto extra do gene poderia inativar o antibiótico ou modificar o sítio-alvo de ação do antibiótico ou o mecanismo de transporte. Uma vez obtido o mutante espontâneo, o gene mutado pode ser clonado e usado em outras bactérias. A obtenção de mutantes é, às vezes, vantajosa quando uma linhagem é refratária à transformação. No entanto, uma observação que limita a obtenção de mutantes resistentes é que, às vezes, essas mutações podem estar associadas a efeitos pleiotrópicos. Desse modo, deve-se ter o máximo cuidado em caracterizar morfológica e fisiologicamente o mutante obtido.

Uma outra preocupação quanto ao uso de mutantes resistentes a antibióticos refere-se à introdução desse gene no ambiente, contribuindo para aumentar a resistência em populações naturais (Jansson, 1995).

No solo, existem condições que favorecem o surgimento de linhagens resistentes a antibióticos e, desse modo, favorecem também a transferência de genes de resistência. Em geral, a seleção de genes de resistência no ambiente se dá por a) **atividades antropogênicas**, devido ao uso de antibióticos e b) **produção *in situ* de antibióticos** por fungos, actinomicetos e outras bactérias. Neste último caso, por exemplo, Scotti et al. (1982) e Ramos et al. (1987) observaram um número cada vez maior de linhagens de *Rhizobium* resistentes a antibióticos (Kanamicina, cloranfenicol, estreptomycin) após a calagem do solo, cuja prática

estimula a população de estreptomicetos e, assim, favorece condições seletivas para o surgimento de rizóbios resistentes.

Genes de resistência a antibióticos têm sido amplamente empregados para monitorar o comportamento de microrganismos no ambiente. Apresentam uma vantagem com relação aos marcadores moleculares que é a facilidade com que meios seletivos são usados para recuperar bactérias do solo (Williams & Davies, 1965). Marcadores seletivos dominantes usados para transformar fungos filamentosos são também genes de resistência a antibióticos e genes da *b-tubulina*, que confere resistência ao fungicida benomil.

Após a introdução de um microrganismo no ambiente, é necessário acompanhar sua dispersão, sobrevivência, atividade biológica e estrutura populacional. Esse estudo é dependente da capacidade de discernir espécies microbianas individuais. Como, então, recuperar esses microrganismos a fim de avaliar sua eficácia e segurança no ambiente? Recentemente, novas técnicas de biologia molecular não-destrutivas têm sido desenvolvidas no sentido de construir bactérias que apresentem fenótipos facilmente detectáveis. Essas bactérias, possuindo genes marcadores, são geralmente similares à bactéria selvagem, excetuando-se para o caráter introduzido. O uso de marcadores apropriados permite que a linhagem liberada seja diferenciada de quase todas as bactérias presentes em uma amostra. Os marcadores mais apropriados baseiam-se em genes repórteres e genes marcadores de seleção que, após introduzidos no microrganismo, devem permanecer estáveis. Um gene marcador deve preencher certos critérios. Um deles é que o gene a ser introduzido não deve estar ausente na população microbiana em estudo para que ele possa ser detectado em células marcadas.

Marcadores potenciais incluem genes *lac Z* (b-galactosidase), *gus* (b-glucuronidase), *xyI E* (catecol-2,3-dioxigenase), *lux* (luciferase) e *gfp* (proteína fluorescente verde), entre outros. Sobre marcadores moleculares utilizados no estudo de monitoramento ambiental, o leitor pode consultar as revisões de Burlage (1997), Chalfie et al. (1994), Atlas et al. (1992), Drahos et al. (1986) e Lindow (1995).

## Estratégias de seleção de linhagens efetivas

A seleção de microrganismos da rizosfera visando à sua utilização no controle biológico essencialmente se baseará nas seguintes estratégias: a) determinar o ciclo de vida dos patógenos e processo de patogenicidade; b) levantamento de microrganismos conhecidos com atividade contra o patógeno em estudo; c) inspecionar microrganismos em solos supressivos ou outras fontes; d) desenvolver métodos eficientes de enriquecimento e e) desenvolver métodos de triagem de microrganismos que apresentem potencial de biocontrole. Os métodos de triagem devem, preferencialmente, ser simples, rápidos e de baixo custo.

Os itens **c** e **d** referem-se, mais especificamente, à busca de linhagens e serão objeto de interesse desse capítulo. Linhagens efetivas usadas no controle de doenças de raízes devem colonizar eficientemente o sistema radicular. Os pesquisadores outrora obtinham microrganismos úteis por meio de tentativas e erros, sem conhecerem as características biológicas de interesse desses organismos. Assim, o desenvolvimento de métodos de triagem de microrganismos e técnicas de cultivo auxiliam, hoje, com passos seguros para se conseguir organismos de interesse.

Uma estratégia básica é isolar microrganismos de raízes de plantas que se desenvolvem em solos infestados com o patógeno-alvo. Nesse caso, as linhagens são adaptadas e podem competir com a microbiota na rizosfera. Segundo Cook et al. (1987), microrganismos adaptados a raízes sadias podem não ser adaptados às raízes infectadas. Esta é uma assertiva controvertida, já que muitos agentes de biocontrole foram isolados de raízes sadias e também de outros habitats totalmente diferentes do ambiente das raízes. Uma outra possibilidade é isolar linhagens da rizosfera de plantas sadias crescendo em solos provenientes de campos nos quais o patógeno está presente, mas sem causar danos às plantas a despeito das condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença. Solos com essas características são chamados "**supressivos**".

Esforços têm sido feitos para isolar, empiricamente, microrganismos como bioprotetores de plantas. A triagem de linhagens com potencial de

biocontrole deve ser feita, quando possível, em testes *in vivo*, em condições ambientais similares àquelas onde o antagonista deverá ser aplicado. Uma das condições de importância fundamental é a utilização de solo natural nos bioensaios. No caso de se avaliar um grande número de microrganismos, uma seleção inicial pode ser feita sem utilização de repetições. Nesta etapa, eliminam-se linhagens inferiores, incluindo aquelas fitopatogênicas.

Métodos indiretos também são úteis na busca de bioprotetores. Melo et al. (1999) identificaram fungos antagonistas a *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica* através do isolamento em meio de cultura contendo celulose microcristalina ou micélio do patógeno como únicas fontes de carbono. Os fungos isolados nesse estudo, todos do gênero *Trichoderma*, são hiperprodutores de celulase, enzima que apresenta atividade antifúngica. Como se sabe, a parede celular dos Oomicetos (*Phytophthora* e *Pythium*) é constituída de, aproximadamente, 75-90% de glucana e 17-25% de celulose (Lima et al., 2000).

Baseado nesse conhecimento, Hsu & Lockwood (1975) descreveram um meio contendo quitina coloidal para o isolamento de actinomicetos quitinolíticos. Embora os autores não tivessem testado os actinomicetos como agentes de biocontrole, é possível que microrganismos que digerem a parede celular de fitopatógenos contendo quitina (*Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*) possam ser, assim, isolados e sejam eficazes como bioprotetores.

Melo & Machado (dados não publicados) aumentaram as chances de obter microrganismos quitinolíticos através da suplementação do solo com quitina. Solos naturais suplementados com quitina (0,1%) foram plantados com milho, sob condições de casa-de-vegetação. Trinta dias após a semeadura, o solo rizosférico foi coletado e processado para o isolamento de bactérias e actinomicetos. Solos não-suplementados com quitina apresentaram número menor de microrganismos quitinolíticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. *Introduction to soil microbiology*. New York: John Wiley, 1977. 467 p., 1977.
- ATLAS, R.M.; SAYLER, G.; BURLAGE, R.S.; BEJ, A.K. Molecular approaches for environmental monitoring of microorganisms. *BioTechniques*, v. 5, p. 706-717, 1992.
- BARTON, M.D.; HUGHES, K.L. Comparison of three techniques for isolation of *Rhohococcus* (*Corynebacterium*) *equi* from contaminated sources. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 13, p. 219-221, 1981.

- BEILHARZ, V.C.; PARBERY, D.G.; SWART, H.C. Dodine: a selective agent for certain soil fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 79, p. 507-511, 1982.
- BURLAGE, R.S. Emerging technologies: bioreporters, biosensors and microprobes. In: HURST, C.J.; KNUDSEN, G.R.; McNERNEY, M.J.; STETZENBACK, L.D.; WALTER, M.V., ed. *Manual of environmental microbiology*. Washington: ASM Press, 1997. p.115-123.
- CAMPBELL, R.; GREAVES, M.P. Anatomy and community structure of the rhizosphere. In: LYNCH, J.M., ed. *The rhizosphere*. Chichester: John Wiley & Sons, 1990. p.11-34.
- CASIDA, L.E.; KLEIN, D.A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. *Soil Science*, v.98, p.371, 1964.
- CHALFIE, M.Y., TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W.W.; PRASHER, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, v. 263, p. 802-805, 1994.
- CHASE, A.R.; OSBORNE, L.S.; FERGUSON, V.M. Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. *Florida Entomologist*, v. 69, p. 285-292, 1986.
- CHROMONOVA, N.T. Isolation of *Actinomadura* from soil samples on selective media with kanamycin and rifampicin. *Antibiotiki*, v. 23, p. 22-26, 1979.
- CLAUS, D.; BERKELEY, R.C.W. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: SNEATH, P.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G., ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. p.965-1599.
- CURL, E.A. The rhizosphere: relation to pathogen behavior and root disease. *Plant Disease*, v. 66, p. 624-630, 1982.
- CURL, E.A.; TRUELOV, B. *The rhizosphere*. New York: Springer-Verlag, 1986.
- DRAHOS, D.J.; HEMMING, B.C.; McPHERSON, S. Tracking recombinant organisms in the environment: beta-galactosidase as a selectable non-antibiotic marker for fluorescent pseudomonads. *BioTechniques*, v. 4, p. 439-444, 1986.
- DRAZKIEWICZ, M. Distribution of microorganisms in soil aggregates: effect of aggregate size. *Folia Microbiologica*, v. 39, p. 276-282, 1994.
- FRAEGRI, A.; TORSVIK, V.L.; GOKSOYR, J. Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacteria and fungi by rapid fractionated centrifugation techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 9, p. 105-112, 1977.
- HALL, D.M.; PAPIEROK, R. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, v. 26, p. 379-407, 1988.
- HATTARI, T. *Microbial life in the soil*. New York: Marcel Dekker, 1973. p.262-312.
- HATTORI, T.; HATTARI, R. The physical environment in soil microbiology: an attempt to extend principles of microbiology to soil microorganisms. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, v. 4, p. 423-461, 1976.
- HOMECHIN, M. *Potencial e emprego de isolados brasileiros de Trichoderma harzianum para controle de patógenos de soja*. Piracicaba: ESALQ/USP, 1987. 186p. Tese de Doutorado.
- HOPKINS, D.W.; MACNAUGHTON, S.J.; O'DONNELL, A.G. A dispersion and differential centrifugation technique for representatively sampling microorganisms from soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 23, p. 217-225, 1991.
- 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.
- JACKSON, T.A.; HUGER, A.M.; GLARE, T.R. Pathology of ambar disease in the New Zealand grass grub *Costelytra zealandia* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 61, p. 1-8, 1993.
- JANSSON, J.K. Tracking genetically engineered microorganisms in nature. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 6, p. 275-283, 1995.
- JENSEN, V. Studies on the microflora of danish beech forest soils. I. The dilution plate count technique for the enumeration of bacteria and fungi in soil. *Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*, v. 116, n.11, p. 13, 1952.
- JENSEN, V. The plate count technique. In: GRAY, T.R.G.; PARKINSON, D. eds. *The ecology of soil bacteria*. Toronto: University of Toronto Press, 1968. p. 158-170.
- KANAZAWA, S.; TAKEISHIMA, S.; OHTA, K. Effects of waring blender treatment of the counts of soil microorganisms. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 32, p. 81-89, 1986.
- KILBERTUS, G.; PROTH, J. Observation d'un sol foerster (rendzina) en microscopie electronique. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 25, p. 943-946, 1979.
- KILBERTUS, G.; SCHWARTZ, R.; ALBERTI, G. La repartition quantitative des microorganismes dans les sols de forêts (chênes, pins). Indices d'activité microbiologique. *Revue d'Ecologie et Biologie du Sol*, v. 19, p. 513-523, 1982.
- KING, A.D.; HOCKING, A.C.; PITT, J.I. Dicloran rose-bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 37, p. 959-964, 1979.
- KING, J.V.; CAMPELL, J.J.R.; EAGLES, B.A. The mineral requirement for fluorescein production. *Canadian Journal Research*, v. 26, p. 514-519, 1954.
- LABEDA, D.P.; SHEARER, M.C. Isolation of actinomycetes for biotechnological application. In: LABEDA, D.L. ed. *Isolation of biotechnological organisms from nature*. New York: McGraw-Hill, 1990. p. 1-20.
- LAVROVA, N.V. Selective media with streptomycin for isolation of new antibiotic producers. *Antibiotiki*, v. 16, p. 781-786, 1971.
- LIMA, L.H.C.; DE MARCO, J.L.; FELIX, C.R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. ed. *Controle biológico*, v.2. Jaguaruina: Embrapa Meio Ambiente, 2000.
- LINDERMAN, R.G. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology*, v. 78, p. 366-370, 1988.
- LINDOW, S.E. The use of reporter genes in the study of microbial ecology. *Molecular Ecology*, v. 4, p. 555-566, 1995.
- LITTMAN, M.L. A culture medium for the primary isolation of fungi. *Science*, v. 106, p. 109-111, 1947.
- LUI, Z.Y.; MILNER, R.J.; MCRAE, C.F.; LUTTON, G.G. The use of dodine in selective media for isolation of *Metarhizium* spp from soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 62, p. 248-251, 1993.

- 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.; LEVANTEZE, K.C.; MENDES, M.D.L.; FEICHTENBERGER, E. Seleção de linhagens celulolíticas de *Trichoderma* spp. com ação antagonística contra *Phytophthora nicotiana* var. parasitica, agente causal da gomose dos citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Santos, SP. *Anais...* São Paulo: SBM, 1999. p.294
- MITCHELL, D.J.; KANNWISCHER-MITCHELL, M.E.; DICKSON, D.W. A semi-selective medium for the isolation of *Paecilomyces lilacinus*. *Journal of Nematology*, v. 19, p. 255-256, 1987.
- PAPIEROK, B.; HAJEK, A.E. Fungi: entomophthorales. In: LACEY, L. ed. *Manual of techniques in insect pathology*. New York: Academic Press, 1997. p.187-212. (Biological Techniques Series).
- PORTER, J.N.; WILHELM, J.J.; TRESNER, H.D. A method for the preferential isolation of actinomycetes from soil. *Applied Microbiology*, v. 8, p. 174-178, 1960.
- RAMOS, M.L.; MAGALHÃES, N.F.M.; BODDEY, R.M. Native and inoculated rhizobia isolated from field-grown *Phaseolus vulgaris*: effects of lining and acid soil on antibiotic resistance. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 19, p. 179-185, 1987.
- RAMSAY, A.J. Extraction of bacteria from soil: efficiency of shaking and ultrasonication as indicated by direct counts and autoradiography. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 16, p. 475-481, 1984.
- ROTHFUSS, F.; BENDER, M.; CONRAD, R. Survival and activity of bacteria in a deep, aged lake sediment (lake constance). *Microbial Ecology*, v. 33, p. 69-77, 1997.
- ROVIRA, A.D. Zones of exudation along plant root and spatial distribution of microorganism in the rhizosphere. *Pesticide Science*, v. 4, p. 361-366, 1979 ou 1973?.
- SAYRE, R.M.; STARR, M.P. Bacterial diseases and antagonisms of nematodes. In: POINAR, G.O.; JANSSON, H.B., ed. *Diseases of nematodes*. Boca Raton: CRC Press, 1988. v. 1, p. 69-101.
- SCOTTI, M.R.M.M.L.; SÁ N.M.H.; VARGAS, M.A.T.; DÖBEREINER, J. Streptomycin resistance of *Rhizobium* isolates from Brazilian cerrados. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 54, p. 733-738, 1982.
- SORHJIN, R.; TORSVIK, V.L.; GOKSOYR, J. Phenotypical divergences between population of soil bacteria isolated on different media. *Microbial Ecology*, v. 17, p. 181-192, 1989.
- STARR, M.P.; GRIMONT, P.D.A.; GRIMONT, F.; STARR, P.B. Caprylate-thallus agar medium for selectively isolating *Serratia* and its utility in the chemical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 4, p. 270-276, 1976.
- STIRLING, G.R. Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects. Wallingford: Commonwealth Agricultural Bureaux International, 1991.
- TORREY, J.G.; TJEPKEMA, J.D. Symbiotic nitrogen fixation in actinomycete – nodulated plants. *Botanical Gazette*, v. 140 (suplemento), 1979.
- VAN ETTER, H.D.; KOLMARK, H.G. Modifying the growth habit of the filamentous fungus *Fusarium solani* to facilitate replica plating techniques. *Canadian Journal of Botany*, v. 55, p. 848-851, 1977.
- ZUBERER, D.A. Recovery and enumeration of viable bacteria. In: WEAVER, R.W.; ANGLE, J.S.; BOTTOMLEY, P.S. ed. *Methods of soil analysis*, part 2. *Microbiological and biochemical properties*. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 119-158.
- ZUYAGINTEV, D.G.; ZEITSVA, V.E. Dynamic of the numbers of soil bacteria as determined by different methods. *Mikrobiologiya*, v. 48, p. 747-756, 1979.
- WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Verhandlungen für Phytopathologie*, v. 26, p. 379-407, 1988.
- WILLIAMS, S.T.; DAVIES, F.L. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *Journal of General Microbiology*, v. 38, p. 251-261, 1965.

## APÊNDICE

### Meios seletivos e semi-seletivos para isolamento de microrganismos

- Meio seletivo para *Beauveria* (Chase et al., 1986)

2%	Infusão de aveia
550mg/ml	Dodine (monoacetato de n-dodecilguanidina)
5mg/ml	Clorotetraciclina
10mg/ml	Cristal violeta
15g	ágar

- Meio seletivo para *Paecilomyces lilacinus* (Mitchell et al., 1987)

3,9%	Potato-dextrose-ágar
1-3%	NaCl
0,1%	Tergitol
500mg/ml	Pentacloronitrobenzeno
500mg/ml	Benomil
100mg/ml	Sulfato de estreptomicina
50mg/ml	Clorotetraciclina
15g	ágar

- Meio seletivo para *Metarhizium* (Lui et al., 1993)

1%	Glucose
1%	Peptona
1,5%	Oxgal
10mg/ml	Dodine
250mg/ml	Actidione
500mg/ml	Cloramfenicol
15g	ágar

- Meios para isolamento de fungos da ordem Entomophthorales (Zigomicotina)

Espécies de Entomophthorales entomopatogênicas geralmente requerem para seu crescimento meios de cultura com nutrientes. Os meios mais comuns usados para isolamento, portanto, contêm gema de ovo e/ou suplementação com vitaminas e aminoácidos. Além disso, algumas espécies de Entomophthorales são isoladas somente em meios de cultura contendo tecido do inseto hospedeiro.

**Meios contendo gema de ovo:** diversos meios de cultura simples, como por exemplo Sabouranal-maltose-ágar, Sabourand-dextrose-ágar, peptona-ágar podem ser suplementados com gema de ovo e leite (Papierok & hajek, 1997).

**Meio Sabourand-dextrose-ágar** suplementado com gema de ovo e leite (Papierok & Hajek, 1997)

80% de meio sabourand-dextrose-ágar

20% de uma mistura de gema de ovo (40%) e leite (60%).

os ingredientes são preparados separadamente, da seguinte maneira:

- o meio sabourand-ágar (45g/l) é colocado em um Erlenmeyer com água destilada e esterilizado a 120°C por 30min. O meio é mantido a 50-60°C,
- para o meio dextrose-extrato de levedura-ágar, a dextrose (20g/l), o extrato de levedura (10g/l), o ágar (20g/l) e a água destilada são esterilizados a 120°C por 30min. e mantidos a 50-60°C,
- para o leite: esterilizar todo o leite a 120°C por 30min. e mantê-lo à temperatura ambiente,

- para a gema de ovo: coloque ovos frescos em uma mistura de 90% de álcool (200ml) e 2% de hipoclorito de sódio (800ml) para esterilização superficial. Quebre os ovos, remova as gemas e coloque-as em um cilindro graduado esterilizado,
- adicione o leite às gemas e bata o conteúdo até formar uma mistura homogênea,
- verta a mistura no Erlenmeyer contendo dextrose-extrato de levedura-ágar no Erlenmeyer contendo Sabourand-ágar e agite,
- imediatamente verta o meio em placas de Petri.

- Meio seletivo para *Trichoderma* (meio de Martin modificado por Homechin, 1987)

1g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
0,5g	$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
10,0g	Dextrose
5,0g	Peptona
0,03g	Rosa de Bengala
0,18g	Agrimicina
0,20g	PCNB
15g	Ágar
1.000ml	Água destilada
pH	6,0

- Meio geral para isolamento de bactérias (meio de Thorton, Sorhein et al., 1989)

2,5g	glicose
0,1g	$\text{K}_2\text{HPO}_4$
0,5g	$\text{NH}_4\text{NO}_3$
0,2g	$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,1g	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,1g	NaCl
0,1g	$\text{Fe}(\text{Cl}_3) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
15g	Ágar
1.000ml	Água
PH 7,3	

Nota: para bactérias gram-negativas deve-se acrescentar cristal violeta na proporção de 5mg/ml e 100mg/ml de cicloheximida e para isolamento de *Bacillus* spp., deve-se submeter as amostras a um choque térmico, à temperatura de 80°C por 10min. (Rothfuss et al., 1997).

- Meio seletivo para *Serratia* spp. (Caprilato-talos-agar-TCA, Starr et al., 1976)

## Solução A

0,15g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
0,68g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2,61g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1.0ml	CaCl <sub>2</sub>
10,0ml	solução de elementos traços*
1,1ml	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> .COOH (ácido n-octanoico-ácido caprílico)
0,25g	Ti <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (sulfato de Tálíio)
0,1g	extrato de levedura
500ml	água destilada (adicionar a água a cada ingrediente, dissolvendo completamente cada um)
15g	ágar
PH 7.2	

## Solução B

7.0g	NaCl
1.0g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
15g	ágar

**Nota:** esterilizar as soluções A e B separadamente e misturar as duas soluções assepticamente sob agitação.

## \* Elementos traços:

1,96g H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
 0,055g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
 0,0287g Zn SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
 0,0223gmm SO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O  
 0,0025g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O  
 0,003g Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O  
 0,0062g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
 1000ml água destilada

Solução pode ser preservada a 4°C.

**Nota:** nesse meio (TCA), colônias de *Serratia* crescem dentro de 4-6 dias, a 27°C. Colônias cremosas, coloridas, com 2mm de diâmetro podem, então, ser transferidas para meios especiais para completa identificação. No meio adonitol-ágar, *S. entomophila* produz colônias amarelas e *S. proteamaculans* colônias azuis/verdes, após incubação a 30°C por 24 horas (Jackson et al., 1993).

**Atenção:** sulfato de tálíio é extremamente tóxico, se inalado. Evitar contato com a pele.

- Meio seletivo para isolamento de bactérias fluorescentes (King et al., 1954 )

200g	proteose peptona n° 3
10,0g	Glicerol
1,5g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anidro
1,5g	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
15g	Ágar
pH 7.2	

**Nota:** A formação de fluorescência por *Pseudomonas* spp. depende do tipo de peptona utilizada na preparação do meio. King et al. (1954) demonstraram que o conteúdo de fosfato, juntamente com a reação alcalina simultânea do meio, é responsável pela formação de pigmento, geralmente amarelo-esverdeado. Observaram também que a formação de fluorescência é estimulada intensamente, se estão presentes no meio íons magnésio e glicerina. É importante que, após a autoclavagem do meio, não haja queda do pH, o que reduz a formação da fluorescência.

- Meio para isolamento de *Bacillus thuringiensis* e *B. cereus* (Claus & Berkeley, 1986)

1.0g	peptona
10,9g	D-manitol
0,1g	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (sulfato de magnésio heptahidratado)
2,0g	NaCl (cloreto de sódio)
2,5g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (fosfato de sódio)
0,25g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (ortofosfato de potássio)
0,12g	azul de bromotimol
15g	Ágar
1000ml	água destilada

Adicionar os seguintes ingredientes ao meio ainda morno (aproximadamente 50°C):

- 5,0ml de C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Na 20% (piruvato de sódio) esterilizado em filtro Millipore.
- 100 unidades/ml de polimixina (esterilizada em filtro)
- 5,0ml de emulsão de gema de ovo (oxid SR 47).

**Nota:** nesse meio, colônias de *B. cereus* são levemente rizóides, apresentam uma coloração azul turquesa e são geralmente circundadas por um precipitado semelhante à gema de ovo. *B. thuringiensis* é diferenciado de *B. cereus* pela formação de cristais.



# 2

## LEVEDURAS PARA O BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS

Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza

### INTRODUÇÃO

O biocontrole de patógenos tem sido prioritariamente feito com a introdução de organismos antagonistas no alvo a ser protegido. Entre os utilizados, alguns pesquisadores têm preferido as leveduras, especialmente quando o objetivo dos trabalhos é a proteção de frutos destinados ao consumo *in natura*. A justificativa desta escolha relaciona-se ao fato desses organismos terem sua ação antagônica vinculada mais à competição que à antibiose. Assim, considera-se que as leveduras não são, geralmente, produtoras de antibióticos, elementos considerados contaminantes químicos nos vegetais.

As leveduras fazem parte do ambiente no qual desenvolvem-se as plantas, da microbiota epífita e endófitas, sendo encontradas também no solo. São ativas consumidoras de nutrientes, efetivas como colonizadoras de ferimentos e, em alguns casos, indutoras da resistência do hospedeiro. Desta forma, estes organismos agem no controle das doenças preferencialmente como protetores da infecção, e não como curativos.

### As leveduras nas plantas e no ambiente

Os fatores mais importantes que governam as variações na composição da microbiota epífita das plantas são os que também causam situações de estresse. Nestas condições, ocorrem mudanças severas na disponibilidade de

nutrientes e de energia, elementos necessários para o estabelecimento dos microrganismos. O grupo de organismos dominantes em um momento poderá continuar dominando se for mais competitivo e sua substituição por outro dependerá do efeito das mudanças nutricionais e do ambiente sobre sua população. Além da capacidade de suportar essas mudanças no ambiente, os organismos também deverão ser resistentes às ações de antagonismo entre as espécies, fato que governa a sobrevivência desses grupos, principalmente em substratos ricos em nutrientes (Boddy & Winpenny, 1992).

As leveduras e os fungos leveduriformes predominam nas gemas e nas folhas em termos de biomassa e, nesses locais, sobressaem as leveduras vermelhas dos gêneros *Sporobolomyces* e *Rhodothorula* e as brancas do gênero *Cryptococcus* (Park, 1982; Keener, 1945).

O número de organismos por grama de peso fresco das folhas se modifica com a idade, o tipo de folha e a época do ano. Pode atingir até  $10^7$  unidades formadoras de colônias(ufc)/cm<sup>2</sup> em algumas plantas. Por outro lado, enquanto esse número é variável na parte aérea, no solo a tendência geral é da população se manter constante.

A superfície de flores e de frutos é conhecida como substrato apropriado para leveduras. A disseminação desses organismos na parte aérea das plantas é feita principalmente por insetos. As comunidades de leveduras nas plantas são principalmente do grupo dos basidiomicetos e seus anamorfos (*Cryptococcus* e *Rhodothorula*) e também leveduras pretas, como o ascomiceto *Aureobasidium pullulans*.

Estudos da associação de leveduras a fruteiras têm sido realizados no Brasil. Santos et al. (1996) constataram comunidades de leveduras em flores e frutos tropicais e citaram a ocorrência de vários gêneros nos quais constavam *Cryptococcus*, *Rhodothorula* e *Sporobolomyces*. Nas flores e nos frutos imaturos de cajueiro, umbuzeiro e mangueira verificou-se que predominam leveduras basidiomicetos e nos maduros, o ascomiceto *Cr. laurentii* e seu anamorfo *Metschnikowia pulcherrima*. No estudo dos frutos maduros e com podridões, os autores detectaram leveduras dos gêneros *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Pichia* e

*Candida*. Levantamentos da população de leveduras nas flores do abacaxi, estudadas no Brasil, constataram as leveduras pretas *Cryptococcus* e *Rhodothorula* spp., mas nos frutos maduros foram encontradas *Candida guilliermondii* e nos senescentes, esta última espécie, além de *Candida krusei* e *Kloeckera*.

Levantamentos feitos em frutos com maturação avançada constataram que algumas leveduras podem colonizar seus tecidos como patógenos oportunistas. As espécies identificadas nessas condições são *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

As leveduras também podem fazer parte da seqüência de organismos que compõem a população de tecidos internos de espécies das árvores e, nos estudos disponíveis, constata-se que *Cr. laurentii* e *Rh. glutinis* são as espécies mais freqüentes. Nesse ambiente, as espécies predominantes variam de acordo com as épocas e o tipo de planta estudada, sendo observado que *Pichia* sp. (*Hansenula*) ocorre principalmente no fim do verão e *Candida sake* e outras espécies de *Candida* são mais freqüentes no início do verão (Sorensen et al., 1991).

A microbiota que compõe os exsudatos de árvores florestais contém leveduras e os isolados das espécies encontradas neste ambiente são adaptados às características nutricionais desses produtos. As leveduras constatadas nesse meio são espécies de *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Debaryomyces* e *Cryptococcus*, entre outras (Lachance et al., 1982).

Nos componentes da população do solo, mesmo em quantidade menor que bactérias, podem ser encontradas leveduras, e os principais gêneros encontrados nesse ambiente são *Cryptococcus*, *Torulaspota*, *Tremella* e *Trichosporon*.

A população de leveduras nas sementes é considerável e alguns trabalhos têm mostrado que, dependendo dos componentes e do tipo de semente, esses organismos poderão exercer ações de inibição ou de estímulo à formação de aflatoxinas pelos fungos filamentosos associados às sementes. Dessa forma, nos estudos feitos para seleção de agentes de biocontrole de patógenos de

sementes, essa característica deve ser pesquisada (Bjönberg & Schnürer, 1993).

## Principais características das leveduras

A produção microbiana de enzimas é de importância comercial e as leveduras são o grupo de organismos mais citado nos estudos de aproveitamento industrial desses metabólitos (Linardi & Machado, 1990). O potencial de produção de enzimas, porém, é dependente da característica de um determinado isolado mais do que de grupos de leveduras (Machado & Linardi, 1990).

Alguns grupos de leveduras têm boas condições de competitividade e podem suportar condições de estresse. Assim, espécies de *Candida* sobrevivem em valores de pH baixo e altas concentrações de sal, e espécies de *Debaryomyces* podem estar presentes em condições de até 24% de cloreto de sódio (Boddy & Winpenny, 1992).

A filosfera é colonizada por vários tipos de organismos saprófitos e patogênicos e pode ser dividida em 5 grupos principais: leveduras vermelhas e rosas, leveduras brancas, fungos leveduriformes, fungos filamentosos e bactérias. Em geral, os brotos novos são colonizados por leveduras e bactérias, enquanto que os fungos filamentosos aumentam nas folhas maduras (Blakeman & Fokkema, 1982).

Na colonização das folhas por microrganismos, a produção de substâncias antibacterianas pode ser fator de mudança e o efeito inibidor desses compostos sobre outros componentes da comunidade será um fator de competitividade. A produção de antibióticos por fungos leveduriformes e por leveduras, tais como *A. pullulans* e por *Sporobolomyces*, respectivamente, foi inicialmente demonstrada por Baigent & Ogawa (1960). Contudo, outros autores consideram que as leveduras não são importantes como produtoras de antibióticos. As diferenças de métodos utilizados nos diferentes trabalhos podem ser a causa das divergências nos resultados dos autores e, neste sentido, Mc Cormack et al. (1994) concluíram que alguns isolados, somente quando mantidos em condições de exaustão de nutrientes e, portanto, de aumento da demanda de competitividade, apresentavam produção importante desse tipo de metabólito.

A produção de metabólitos voláteis, tal como o acetato de etila, por algumas estirpes de leveduras, foi relatada no caso de *P. anomala* (Björnberg & Schnürer, 1993). A ação desse produto é importante para o manejo das doenças, pois inibe o crescimento e a germinação de esporos de fungos fitopatógenos, diminuindo sua sobrevivência. Williamsom & Fokkema(1985) demonstraram que leveduras epífitas podem interferir no sucesso da penetração e conseqüente infecção nas folhas do milho pelos apressórios de *Colletotrichum graminicola*.

Outros fatores associados à boa adaptação das leveduras nas folhas incluem a utilização, por esses organismos, dos componentes da cutícula, a adaptação morfológica aos diferentes tipos de superfície dos vegetais e à tolerância a poluentes, aos óleos essenciais dos vegetais e às fitoalexinas.

O antagonismo entre saprófitos e patógenos na filosfera foi discutido por Blakeman & Fokkema (1982), entre outros. A competição por nutrientes parece ser o principal mecanismo que governa as interações nesse ambiente. Esse mecanismo é especialmente efetivo para diminuir a população de patógenos necrotróficos que dependem da presença de nutrientes para iniciar a sua germinação (Blakeman & Brodie,1977).

Essa disponibilidade de nutrientes no filoplano dependerá fundamentalmente da população de leveduras. Assim, quando a população desses organismos for reduzida, ocorrerá um excesso de nutrientes que poderá estimular a germinação dos patógenos e a diminuição da toxicidade de alguns fungicidas, como thiram.

Isto evidencia uma série de interações complexas na filosfera entre saprófitos, patógenos, nutrientes e agroquímicos (Dickinson, 1973).

Visto que a presença de pólen na superfície das plantas significa um aumento na disponibilidade de nutrientes e estímulo para os patógenos, as leveduras, por sua função de consumo efetivo de nutrientes, atuam como reguladoras do equilíbrio na superfície.

O uso de fungicidas para o controle das doenças nas culturas poderá eliminar parte da população que apresenta características de grande competição com outros componentes da microbiota epífita e, conseqüentemente, aumentar

a disponibilidade de nutrientes no filoplano. A supressão de leveduras ou de fungos leveduriformes, como *Aureobasidium pullulans*, epífita importante nas folhas e outros órgãos da planta pelo benomil, por exemplo, poderá acarretar esse efeito (Fokkema, 1973).

Por outro lado, o uso contínuo de fungicidas de ação específica, como o carbendazim, poderá inicialmente reduzir drasticamente as leveduras, mas, no fim de um ciclo vegetativo com tratamentos sucessivos, essa população poderá apresentar crescimento pelo surgimento de estirpes resistentes (Fokkema, 1988). Nas relações entre leveduras e fungicidas há ainda a possibilidade de que esses organismos sejam capazes de utilizar os produtos aplicados e, portanto, o crescimento populacional de indivíduos com esta capacidade causará a redução de nutrientes e a inibição da ação de outros fungicidas.

Os estudos do efeito secundário de pesticidas sobre a microbiota epífita ainda são reduzidos, sendo maior a falta de informação do impacto de herbicidas e inseticidas (Andrews, 1981). Uma discussão sobre esses efeitos, com ênfase nos fungicidas, foi apresentada por Valdebenito Sanhueza (1997).

### **Controle biológico de doenças obtido pelas leveduras**

O controle com leveduras de patógenos, que afetam a parte aérea das plantas ou os frutos em pré ou pós-colheita, tem sido demonstrado por diversos autores. As vantagens e limitações desta estratégia de controle do segundo grupo de doenças, quando comparada com o controle químico, foram discutidas por Eckert (1991). Este autor comentou que no geral a diminuição de perdas causadas por patógenos colonizadores de ferimentos com antagonistas é promissora, mas é de uso limitado no caso de patógenos que causam infecções latentes. Entre os gêneros mais citados incluem-se *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* e *Rhodotorula* (Tabela 1). A maior parte dos isolados antagonísticos a patógeno das plantas tem sido obtidas da microbiota epífita associada às flores e aos frutos (Goyal & Spotts, 1996; Piano et al., 1997).

A capacidade das leveduras usadas no biocontrole de se desenvolver e competir com o patógeno nas condições do ambiente em que a doença ocorre é

decisiva para a utilidade do organismo na proteção dos vegetais. Assim, Roberts (1990) demonstrou que no controle de doenças de frutos frigorificados causadas por *Mucor*, *Botrytis* e de *Pezizula* o maior controle era obtido nas frutas colocadas em temperatura baixa, após o tratamento com espécies de *Cryptococcus*. Nessas condições, após o tratamento das frutas feito em pós-colheita com o antagonista, ocorre a diminuição da taxa de desenvolvimento dos patógenos, o estabelecimento efetivo do antagonista no local de penetração, ou seja, nos ferimentos e, portanto, o favorecimento das vantagens competitivas da levedura. A vantagem das leveduras especialmente quando colonizam ferimentos foi documentada por Droby et al. (1991), entre outros.

Entre os principais modos de ação destes organismos, encontram-se a competição por nutrientes e a indução de resistência (Wilson et al., 1991; Wisniewski et al., 1991; Jijakli, 1993). O parasitismo e a degradação das hifas do fungo patogênico pelos antagonistas têm sido demonstrados. Esses efeitos têm sido vinculados à aderência das células da levedura às hifas dos fungos e à elevada produção de glucanase a partir de diferentes fontes de carbono.

A presença universal de várias espécies de leveduras bem como o fato de os consumidores utilizarem rotineiramente alimentos preparados com esses organismos são fatores que, segundo diversos pesquisadores, deverão contribuir para a aceitação de vegetais tratados com esse tipo de produto biológico, nos diversos mercados do mundo. A comparação entre o controle químico e biológico das doenças que ocorrem nas frutas em pós-colheita foi discutida por Wilson et al. (1991).

Wilson & Chalutz (1989) e Wisniewsky et al. (1991) comentaram que as leveduras têm se mostrado promissoras para uso no controle das doenças que ocorrem em pós-colheita. Segundo esses autores, o sucesso da aplicação das leveduras deve-se à facilidade de integrar seu uso ao ambiente e sistema usado para o manejo da fruta. As primeiras espécies citadas, pela eficiência para o controle de doenças em pós-colheita de frutas e hortaliças, foram *Acremonium breve*, *C. guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Cr. laurentii* e *C. albidus var. aerius* (Roberts, 1994).

Biofungicidas preparados com leveduras para uso em pós-colheita estão em desenvolvimento em vários países. Entre esses produtos encontra-se disponível para uso comercial o produto "Aspire", constituído de *C. oleophila*, registrado em Israel e USA para ser utilizado no controle de doenças que ocorrem em frutos cítricos.

O controle de podridões que ocorrem em pós-colheita pode ser obtido quando os antagonistas são aplicados antes deste processo, condição que é indispensável para alguns tipos de frutas em que se requer o menor manuseio possível. Desta forma, em uvas, as leveduras antagonistas *Pichia guilliermondii* e *Hanseniaspora uvarum* controlaram *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer*, quando o tratamento foi feito pela imersão dos cachos no campo 3 dias antes da colheita. O controle diminuiu quando os antagonistas foram aplicados 7 e 10 dias antes da colheita. A proteção, porém, foi perdida após 4 semanas, a 0°C, e após períodos superiores a 7 dias, a 20°C. Não se observou produção de antibióticos inibidores dos patógenos em meio nutritivo sólido e a produção dos antagonistas foi feita em NYDB a 28° C, aplicando-se o caldo obtido diretamente na fruta (Bem-Arie et al., 1991).

Mesmo que nos mecanismos de ação dos isolados de leveduras, selecionados pelo antagonismo aos patógenos associados a diversas doenças, a produção de antibióticos não seja um fator importante, sabe-se que nos grupos de leveduras que exercem ação antagônica a outros organismos da filósfera incluem-se espécies de leveduras produtoras de substâncias antibacterianas. Entre elas podem ser citadas *Cr. laurentii*, *Rh. glutinis* e *Sporobolomyces*, inibidoras de *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus* (Mc Cormack et al., 1994).

Práticas de manejo das doenças nas culturas podem influenciar na microbiota epífita das leveduras e alguns pesticidas podem afetar a população geral ou a de algumas espécies, citando-se entre os produtos de maior efeito inibitório os ditiocarbamatos e os benzimidazóis.

No manejo de frutas em pós-colheita inclui-se o uso de outros produtos, tais como a difenilamina com ação anti-oxidante e os fungicidas. Roberts (1994) cita que enquanto doses registradas do captan inibiram um isolado antagônico

de *Cryptococcus*, as do ortifenilfenato de sódio, iprodione, benomil e a do tiabendazole, avaliadas pelo método do papel de filtro, não o afetaram, podendo ser previstas para uso conjunto com o antagonista.

A modificação do ambiente de armazenagem, utilizado para prolongar a vida útil da fruta e comumente usado em pós-colheita, e as leveduras selecionadas para biocontrole deverão ser também adaptadas a essas condições. Esta característica foi demonstrada pelos isolados antagônicos de *Cr. laurentii* e *C. flavus*, utilizados por Shefelbine & Roberts (1990) em maçãs estocadas em atmosfera controlada com 1,5% de O<sub>2</sub>, 2% de CO<sub>2</sub> e 1-2°C.

O uso de ceras é uma prática rotineira em alguns países para proteger as frutas de ferimentos e diminuir a desidratação. A possibilidade de integrar a essa prática uma estirpe antagônica de levedura conjuntamente com uma dose baixa de fungicida tem sido sugerida para *C. guilliermondii* como uma estratégia de manejo integrado das doenças (Mc Guire, 1993; Wilson & Chalutz, 1989).

Sugar et al. (1994) relataram que a integração de práticas de manejo da cultura são importantes para otimizar o sucesso do biocontrole de patógenos em pós-colheita. Desta forma, a levedura *Cr. laurentii* aumentou o controle de *B. cinerea* e *Phialophora malorum* quando utilizados níveis baixos de nitrogênio e altos de cálcio. Mc Laughlin et al. (1989) relataram que quando era aplicado 2% de CaCl<sub>2</sub> com *C. guilliermondii*, obtinha-se aumento no controle da doença.

Medidas de higiene e desinfecção são necessárias para diminuir o inóculo inicial e aumentar ou manter o controle biológico por leveduras e de outros agentes de biocontrole, fato que também acontece com o controle químico: quanto maior a quantidade de inóculo do patógeno menor será a eficácia de controle (Janisiewicz & Jeffers, 1997). Um efeito claro disto foi demonstrado por Roberts (1994) no controle de *Penicillium expansum* com *Cr. laurentii*, em maçãs da cv. Golden Delicious. Medidas rigorosas de higiene devem ser usadas para diminuir esse inóculo inicial.

A colheita no momento adequado e, portanto, respeitando as recomendações técnicas quanto aos índices fisiológicos da fruta, define em grande medida sua vida útil em pós-colheita e, no caso, maçãs colhidas no fim da época

recomendada, serão mais suscetíveis às doenças em pós-colheita. Foi mostrado em pêras que na medida em que se aumenta o estágio de maturação da fruta, menor é o controle de *Mucor* pelas leveduras *Cr. laurentii*, *C. famus* e *C. albidus var. aerius* (Roberts, 1990).

Trabalhos feitos no Brasil para o biocontrole de patógenos que causam podridões de maçãs têm demonstrado que estirpes de *C. membranifaciens*, *D. hansenii* e *Cr laurentii* obtidas da flora epífita de maçãs no Sul do país (Figura 1) têm potencial para uso em pós-colheita. Os isolados controlaram *P. expansum* e *Alternaria alternata* em maçãs da cv. Fuji (Figuras 2 e 3). A população de leveduras nas maçãs colhidas demonstrou ser abundante e os tratamentos fungicidas efetuados em pré-colheita para a redução de perdas causadas pelas doenças de verão não inibiram a população total desses microrganismos (Tabela 2). Dependendo do produto aplicado, constatou-se a elevação de grupos de leveduras (Tabela 3). No entanto, os resultados da avaliação feitos *in vitro* da sensibilidade de isolados de algumas espécies, mostraram a inibição de alguns pelos produtos utilizados (Figura 4).

O estudo do mecanismo de ação dos isolados de *C. membranifaciens* e *Cr. laurentii* sugeriu que a competição pela L-prolina com *P. expansum* pode ser uma das formas relacionadas à redução da infecção das maçãs pelo patógeno. O isolado antagonista apresentou maior velocidade de consumo deste aminoácido (Figura 5) e, conseqüentemente, uma redução do crescimento do patógeno (Cattanio, 1997).

A literatura relata abundantemente trabalhos sobre o uso de leveduras para a proteção de frutos, mas há também pesquisas feitas para diminuir as perdas causadas por doenças em tubérculos (Schisler et al., 1995) e nas folhas de gramíneas e sementes. Em milho, Williamson & Fokkema (1985) mostraram que a aplicação de leveduras inibiu a formação de apressórios de *C. graminicola* e, em arroz, Akai & Kuramoto (1968) obtiveram a redução das manchas foliares causadas por *C. miyabeans*, quando aplicados isolados de *Candida*.

No trigo, avaliou-se o efeito do fungo leveduriforme *Sporotrix floccullosa* no controle de *Erisiphe graminis* (Hajlaqui & Belanger, 1993), e o efeito de fungos

saprófitos, incluindo leveduras, no antagonismo a *Drechslera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) foi estudado por Fokkema (1973). Os organismos eficazes no biocontrole *in vitro* do patógeno foram *Aureobasidium pullulans* e *Sporobolomyces* spp. e as leveduras brancas constituídas principalmente por espécies de *Cryptococcus*.

A presença de pólen na superfície foliar é um fato comum e, no geral, considera-se que quando em alta quantidade poderá diminuir o efeito do antagonista, provavelmente por se constituir em fonte importante de nutrientes disponíveis, o que anularia o papel de competidor que a levedura manteria com os patógenos. Concordando com isto, Mc Bride (1971) citou que a redução da infecção por *Meria laricis* em pinheiros larisios por *Sporobolomyces* somente ocorreu em situações de baixa disponibilidade de nutrientes.

Petersson & Schnürer (1995) estudaram a proteção de sementes de trigo armazenadas com espécies de *Pichia* e com *Sacharomyces cerevisiae*. Ainda nesta cultura, outro estudo que abordou as possibilidades de uso de leveduras em sementes armazenadas foi feito por Bjönberg & Schnürer (1993). Os autores mostraram que *P. anomala*, habitante da flora epífita de sementes inibiu o desenvolvimento de *P. roqueforti* e de *Aspergillus candidus* em laboratório.

*Pichia guilliermondii* mostrou-se promissor no controle da população de *Aspergillus flavus* em sementes armazenadas de soja. Melhora na eficácia do biocontrole foi obtida quando as sementes foram tratadas não por aspersão, mas por imersão. Entretanto, a proteção foi insuficiente para proteger as sementes de deterioração até o fim da armazenagem (Paster et al., 1993).

## Comentários finais

O uso de leveduras no biocontrole de doenças é ainda uma estratégia recente e concentrada em alguns poucos centros de pesquisas no mundo. A ausência de mais pesquisa com esses organismos pode ser devido ao fato da seleção de leveduras antagonistas dever ser feita de preferência *in vivo*, o que torna o trabalho mais demorado.

O conhecimento dos fatores que definem o início dos processos de

infecção poderá contribuir para outra escolha para o processo de seleção de leveduras antagonistas. Assim, por exemplo, fatores como a velocidade de consumo de nutrientes previamente definidos, crescimento em condições de ambiente críticos para a doença ou a produção de enzimas associadas à patogênese e poderão ser usados como critério básico para a avaliação posterior no hospedeiro.

TABELA 1. Biocontrole de fitopatógenos com leveduras.

Hospedeiro	Patógeno	Antagonista
Cítricos (laranja, limão, pomelo)	<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> e <i>Candida oleophila</i>
Pêssego	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Hanseniospora uvarum</i> e <i>D. hansenii</i>
Maçã	<i>Penicillium expansum</i> <i>Botrytis cinerea</i>	<i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> e <i>Cryptococcus laurentii</i> <i>H. uvarum</i> , <i>D. hansenii</i> e <i>Cr. laurentii</i>
Pêra	<i>Mucor</i> sp.	<i>Cr. laurentii</i> , <i>Cr. flavus</i> e <i>C. albidus</i> var. <i>aerius</i>
Uva	<i>Rhizopus stolonifer</i> <i>Botrytis cinerea</i>	<i>P. guilliermondii</i>
Tomate	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>P. guilliermondii</i>
Milho	<i>Colletotrichum graminicola</i>	Leveduras epífitas

TABELA 2. Efeito dos fungicidas aplicados em pré-colheita na ocorrência de podridões e na população epífita das maçãs.

Fungicida e dose	Podridões dos frutos <sup>1</sup>		População epífita				
	<i>Penicillium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Penicillium</i> u.f.c. <sup>2</sup> x 3 x 10 <sup>3</sup>	Bactérias u.f.c. <sup>2</sup> x 3 x 10 <sup>5</sup>		Leveduras u.f.c. <sup>2</sup> x 3 x 10 <sup>4</sup>	
	(%)	(%)		I	II	I	II
Captan, 0,12%	11,0a <sup>1</sup>	2,1a <sup>1</sup>	67,9a	11,4a	19,6a	25,0a	28,5a
Folpet, 0,12%	12,3a	1,0a	86,6a	15,4a	23,2a	28,1a	21,1a
Mancozeb, 0,16%	11,5a	0,5a	93,3a	19,9a	15,5a	22,1a	19,4a
Tiabendazole 0,045%	13,4a	0,5a	82,9a	22,2a	19,2a	40,8a	28,0a
Dithianon 0,07%	9,3a	0,3a	77,6a	30,8a	16,5a	40,2a	23,2a
Testemunha	10,7a	1,4a	48,5a	19,9a	10,6a	15,0a	20,8a

<sup>1</sup>Médias de 4 repetições (Tukey, 0.95)<sup>2</sup>Número de unidades formadoras de colônias(u.f.c.) por fruto antes (I) e depois do tratamento (II).TABELA 3. Colonização por leveduras em maçãs cv. Fuji tratadas com fungicidas e com *Cryptococcus* sp. (u.f.c.<sup>2</sup> x 500)

Tratamentos	Leveduras brancas u.f.c./fruto	Leveduras vermelhas u.f.c./fruto
<b>POPULAÇÃO NATURAL</b>		
Tiabendazole	100 a <sup>1</sup>	103 ab
Captan	93 a	135 ab
Mancozeb	122 a	94 ab
Testemunha	83 a	123 ab
Dithianon	42 a	61 b
Folpet	53 a	151 a
<b>LEVEDURAS NOS FRUTOS DOS TRATAMENTOS APÓS ASPERSÃO COM <i>CRYPTOCOCCUS</i> SP.</b>		
Tiabendazole	582 a	63 b
Captan	360 ab	181 a
Mancozeb	305 b	66 b
Testemunha	324 b	62 b
Dithianon	420 ab	172 a
Folpet	323 b	279 a
<b>MÉDIAS</b>		
a) População natural	89 a	61 a
b) População natural e de <i>Cryptococcus</i> sp.	426 b	172 b

<sup>1</sup> Seis repetições (Duncan, 0,95).<sup>2</sup> Número de unidades formadoras de colônias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAI, S.; KURAMOTO, T. Micro-organisms existing on leaves of rice plants and the occurrence of brown leaf spot. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* v. 34, p.313-316, 1968.
- ANDREWS, J. H. Effects of pesticides on non-target micro-organisms. In: BLAKEMAN, J.P. **Microbial ecology of the phylloplane**. Academic Press, London, p.283-304, 1981.
- BAIGENT, N.L.; OGAWA, J.M. Activity of the antibiotic produced by *Pullularia pullulans*. *Phytopathology* v. 50, p. 82, 1960.
- BEN ARIE, R. DROBY, S. ZUTKHI, J. COHEN, L. WEISS, B. SARIG, P. ZEIDMAN, M. DAUS, CHALUTZ, E. Preharvest and postharvest biological control of *Rhizopus* and *Botrytis* bunch rots of table grapes with antagonistic yeasts. In: WILSON, L.; CHALUTZ, E. **Biological control of post harvest diseases of fruits and vegetables**. *Workshop Proceedings*. (S.L): USDA, Agricultural Research Service, 1991. 394p. (ARS 92).
- BJÖRNBERG, A.; SCHNÜRER, J. Inhibition of the growth of grain-storage molds *in vitro* by the yeast *Pichia anomala* (Hansen) Kurtzman. *Canadian Journal of Microbiology*, v.39, p.623-628, 1993.
- BLAKEMAN, J.P.; BRODIE, I.D.S. Competition for nutrients between epiphytic microorganisms and germination of spores of plant pathogens on beetroot leaves. *Physiological Plant Pathology* 10 : 29-42, 1977.
- BLAKEMAN, J.P.; FOKKEMA, N. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology* v. 20p. 167-182, 1982.
- BODDY, L.; WIMPENNY, J.W.T. 1992 Ecological concepts in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*, v.73, p. 23S-38S, 1992.
- CATTANIO, M.E. Seleção e caracterização de isolados de *Candida membranifaciens* para o controle de *Penicillium expansum* e *Alternaria alternata* em maçãs. Dissertação Universidade Federal de Rio Grande do Sul. 1997.
- DICKINSON, C.H. Interactions of fungicides and leaf saprophytes. *Pesticide Science* v.4, p. 563-574, 1973.
- DROBY, S.; CHALUTZ, E.; COHEN, L.; WEISS, B.; WILSON, A. Biological control of post harvest diseases of citrus fruit. In: WILSON, L.; CHALUTZ, E. **Biological control of post harvest diseases of fruits and vegetables**. *Workshop Proceedings*. (S.L): USDA, Agricultural Research Service, 1991. 394p. (ARS 92).
- ECKERT, W.J. Role of chemical fungicides and biological agents in post harvest disease control. In: WILSON, L.; CHALUTZ, E. **Biological control of post harvest diseases of fruits and vegetables**. *Workshop Proceedings*. (S.L): USDA, Agricultural Research Service, 1991. 394p. (ARS 92).
- FOKKEMA, N. J. The role of saprophytic fungi in antagonism against *Drechslera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and on rye leaves with pollen. *Physiological Plant Pathology*, v.3, p.195-205, 1973.
- FOKKEMA, N. J. Agrochemicals and the beneficial role of phyllosphere yeasts in disease control. *Ecological Bulletins*, v.39, p.91-93, 1988.
- GOYAL, T. C.; SPOTTS, R. A. Control of postharvest pear diseases using natural saprophytic yeast colonists and their combination with a low dosage of thiabendazole. *Postharvest Biology and Technology* v.7, p.51-64, 1996.
- HAJLAQUI, M. R.; BÉLANGER, R. R. Antagonism of the yeast-like phylloplane fungus *Sporothrix flocculosa* against *Erysiphe graminis* var *tritici*. *Biocontrol Science and Technology*, v.3, p.427-434, 1993.
- JANISIEWICZ, W.J.; JEFFERS, S.N. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protection*, v.16, p.629-633, 1997.
- JIJAKLI, M. H.; TOSSUT, L. P.; THONARD, P. Biological control of *Botrytis cinerea* and *Penicillium* sp. on post-harvest apples by two antagonistic yeasts. *Medicine Faculty Landbouw University of Gent* v. 58, p. 1349-1358, 1993.
- KEENER, P.D. Mycoflora of buds. *Science*, October, p.12.
- LACHANCE, M.; METCALF, B.J. STARMER, W. T. Yeasts from exudates of *Quercus*, *Ulmus*, *Populus*, and *Pseudotsuga*: new isolations and elucidation of some factors affecting ecological specificity. *Microbial Ecology*. v.8, p.191-198, 1982.

- LINARDI, V. R.; MACHADO, K. M. G. Production of amylases by yeasts. *Canadian Journal of Microbiology*, v.36, p.751-753, 1990.
- MACHADO, K.M.G.; LINARDI, V.R. Production of amylase and beta-galactosidase by yeasts. *Arquivos Biologia Tecnologia*, v.33, n2, p.247-253, 1990.
- Mc BRIDE, Micoorganisms interaction in the phyllosphere of larch. IN :PREECE, T.F.; DICKINSON, C.H. (Ed). *Ecology of leaf surface micro-organisms*. Academic Press, London, p545-555., 1971.
- Mc CORMACK, P.J. WILDMAN, H.G.; JEFFRIES, P. 1994 Production of antibacterial compounds by phylloplane-inhabiting yeasts and yeastlike fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, n.3, p.927-931, 1994.
- Mc GUIRE, R. G. Application of *Candida guilliermondii* in commercial citrus coatings for biocontrol of *Penicillium digitatum* on grapefruits. *Biological Control*, v.4, p.1-7, 1993.
- Mc LAUGHLIN, R. J.; WILSON, C.L.; CHALUTZ, E. Biocontrol of post harvest rots of peach and apple with the yeasts *Hanseniospora uvarum* and *Debaryomyces hansenii*. *Phytopathology*, v.79, p.1187. 1989.
- PARK, D. Phylloplane fungi: tolerance of hyphal tips to drying. *Trans. Br. Mycol. Society*, v.79, n.1, p.174-178, 1982.
- PASTER, N.; DROBY S.; CHALUTZ E. Evaluation of the potential of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against *Aspergillus flavus* and fungi of stored soya beans. *Mycological Research* v.97, n.10, p.1201-1206, 1993.
- PETERSSON, S.; SCHNÜRER. Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v., p.1027-1032, 1995.
- PIANO, S.; NEYROTTI, V.; MIGUELI, Q.; GULLINO, M. L. Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biology and Technology*, v.11, p.131-140, 1997.
- ROBERTS, R. G. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology*, v.80, p.526-530, 1990.
- ROBERTS, R. G. Integrating biological control into postharvest disease management strategies. *HortScience*, v.29, n.7, p.758-762, 1994.
- SANTOS, E.A.; OLIVEIRA, R.B.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.. Yeasts associated with flowers and fruits from a semi-arid region of northeastern Brazil. *Ver. Microbiol.*, v.27, n.1, p.33-40, 1996.
- SCHISLER, A. D. KURTZMAN, C. P.; BOTHAST, R. J. SLININGER, P. J. Evaluation of yeast for biological control of *Fusarium* dry rot of potatoes. *American Potato Journal*, v.72, p.339-352, 1995.
- SHEFELBINE, P.A., ROBERTS, R.G. Population dynamics of *Cryptococcus laurentii* in wounds in apple and pear fruits stored under ambient or controlled atmospheric conditions. *Phytopathology* v.80 p. 1990.
- SORENSEN, W.G.; SIMPSON, J.; DUTKIEWICZ, J. Yeasts and yeast-like fungi in stored timber. *International Biodeterioration*, v.27, p.373-382, 1991.
- SUGAR, D.; ROBERTS, R. G.; RIGHETTI, T. L.; SANCHEZ, E. E. Integration of cultural and biological methods for control of postharvest decay in bosc pears. *Acta Horticulturae*, v. 367, p. 433, 1994.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. Efeito de pesticidas sobre a microflora da parte aérea das plantas. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L., ed. *Microbiologia ambiental*. Jaguariuna: Embrapa-CNPMA, 1997. 40p. (Documentos, 11).
- WILSON, C; CHALUTZ, E. Post harvest biocontrol of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Sciencia Horticulturae* v. 40, p. 105-112. 1989.
- WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E.; BILES, C.L.; Mc LAUGHLIN, R.; CHALUTZ, E.; DROBY, S. Biological control of post-harvest diseases of fruits : alternatives to synthetic fungicides. *Crop Protection* v.10, p172-177, 1991.
- WILLIAMSON, M.A.; FOKKEMA, N.J. Phyllosphere yeasts antagonize penetration from appresoria and subsequent infection of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. *Netherlands Journal of Plant Pathology.*, v.1, p.265-276, 1985.
- WISNIEWSKY, M.; BILES, C.; DROBY. The use of yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent; Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. In: WILSON, C.L.; CHALUTZ, E. ed. **Biological control of post harvest diseases of fruits and vegetables, Workshop Proceedings.** (S.L): USDA, Agricultural Research Service, 1991. 394p. (ARS 92).



# 3

## IMPORTÂNCIA DOS MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS NO CONTROLE DE INSETOS

João Lúcio Azevedo  
Wellington Luiz de Araujo  
Walter Maccheroni Jr

### INTRODUÇÃO

O controle natural e biológico de pragas agrícolas e moléstias de plantas cultivadas tem, cada vez mais, sido visto como uma das maneiras de redução do uso de produtos químicos na agricultura. No Brasil, o controle biológico tem sido utilizado freqüentemente e muitas pesquisas sobre ele foram e continuam sendo desenvolvidas tanto em nosso país (Alves, 1998; Melo e Azevedo, 1998) como em outros da América do Sul (Lecuona, 1996). De fato, com vastas áreas destinadas a culturas vegetais e tendo seu território localizado, em grande parte, na região tropical, o Brasil e toda a América Latina apresentam uma agricultura seriamente afetada por pestes agrícolas. O uso de agroquímicos, embora reduza o ataque de insetos e de microrganismos fitopatogênicos, apresenta riscos ao pessoal de campo que trabalha com a sua aplicação e aos consumidores. Além disso, seu uso é, em determinados casos, antieconômico. O controle de pragas e moléstias de plantas cultivadas por processos biológicos, como por exemplo, pela aplicação de microrganismos entomopatogênicos ou daqueles que inibem ou antagonizam outros microrganismos patógenos de plantas é uma alternativa que contribui para a redução ou eliminação do uso de produtos químicos na agricultura.

A agricultura, pela própria natureza, é antiecológica: com o uso em larga escala de insumos agrícolas, como, entre outros, fertilizantes, inseticidas, fungicidas, herbicidas e antibióticos, profundas modificações biológicas ocorrem. Embora alguns desses produtos, como os inseticidas e fungicidas, visem respectivamente ao controle de pragas e fungos fitopatogênicos, eles também são responsáveis pela eliminação de espécies úteis, como insetos controladores de pragas e microrganismos que estão desempenhando um importante papel no ambiente, controlando o crescimento e a multiplicação de outros microrganismos que, devido aos desequilíbrios surgidos, tornam-se patógenos. Um dos grupos de microrganismos afetados por essas modificações antropogênicas é o dos endofíticos, incluindo aí, principalmente fungos e bactérias. Microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior de plantas, principalmente folhas, ramos e caule, sem causar, aparentemente, qualquer dano ao seu hospedeiro (Azevedo, 1998). Principalmente a partir dos anos 70, eles, que eram considerados neutros, não causando nem benefícios e nem sendo prejudiciais às plantas, começaram a ser melhor estudados e concluiu-se que, em vários casos analisados, desempenham importante papel na proteção do hospedeiro contra o ataque de predadores e patógenos.

No presente capítulo vão ser revistos exemplos de associações entre microrganismos endofíticos e plantas, especialmente aquelas que controlam insetos.

## Microrganismos endofíticos

Todos os microrganismos que habitam, pelo menos durante um período de seu ciclo vital, o interior de um vegetal podem ser considerados endofíticos. A distinção entre microrganismos endofíticos, epifíticos (que vivem na superfície das plantas) e fitopatogênicos (responsáveis por moléstias em plantas) é de cunho puramente didático, havendo uma gradação entre eles e ficando, portanto, muito difícil de serem estabelecidos claros limites entre as três categorias. Para maiores detalhes sobre o assunto sugere-se a revisão de Azevedo (1998) e os livros de Redlin & Carris (1996), Isaac (1992) e Fokkema & Van den Heuvel

(1986). Também os fungos micorrízicos e as bactérias fixadoras de nitrogênio, que vivem em íntimo relacionamento com plantas hospedeiras, são microrganismos endofíticos. Entretanto, fungos micorrízicos distinguem-se de outros microrganismos endofíticos de raízes, pois estes últimos não possuem estruturas externas, como por exemplo hifas. Também bactérias endofíticas de raízes distinguem-se das simbiontes fixadoras de nitrogênio, como *Rhizobium*, que formam estruturas externas designadas de nódulos. Fungos micorrízicos e bactérias do tipo *Rhizobium* constituem grupos bastante conhecidos e bem pesquisados e não serão aqui abordados.

Embora tenham sido descritos a partir do século passado, microrganismos endofíticos só receberam uma maior atenção há pouco mais de 20 anos, quando foi verificado que eles possuem capacidade de proteger seus hospedeiros contra insetos-praga, patógenos e até herbívoros domésticos, como por exemplo, ovinos e bovinos. À medida que microrganismos endofíticos, principalmente os fungos e bactérias, foram sendo mais bem estudados, verificou-se que eles poderiam possuir outras propriedades importantes, tais como a de conferir maior resistência de seus hospedeiros a condições de estresse hídrico, alterar propriedades fisiológicas das plantas que os albergam, produzir hormônios vegetais e outros compostos, tais como importantes enzimas e fármacos de interesse biotecnológico. Além do mais, o estudo de microrganismos endofíticos tem despertado interesse acadêmico, pois novas espécies microbianas têm sido descobertas, principalmente quando hospedeiros tropicais são investigados.

## **Os primeiros relatos de microrganismos endofíticos atuando no controle de insetos-praga**

Nos anos 80 começaram a surgir na literatura especializada casos que evidenciavam que os microrganismos endofíticos, no caso fungos, podiam desempenhar um importante papel dentro de suas plantas hospedeiras. Foi demonstrado que a existência de um ou mais desses microrganismos podia ocasionar redução do ataque de insetos nos seus hospedeiros vegetais. Relatos pioneiros sobre o assunto começaram a surgir a partir de 1981, ou seja, há

menos de duas décadas. Nessa fase, de 1981 até 1985, que já pode ser considerada histórica dentro da área, demonstrou-se a existência de uma proteção nas plantas contra insetos herbívoros, ocasionada por microrganismos endofíticos. Começaram a ser pesquisadas, também, as causas dessa proteção e as variáveis envolvidas no processo.

Webber (1981) foi talvez o primeiro pesquisador a relatar um exemplo de proteção de um vegetal por fungo endofítico, demonstrando que o endófito *Phomopsis oblonga* protegia plantas de olmeiro contra besouros da espécie *Physocnemum brevilineum*. Essa proteção, por sua vez, evitava a transmissão de fitopatógenos, pois o inseto atuava como vetor do fungo *Ceratocystis ulmi*, que causa doença em olmeiro. O autor associou os efeitos no inseto-praga a compostos tóxicos produzidos pelo fungo endofítico, o que foi comprovado quatro anos mais tarde por Claydon et al. (1985), que também mostraram que endófitos da família *Xylariaceae* são produtores de metabólitos secundários que afetam larvas do besouro, em hospedeiros vegetais do gênero *Fagus*.

Outras observações, também nos primórdios das descobertas sobre o papel dos endófitos no controle de insetos-praga, são as de Funk et al. (1983), com fungos protegendo a gramínea de clima temperado azevém ou raigrás (*Lolium perenne*) contra lagartas de gramados, e de Gaynor & Hunt (1983), mostrando que, em várias espécies dessa mesma gramínea, o ataque por larvas do inseto *Listronotus bonariensis* é menor em plantas com altos níveis de infecção por fungos endofíticos. Esses últimos autores mostraram, também, que essas associações podem ser complexas, pois níveis de fertilização nitrogenada no solo, afetam a incidência de ataque dos insetos. Com os mesmos inseto e planta, na Nova Zelândia, Barker et al. (1984) e Prestidge et al. (1984) evidenciaram que plantas que não possuíam fungos endofíticos do gênero *Acremonium*, atualmente classificado como pertencente ao gênero *Neotyphodium* (na presente revisão os dois nomes, *Acremonium* e *Neotyphodium*, serão citados conforme apresentados nos trabalhos originais), eram severamente atacadas. Lasota et al. (1983) também já haviam correlacionado na planta *Picea glauca*, uma espécie de pinheiro, mortalidade do inseto homóptero da espécie *Adelges abietis*, quando

ocorre infecção das galhas pelo fungo endofítico *Cladosporium sphaerosperum*. Em gramíneas como *L. perenne* e também em ciperáceas do gênero *Cyperus*, ganho de peso e sobrevivência do inseto-praga *Spodoptera frugiperda* foram afetados por fungos endofíticos, como o *Balansia cyperi* (Clay et al., 1985a; 1985b; Hardy et al., 1985). Estudos com relação a esse inseto afetando diferentes espécies de *Lolium* foram também conduzidos por Latch et al. (1985b) com dois fungos endofíticos: o *Acremonium lolii* e outro do gênero *Gliocadium*; os autores discutem os benefícios e riscos decorrentes do aumento de produção dessas toxinas no controle de insetos e danos sobre animais domésticos que se alimentam dessas plantas, e foi verificado que *Acremonium* também afetava afídeos nas gramíneas forrageiras dos gêneros *Lolium* e *Festuca* (Latch et al., 1985a). Ahmad et al. (1985) verificaram efeitos semelhantes do mesmo fungo no grilo *Acheta domesticus*; Johnson et al. (1985), em testes de escolha com plantas infectadas ou não com endófitos, mostraram em *Festuca* que os insetos eram como que repelidos por plantas infectadas. Também, Carroll, antes de 1985, porém somente citado em revisão mais recente (Carroll, 1995), descreve o fungo endofítico *Rhizoctonia parkeri*, que é o mais freqüente em abeto ou Pinheiro de Douglas, como controlador de galhas causadas por larvas de insetos do gênero *Contarinia*. Nesse caso, o controle era feito por toxinas produzidas pelo fungo, atuando no inseto-praga.

Assim, esses exemplos que foram alguns dos primeiros descritos na literatura mostram não apenas a importância dos microrganismos, no caso fungos endofíticos no controle de insetos-praga da agricultura, mas também que os mecanismos de controle gerados por endófitos são bastante diversos. O papel dos fungos endofíticos no controle de insetos já foi objeto de várias revisões, salientando-se as de Clay (1989), Carroll (1991; 1995), Breen (1994) e Saikkonen et al. (1998). Na presente revisão, os principais temas relacionados com o controle de insetos por microrganismos endofíticos serão abordados, bem como a possibilidade de utilização desses conhecimentos em um controle biológico, empregando-se tanto técnicas já consideradas clássicas como as mais modernas, geradas pela tecnologia do DNA recombinante.

## Efeitos da presença de microrganismos endofíticos em insetos

Além dos casos citados no item anterior, abrangendo o período de 1981-85, foram se acumulando relatos sobre os efeitos de microrganismos endofíticos em insetos. Verificou-se que o processo de proteção às plantas hospedeiras, promovido pelos endófitos, é muito mais complexo do que se imaginava. Os endófitos não podem ser considerados, portanto, como uma panacéia no controle da herbivoria. Se bem que, na maioria dos trabalhos publicados sobre o assunto eles atuam de forma mutualística, isto é, positivamente em relação ao hospedeiro e negativamente em relação aos insetos-praga. Há também relatos com efeitos neutros ou mesmo antagonísticos. A quase totalidade das pesquisas tem sido feita com plantas de clima temperado, particularmente gramíneas forrageiras, como a festuca (*Festuca arundinacea*) e uma planta relacionada ao raigás ou azevém (*Lolium perenne*). Estes são vegetais de grande importância em países como os da Oceania, Europa Ocidental e Estados Unidos, onde são largamente usados na alimentação do gado. Só no sudeste dos Estados Unidos existem cerca de 10 milhões de hectares de pastagens de festuca (Clay, 1989). Por outro lado, há já bastante tempo haviam sido detectadas intoxicações, perda de peso, diminuição de produção de leite, gangrena de extremidades e outros problemas em gado alimentado com essas plantas contendo fungos endofíticos. Assim, a correlação entre efeitos negativos em animais domésticos herbívoros e efeitos em insetos foi o próximo passo.

## Endófitos e diminuição de incidência de insetos nas plantas hospedeiras

Além dos relatos apresentados acima, todos eles correlacionando efeitos negativos sobre insetos que se alimentam de plantas contendo determinadas espécies de fungos endofíticos, outros relatos foram se acumulando nos anos subseqüentes. Alguns serão aqui apresentados, lembrando que a grande maioria dos dados refere-se aos hospedeiros *F. arundinacea* e *L. perenne*. De fato, Clay (1989) salienta que embora muitos fungos endofíticos já tenham sido isolados de cerca de 80 espécies de gramíneas de clima temperado, apenas 6 gêneros

são os mais frequentes e dentre eles o *Acremonium*. A situação, desde a revisão de Clay (1989) há mais de dez anos, pouco se modificou. Por exemplo, considerando apenas esses dois hospedeiros vegetais em *L. perenne*, Ahmad et al. (1986) mostraram que *Sphenophorus parvulus* era menos incidente em plantas que apresentavam fungos endofíticos. Também Ahmad et al., (1987) verificaram o mesmo caso em gramíneas atacadas pelo inseto *Spodoptera eridania*. Saha et al. (1987), estudando endófitos de plantas do gênero *Festuca*, verificaram que os do gênero *Acremonium* estavam associados com resistência de seus hospedeiros ao percevejo das gramíneas (*Blissus leucopterus hirtus*) e o mesmo foi encontrado por Mathias et al. (1990) em *L. perenne*, graças ao endófito *Acremonium lolii*. Já Kindler et al. (1990), verificaram que *Acremonium* reduziu o ataque do afídeo *Diuraphis noxia* tanto em *Lolium* como em *Festuca* e o mesmo foi verificado por Clement et al. (1990, 1992), incluindo testes de laboratório.

Também em relação aos cercopídeos, a planta hospedeira *F. arundinacea*, portadora do fungo endofítico *A. coenophialum*, foi bem mais resistente que plantas sem este endófito, principalmente em épocas de alta incidência dos insetos (Muegge et al., 1991). Da mesma forma, Eichenser & Dahlman (1992) verificaram menores sobrevivência e reprodução do afídeo *Rhopalosiphum padi* em *F. arundinacea* infectada com o endófito *A. coenophialum*, quando comparada com plantas livres. Sugerem que a alta incidência do afídeo em plantas pode ser uma indicação de que elas não possuem endófitos produtores de alcalóides.

Kanda et al. (1994) relatam a preferência de larvas de *Parapediasia teterrella* para dietas com plantas de *L. perenne* e *F. arundinacea* não-infectadas, a ponto das larvas definharem e morrerem de fome se apenas dieta com plantas infectadas com *Acremonium* for disponível. No campo, parcelas da espécie sem o endófito foram severamente atacadas em contraste com plantas com *Acremonium*, que praticamente ficaram isentas de larvas do inseto.

Como será visto com mais detalhes, vários fungos endofíticos (Clavicipitaceae, Ascomycetes) produzem alcalóides em seus hospedeiros vegetais. Eles reduziram sobrevivência e desenvolvimento de larvas de *S. frugiperda* em muitas gramíneas e ciperáceas, como pode ser verificado pela

revisão de Cheplick & Clay (1988). No besouro da farinha, *Tribolium castaneum* com sementes moídas de *F. arundinaceae* e *L. perenne*, com e sem endofíticos, houve a redução de sementes infectadas e do crescimento dos besouros em sementes com endofíticos, principalmente as de *F. arundinacea*. (Cheplick & Clay, 1988). Os autores concluíram que esta é uma característica das gramíneas infectadas, isto é, a maior resistência a insetos, o que, no geral, é benéfico para as plantas na natureza.

Considerando-se outras gramíneas, os relatos são escassos. No entanto, o processo de proteção dos hospedeiros contendo endófitos específicos contra insetos parece se repetir. Por exemplo, extratos alcoólicos da gramínea *Poa ampla* com e sem *Neotyphodium typhnium* foram ensaiados contra larvas de mosquitos. Só o extrato de plantas infectadas com o endófito era ativo contra as larvas. O extrato do próprio fungo, sem desenvolvimento na planta, não apresentava atividade (Ju et al., 1998).

Como visto, não apenas gramíneas podem ser protegidas contra insetos, embora com outras plantas os dados não sejam tão conclusivos e nem tão numerosos. Carroll (1986), em uma revisão sobre o assunto, sugere, corroborando os dados de Webber (1981), que o fungo endofítico *P. oblonga* deve ser o responsável pela pouca disseminação de doença de olmeiro causada por *Ceratocystis ulmi* e transmitida por besouros que, por sua vez, são controlados pelo endófito. Da mesma forma, Sherwood-Pike et al. (1986) relatam no Pinheiro de Douglas a atuação do fungo endofítico *Rhabdocline parkeri* sobre o inseto *Contarinia* sp. e Petrini et al. (1989) verificaram em *Abies balsamea*, em Quebec, Canadá, que os fungos endofíticos *Phyllosticta* sp. e *Hormonema dematioides* colonizavam galhas do inseto cecídomídeo *Paradiplosis tumifex*, sugerindo que esses fungos poderiam ser utilizados no controle da praga. Também em pináceas, Johnson & Whitney (1994), verificaram que, de 100 isolados de hifas e extratos de hifas de folhas do pinheiro *Picea mariana*, 21 deles tinham efeitos tóxicos sobre o inseto *Choristoneura fumiferana*, sendo que isolados de folhas maduras eram mais efetivos em culturas de células do que os de folhas jovens. O peso seco e o desenvolvimento de larvas alimentadas com extratos de hifas foram

também reduzidos.

Esses são alguns resultados de pesquisa que comprovam a eficiência de fungos endofíticos na redução dos danos causados pelos insetos em plantas hospedeiras. Os exemplos acima abrangem trabalhos realizados no campo, comparação de dados obtidos no campo e laboratório, pesquisas realizadas em casas-de-vegetação ou, ainda, pelo fornecimento de dietas contendo extratos de plantas infectadas ou não-infectadas por endófitos. Experimentos conferindo possibilidade de escolha do inseto ao alimento, experimentos sem possibilidade de escolha e outras variações são também encontrados na literatura a respeito do assunto. Embora a maioria dos trabalhos citados acima seja bastante conclusiva, nem sempre os resultados levam a um controle de insetos pelos endófitos. Como será visto a seguir, há casos de neutralidade ou até mesmo favorecimento dos insetos em plantas portadoras de microrganismos endofíticos.

### Endófitos não atuando na redução de ataque de insetos em seus hospedeiros

Embora nos casos acima citados tenha havido um controle no ataque de insetos devido à presença de determinados fungos endofíticos nos hospedeiros, nem sempre isso fica muito claro. Em 1986, Kirfman et al. estudaram a relação entre incidência de endófitos e ataque de insetos em *F. arundinacea*, no Missouri. Alguns cicadelídeos e o crisomelídeo *Chaetocnema pulicardia* decresceram em número, com o aumento de microrganismos endofíticos. Entretanto, houve um aumento da incidência de um cicadelídeo (*Exitianus exitiosus*) e de um inseto do gênero *Bruchomorfa* com aumento de endofíticos. Os autores sugerem que a eliminação de endofíticos tóxicos em pastagens pode causar desequilíbrios biológicos com incremento de incidência de alguns insetos-praga e diminuição de outros. Na primeira metade dos anos 90, Breen (1993a; 1993b) realizou um amplo estudo com endófitos do gênero *Acremonium* em várias espécies de gramíneas, como festucas e em *L. perenne*, com relação ao ataque de três espécies de afídios, e também com duas espécies de lepidópteros, a *S. frugiperda* e *S. eridania*. Embora, na maioria dos ensaios realizados, fosse constatada uma

diminuição na sobrevivência dos insetos, cada caso foi considerado diferente do outro, sugerindo que o genótipo da planta, o endófito e os insetos têm que ser analisados um a um, pois, dependendo das condições, pode ou não haver controle, ou mesmo ocorrem efeitos contrários, com aumento da incidência praga na presença do endófito.

Dessa maneira, a presença de endófitos, mesmo os que comprovadamente já demonstraram atuar no controle de pragas, nem sempre resulta em um controle efetivo. Em carvalho, estudos realizados durante um período de quatro anos mostraram que existem diferenças sazonais com relação à presença de endófitos. Nesse caso, a incidência do lepidóptero *Cameraria sp.*, um minador de folhas, não foi alterada pelo endófito e até em alguns casos houve maior incidência da praga coincidindo com o aumento de endófitos, sugerindo que os insetos minadores de folhas facilitam a instalação e o incremento de fungos endofíticos. Também não houve qualquer preferência de ovoposição por parte de fêmeas do inseto, que colocaram ovos igualmente em folhas com ou sem o fungo (Faeth & Hammon, 1996; 1997 a).

Em carvalho, experimentos realizados sobre os efeitos do endófito *Asteromella sp.* em insetos não detectaram diferenças entre o tempo de sobrevivência e tamanho das larvas provenientes de ramos com ou sem o fungo. Além de *Asteromella*, outros endófitos, como *Plectophomella sp.* e uma levedura filamentosa foram também estudados e, nesses casos, larvas do inseto em folhas em que foram injetados dois destes endófitos desenvolveram-se mais lentamente (Faeth & Hammon, 1996, 1997 a; 1997 b). Também em *Betula pubescens* não foi detectado qualquer efeito de endófitos no controle do besouro da folha *Phratora polaris* (Lappalainen & Helander, 1997)

Murphy et al. (1993) pesquisaram em *F. arundinacea* a influência de fungos endofíticos em relação ao ataque por espécies de insetos do gênero *Sphenophorus*, que reduzem cobertura de gramados em até 25%, em plantas livres de endófitos. Outras espécies de pragas foram também estudadas, como a lagarta dos gramados e as larvas de escaravelho e embora houvesse, em certos casos, proteção nas plantas com os fungos endofíticos, em outros não foram

detectadas diferenças significativas entre plantas com e sem endófitos.

Por outro lado, em alguns casos não houve proteção contra insetos quando plantas sem ou com endófitos foram comparadas com relação a preferências alimentares em besouro japonês (*Popillia japonica*) e *Cyclocephala lurida* (Crutchfield & Potter, 1994). Também Lewis & Clements (1986) não verificaram efeitos no aumento de resistência a larvas de moscas das frutas (*Oscinella spp*) em gramíneas, com ou sem endófitos.

Situações nas quais o controle não se verifica podem ser explicadas pelo próprio comportamento do inseto sobre a planta. Em insetos extremamente móveis, como ocorre no terceiro instar do hemíptero *Blissus leucopterus*, que ataca a grama azul de Kentucky, uma movimentação intensa dos insetos para plantas sem o fungo endofítico *Acremonium* diminui o potencial do fungo no controle da praga (Carriere et al., 1997). Em outros casos, a pequena quantidade de alcalóides que se acumulam nas plantas hospedeiras pode explicar a inexistência de diferenças entre peso, sobrevivência de larvas e emergência de adultos em insetos alimentando-se de plantas com e sem endófitos. Este é o caso relatado por Lewis & Vaughan (1997), obtido a partir de larvas de *Tipula spp.* alimentadas com *L. perenne* com e sem o fungo endofítico *Neotyphodium lolii*

De qualquer forma, parece que a euforia inicial sobre controle de insetos com microrganismos endofíticos está sendo aos poucos contida, pois verifica-se que o potencial do processo no controle de pragas foi superestimado. Por exemplo, de quatro linhagens de cevada selvagem com e sem o endofítico *Neotyphodium* (o gênero novo, designado anteriormente *Acremonium* como já mencionado), em duas delas a densidade do afídio *Diuraphis noxia* foi menor nas que não continham o endófito, mas em outras duas não foram constatadas diferenças (Clement et al., 1997). Da mesma maneira, Tibbets & Faeth (1999) ensaiaram os efeitos de *Neotyphodium* introduzindo-o em dois tipos de festuca, a comum e a do Arizona, e estudaram seus efeitos em formigas cortadeiras da espécie *Acromyrmex versicolor*. Experimentos foram realizados com possibilidade de escolha, pelas formigas, de plantas infestadas ou não-infestadas. Também foram

realizados ensaios oferecendo aos insetos apenas plantas infectadas com o endófito, para verificar efeitos na sobrevivência e no desenvolvimento das pragas. Em experimentos com escolha, houve preferência dos insetos pelas gramíneas não-infectadas, no caso de *F. arundinacea* como hospedeira, mas não houve preferência no caso da festuca do Arizona. Já com experimentos sem escolha, rainhas não sobreviveram após 6 semanas, submetidas à dieta com plantas infectadas. Os efeitos, entretanto, foram muito variáveis e dependentes do genótipo do fungo e do hospedeiro, além de fatores do ambiente (Tibbets & Faeth, 1999).

Em um interessante estudo, Wilson & Carroll (1997) investigaram um sistema no qual se sabe que o fungo endofítico causa mortalidade em um inseto que forma galhas, o *Besbicus mirabilis*, mas não no outro, o *Bassetia ligni*, ambos atacando folhas do mesmo vegetal. Foi verificado que o *B. mirabilis* evita a parte da folha em que o endofítico ocorre mais freqüentemente. Já o *B. ligni* ocupa a lâmina da folha em que o endófito não tem atividade; há emergência das galhas só quando o fungo vai ainda atingir o pico de infecção, de tal forma que não ocorre um contato prolongado com o fungo. Os autores concluem que a simples observação da presença ou ausência de insetos em hospedeiros pode levar a enganos quando se investiga o papel de fungos endofíticos no controle de insetos-praga.

Carroll (1995), em revisão sobre endófitos de essências florestais, questiona a maioria dos trabalhos sobre o efeito dos fungos endofíticos atuando mutualisticamente no controle de insetos herbívoros. Segundo ele, para que haja provas convincentes desses efeitos, há necessidade de se mostrar que o fungo está nos tecidos em que o inseto preferencialmente ataca a planta; deve ser constatada, também, uma correlação entre presença de endófitos e diminuição de herbivoria ou morte de insetos e, finalmente, devem ser comparadas plantas inoculadas com endófito e não inoculadas e o destino dos insetos nos dois casos. Ele também salienta que é importante a comprovação de que o fungo produz toxinas. Na maioria dos trabalhos realizados nesse sentido, uma ou mais, mas não todas as provas mencionadas acima existem. Além disso, ele menciona o

fato de que os dados são obtidos com um inseto, um endófito e um hospedeiro, quando na natureza o problema é muito mais complexo, envolvendo uma ampla interação entre endófitos, entre diversos herbívoros e interações entre o hospedeiro e as plantas no ambiente. Outros empecilhos salientados por Carroll (1995) são a dificuldade de inoculações de endófitos com sucesso e a não comprovação de produção de toxinas de endófitos florestais *in vivo*, embora elas tenham sido isoladas de culturas puras de fungos endofíticos. Finalmente, Carroll (1995) salienta o fator co-evolução considerando as interações entre planta-endófito-inseto; os três têm longa história evolucionária e, segundo o autor, devem conviver harmoniosamente, a não ser em condições não-usuais ou artificiais. Acontece que, como já mencionado no início dessa revisão, as condições em situação de uma agricultura são, por si só, extremamente artificiais. Isso torna o fator co-evolução não tão importante, pois em condições novas as interações podem se modificar. Deve ser lembrado que as práticas agrícolas têm apenas 10 mil anos, comparadas com milhões de anos de co-evolução. Assim, o uso de agroquímicos, diferentes modificações de clima, solo e práticas culturais tornam as interações entre os três componentes endófito-hospedeiro-inseto pouco previsíveis.

### Como é efetuado o controle de insetos pelos fungos endofíticos

Nos itens anteriores já foram levantados alguns indícios do porquê de os fungos endofíticos exercerem, em vários casos descritos, um papel no controle de insetos herbívoros, protegendo seus hospedeiros. Desde os trabalhos pioneiros na área, a capacidade dos endófitos em repelir insetos ou causar redução de peso, crescimento, desenvolvimento e mesmo mortalidade de pragas, foi relacionada à produção de toxinas por determinados fungos endofíticos. Em vários desses casos, foi verificado que o modo de atuação de certos fungos endofíticos no controle era tornar a planta menos palatável a vários tipos de pragas, como afídeos, grilos, besouros, etc. (Carroll, 1988; Clay, 1988a; 1988b).

Bacon et al. (1977) foram os primeiros a estabelecer uma correlação entre a presença de um fungo endofítico, o *Epichloë typhina*, e a toxicidade que seu hospedeiro, a *F. arundinacea*, apresentava aos mamíferos domésticos

herbívoros que se alimentavam da gramínea. Atualmente, é conhecido o fato de que várias toxinas são produzidas por fungos endofíticos e são elas que protegem a planta contra herbívoros, sejam eles mamíferos, insetos ou outros animais. Sugere-se para mais detalhes sobre essas toxinas a leitura da revisão de Bacon & Hills (1996), na qual foram descritas as principais toxinas, como os alcalóides de ergot de dois tipos, ergopeptina e clavina e as neurotoxinas chamadas comumente de lolitrems, isoladas de *L. perenne*. Em oposição aos ergot, que são toxinas isoladas diretamente dos fungos endofíticos, as neurotoxinas produzidas por endófitos como *A. lolii* são apenas precursoras de toxinas, como por exemplo, a paxilina. Não se sabe se esse precursor é convertido pela planta em lolitrems ou se o fungo não o sintetiza em cultura pura, mas torna-se capaz de síntese, quando no interior da planta.

De qualquer forma, exemplos de produção de toxinas por fungos endofíticos, principalmente os que convivem com gramíneas, são bastante abundantes na literatura. Por exemplo, Miller (1986) apresenta pesquisa na qual o Pinheiro do Canadá é protegido contra insetos pela produção, dentro do vegetal, de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos, que são tóxicos aos insetos. Em 1988, Prestidge & Gallagher estabeleceram relações entre a presença de um fungo endofítico, o *A. lolii* e o crescimento, a sobrevivência e o comportamento alimentar de larvas do curculionídeo *L. bonariensis* no hospedeiro *L. perenne*. Nesse caso, a redução do ataque dos insetos em plantas portadoras do endófito foi relacionada com uma possante toxina contra mamíferos, a lolitrem B. Esta, adicionada à dieta de insetos em ensaios de laboratório reduziu o seu crescimento e a sua sobrevivência. A toxina atua por ingestão, mas não por absorção pelo integumento do inseto.

Em determinados casos, a produção de toxinas por fungos endofíticos foi a explicação plausível encontrada para certos casos de controle natural de insetos observados. Assim, Clark et al. (1989) mostraram em *Abies balsamea* e *Picea rubens*, que de 900 amostras de fungos isoladas, cinco delas produziam compostos tóxicos das quais três eram possantes toxinas que, extraídas e adicionadas a insetos, causavam a morte e redução da taxa de desenvolvimento

do tortricida *C. fumiferana*. Este, depois de ataques a plantações em New Brunswick, Estados Unidos, começou a apresentar uma alta taxa de mortalidade, que poderia ter sido causada por toxinas de fungos endofíticos produzidas em plantas hospedeiras.

Muitos outros casos de controle de insetos envolvendo toxinas geradas por microrganismos endofíticos podem ser encontrados na literatura pertinente. Siegel et al. (1990) verificaram a presença dos alcalóides N-formil e N-acetil lolina, peramina, lolitrem B e ergovalina e resposta das plantas que os contêm aos afídios. Os vegetais pesquisados foram várias gramíneas infectadas com os endófitos *Acremonium spp.* e *E. typhina*. Estes, geralmente produzem alcalóides, principalmente peramina e ergovalina. Peramina, lolitrem B e ergovalina foram achados em *Lolium* e *Festuca* infectados com *A. coenophialum* e *A. lolii* e em *Festuca longiflora* infectado com *E. typhina*. Os insetos das espécies *Rhopalosiphum padi* e *Schizaphis graminum* não sobreviveram em gramíneas com alcalóides do tipo lolina. Por outro lado, a ergovalina não afetou as duas espécies de insetos.

Os extratos metanólicos de *F. Arundinacea*, infectada por *A. coenophialum*, contêm lolinas produzidas pelo fungo. Essas lolinas são capazes de alterar o comportamento alimentar e o peso de insetos-praga da planta. Dietas nas quais foi incorporado o extrato com derivados do alcalóide lolina produziram efeitos em *S. frugiperda* e *O. nubilalis*, reduzindo o peso e alterando o comportamento, especialmente no primeiro inseto (Riedell et al., 1991).

Patterson et al. (1992) observaram tanto em *Lolium* como *Festuca* o papel do endófito *Acremonium* na redução do ataque do besouro japonês *Popilla japonica*, devido à produção de alcalóides nas plantas pelo fungo endofítico. Em outras observações, surge a constatação de que alterações do ambiente podem afetar a produção de toxinas pelos fungos endofíticos. Breen (1992) verificou que alterações na temperatura e mudanças de estação modificam as concentrações de toxinas nas plantas, como é o caso da peramina produzida em *L. perenne*, infectado com *A. lolii*. Dessa maneira, como a antixenose em relação ao afídio *S. graminum* é dependente de peramina e da concentração de endófitos,

uma decorrência natural é de que também se alterem os efeitos sobre o inseto-praga. A existência de especificidades entre certos fungos endofíticos e plantas hospedeiras fizeram com que Leuchtman (1992) sugerisse um estudo mais aprofundado da ocorrência de raças fisiológicas em fungos endofíticos que seriam importantes em futuros estudos visando a um controle biológico de insetos, utilizando endófitos.

Pesquisas têm sido realizadas visando a obter novas toxinas úteis no controle de insetos. Duas novas toxinas ativas contra *C. fumiferana* foram encontradas em um fungo endofítico não classificado, no hospedeiro *Gaultheria procumben* (Findlay et al., 1997). Alcalóides de *N. lolii* em *L. perenne* são capazes de alterar o comportamento de insetos. Foram ensaiados vários destes alcalóides introduzidos em dietas de adultos do inseto *Heteronychus aratur*, um coleóptero. Peramina, lolitrem B, alcalóides do tipo lysergol, festuclavina e ácido lisérgico também não causaram efeitos em adultos do inseto. Ergovina causou efeitos moderados, mas ergotamina e ergovalina da família dos alcalóides do tipo ergot parecem ser os principais responsáveis pela resistência do hospedeiro *L. perenne* ao coleóptero (Ball et al., 1997b)

Recentemente, Miles et al. (1998) mostraram que isolados endofíticos de *Neotyphodium* sp. produzem N-formilonina e um análogo de paxilina no hospedeiro *Echinopogum ovatus*. Esses compostos apresentam atividade anti-inseticida contra *L. bonariensis* e outros insetos.

Como pode ser verificado, a grande maioria dos trabalhos relacionados à produção de toxinas tem sido realizada com gramíneas. Entretanto, Calhoun et al. (1992) pela primeira vez identificaram produtos tóxicos de fungos endofíticos em plantas lenhosas que eram capazes de alterar taxa de crescimento e mortalidade em larvas de *C. fumiferana*, atacando o pinheiro bálsamo. Os endófitos foram *Phyllosticta* e *Hormonema dematioides* e os compostos foram principalmente ácido heptelídico e rugulosina. Bills et al. (1992) também detectaram em uma lenhosa tropical, infectada com um fungo endofítico do gênero *Phomopsis*, a existência de toxinas tremorgênicas.

## Alterações genéticas e do ambiente no controle de insetos por microrganismos endofíticos

A expressão da resistência aos insetos pode ser afetada por diversos fatores, como quantidade dos aleloquímicos presentes, genótipo da planta (Breen, 1993a; 1993b), concentração de microrganismos endofíticos (Breen, 1992), fertilidade do solo e genótipo dos endófitos (Bacon, 1988; Breen, 1992; Christensen et al., 1991). Falta de água, temperatura, pH do solo, resistência dos insetos-praga e outros fatores podem afetar também a quantidade de endófitos e a concentração de toxinas. Breen (1994) idealizou um esquema com todas essas interações afetando a redução ou o aumento de resistência das plantas aos insetos-praga na presença de endófitos. Desta maneira, como já mencionado, em cada caso e situação podem ser encontrados resultados diversos. Algumas generalizações, entretanto, podem ser feitas, como por exemplo: o efeito dos endofíticos no controle de insetos é mais efetivo em pragas que se alimentam de folhas; outra generalização é que os resultados conseguidos com *L. perenne* são mais variáveis do que os obtidos em festuca, pois esta tem menos variabilidade que a primeira. Por exemplo, com relação a *F. arundinacea* e outras gramíneas, estudos com plantas sem e com *A. coenophialum* investigadas com relação ao ataque de dois coleópteros revelaram, em ambos os casos, que o ataque foi menor em *F. arundinacea* nos primeiros instares do inseto, mas depois houve bastante variação, indicando que existem muitos fatores que atuam no controle (Potter et al., 1992).

Com relação a alterações devidas aos nutrientes presentes no solo, especialmente fertilizantes nitrogenados, existem estudos que mostram que essas interações ocorrem e são bastante significativas. Arechavaleta et al. (1989) já haviam verificado que no endófito *A. coenophialum* de *F. arundinacea* a produção dos alcalóides do tipo dos ergopeptídeos aumenta com a presença de fertilizantes nitrogenados no solo e estresse hídrico moderado, o que conseqüentemente altera o controle de insetos-praga.

Um estudo sobre interação entre fertilização nitrogenada, pragas e o fungo endofítico *A. coenophialum* mostrou que, de modo geral, insetos como *S.*

*frugiperda* desenvolvem-se melhor em plantas com fertilizante nitrogenado sem o endófito. Entretanto, considerando este e outros insetos, a presença do *A. coenophialum* impede o seu desenvolvimento. Os resultados são bastante variáveis e não permitem estabelecer uma correlação que funcione em todos os casos, entre fertilizantes nitrogenados e endofíticos atuando nas pragas de *F. arundinacea* (Davidson & Potter, 1995). Da mesma forma, Bultman & Conard (1998) verificaram a interação entre diversos fatores, como nível de nutrientes, danos causados à planta hospedeira *F. arundinacea* e presença de fungos endofíticos, no controle de *S. frugiperda*. A massa pupal do inseto foi negativamente influenciada pelo endofítico em baixa quantidade de nutrientes, mas o efeito foi negligível em plantas com altos níveis de aplicação de fertilizantes. De qualquer forma, o estudo mostrou que as interações são complexas e influenciadas por vários fatores, no caso, pela aplicação de fertilizantes.

Estudos mais recentes, em condições de cultivo em hidroponia foram realizados por Richardson et al. (1999). Os autores verificaram que em *F. rubra* subsp. *commutata* cultivada no sistema de hidroponia haviam diferenças quando um endofítico estava presente ou não, com relação a acúmulo de produtos alcalóides e em presença de diferentes quantidades e tipos de fontes de nitrogênio. Conforme um ou outro caso, houve maior ou menor produção dos alcalóides ergovalina e peramina em plantas com endófitos, o que potencialmente deve alterar a sua resistência a insetos.

Clay (1996), em um estudo sobre alterações no ambiente em plantas com endófitos clavicipitáceos que produzem alcalóides, faz considerações sobre interações planta-endófito-herbívoros com insetos, mostrando que a presença do fungo pode auxiliar a competição entre o hospedeiro e outras plantas, afetando assim a estrutura e dinâmica das comunidades vegetais.

Outros tipos de interações, como a presença de gramínea principal (*Festuca* ou *Lolium*) e outras gramíneas presentes no ambiente, além de alterações decorrentes dessas interações com relação ao ataque de insetos e presença de fungos endofíticos, praticamente não haviam sido levadas em consideração até que Clay et al. (1993) realizaram pesquisas nesse sentido. Esses autores

verificaram efeitos de espécies de fungos endofíticos do gênero *Acremonium* em relação ao ataque por larvas de *S. frugiperda* em *F. arundinacea* e *F. rubra*, cultivadas isoladamente ou misturadas com outras gramíneas. Em geral, o ataque de insetos foi menor em hospedeiros com endófitos, pois as plantas eram menos preferidas pelas pragas; ocorreram, entretanto, diferentes graus de ataque pelos insetos, de acordo com as associações de vegetais presentes. Esses estudos demonstram que interações entre plantas alteram os efeitos de fungos endofíticos com relação ao controle de insetos.

## Ocorrência de fungos entomopatogênicos endofíticos e sua inoculação em plantas

Já é fato amplamente conhecido que existem fungos e bactérias que são capazes de causar doenças em insetos. Espécies de fungos como *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, entre outras, são bastante usadas no controle biológico de insetos-praga da agricultura. Exemplos podem ser encontrados nos livros de Lecuona (1996), Alves (1998) e Melo e Azevedo (1998). Se esses fungos existirem no interior de plantas como endofíticos, evidentemente eles poderão também atuar no controle de insetos. Mesmo a sua ausência pode ser contornada, se for possível sua inoculação artificial em plantas e sua manutenção nelas. Também fungos endofíticos, apesar de não colonizarem insetos causando doenças, podem atuar não apenas como controladores naturais de pragas, como está sendo visto ao longo desta revisão, mas em um verdadeiro controle biológico, se forem artificialmente inoculados em plantas e exercerem um controle efetivo de pragas. Infelizmente, os trabalhos nessa promissora linha de pesquisa são poucos e a grande maioria, como sempre, é realizada em condições de clima temperado, nas quais o problema de controle de pragas agrícolas não é tão premente como em culturas de clima tropical.

Clay (1989), em revisão sobre a possibilidade do uso dirigido de fungos endofíticos no controle de insetos, salienta que o biocontrole pode ser potencializado por inoculação artificial, cujas técnicas iniciadas por Latch & Christensen (1985) e depois por Leuchtman & Clay (1988) facilitaram o emprego

de um controle biológico de insetos.

Como fungos endofíticos, principalmente os do gênero *Acremonium*, são controladores de alguns insetos-praga, é importante saber se eles podem ser inoculados em plantas livres de endófitos e transmitir a elas a capacidade de se tornarem resistentes a certas pragas. Foi o que fizeram com sucesso Koga et al. (1997), transferindo o endófito *Acremonium* para *F. arundinacea* e *L. perenne*. Conseguiram, assim, transmitir via semente a capacidade dessas plantas controlarem o inseto *P. teterrella*.

Da mesma forma, Pereira et al. (1999) em bananeira, inocularam artificialmente fungos endofíticos com marcadores genéticos de resistência a determinados fungicidas e verificaram que não apenas a inoculação era eficiente, como também os fungos foram mantidos em competição com outros não-mutados. Isso demonstra que a inoculação de linhagens de valor no controle biológico poderá não apenas ser praticada com sucesso, mas que o microrganismo modificado, uma vez inoculado, mantém-se no hospedeiro, podendo coexistir e até superar linhagens selvagens da mesma espécie.

Um ponto importante, pelo menos em gramíneas, reside no fato de que várias espécies de fungos podem ser transferidas por meio de sementes, o que torna o biocontrole praticamente "hereditário", capaz de passar para os descendentes. Existem trabalhos que mostram a importância de fungos endofíticos presentes em sementes, no controle de insetos. Knoch et al., em 1993, verificaram em *F. arundinacea*, na qual fungos endofíticos como *A. coenophialum* são transmitidos via sementes, que as formigas, na maioria dos casos, preferem coletar sementes livres de fungos, evitando aquelas que são portadoras de microrganismos endofíticos. Mesmo sementes coletadas com fungos são depois desprezadas, o que favorece a sua dispersão e germinação.

Fungos entomopatogênicos podem ser colocados dentro de plantas. Esse procedimento foi feito em milho (Bing & Lewis, 1991; 1992a; 1992b) para verificar a possibilidade de, dessa maneira, atuando como um endofítico, o fungo seria capaz de controlar o inseto da broca européia do milho (*Ostrinia nubilalis*). *Beauveria bassiana* foi inoculada por injeção e por aspersão foliar e foi detectada

como endofítica, colonizando várias partes da planta e impedindo o ataque da lagarta em alguns estágios de seu crescimento. Das plantas injetadas com *B. bassiana*, 95% foram colonizadas pelo fungo e 98,3% das aspergidas também o foram. Um importante achado foi o de que em 33,3% das plantas não-tratadas foi encontrado o fungo, indicando que a colonização ocorre também naturalmente. Os autores não determinaram o processo de como *B. bassiana* penetra no vegetal, mas sugeriram que a movimentação no interior da planta é passiva, ocorrendo no seu sistema vascular. Também mostraram que não é o inseto infectado que transmite o fungo, pois plantas sem ataque de *O. nubilalis* podiam conter *B. bassiana* como endofítico. Bing & Lewis (1993) referem-se também ao fato de que o fungo entomopatogênico *B. bassiana* vem sendo usado há longo tempo no controle da broca européia do milho, *O. nubilalis*, e que esse fungo, como já mencionado, é isolado como endofítico no interior de plantas de milho. Isto poderia explicar a supressão da praga em certas estações do ano, correlacionada com a presença de *B. bassiana* na fase de senescência do milho (Lewis & Bing, 1991). Também fungos entomopatogênicos têm sido isolados de outros vegetais, como casca da planta *Carpinus caroliniana* (Bills & Polishook, 1991).

Como conclusão, o controle biológico de insetos pelo emprego de endófitos, embora esteja em fase inicial, é promissor. Principalmente o uso da tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética veio dar uma nova dimensão ao processo. Mais detalhes sobre este procedimento serão discutidos em um item especial neste mesmo capítulo.

## **Outras interações entre microrganismos endofíticos afetando o controle de insetos**

Seria ingênuo supor que fungos que habitam o interior de plantas, como os endofíticos, interajam com o hospedeiro e com os insetos-praga de maneira simples e independentemente das condições ambientais, dos diferentes genótipos dos participantes envolvidos e de outros fatores, como aliás já foi mencionado em item anterior. Ocorrem, assim, efeitos indiretos dos mais diferentes tipos. Alguns deles serão discutidos a seguir.

## Efeitos de fungos endofíticos em parasitóides e ectoparasitas de animais domésticos

Kirfman et al. (1986) já haviam sugerido que a eliminação de fungos endofíticos, produtores de toxinas que causam danos em animais domésticos, e insetos que se alimentam de plantas infectadas poderia ter efeitos benéficos para o gado, mas poderia causar efeitos negativos, como por exemplo, o aumento da incidência de alguns insetos-praga e a diminuição de outros, com desequilíbrios biológicos imprevisíveis.

Dessa maneira, é importante verificar se os endofíticos que reduzem a ação de insetos-praga também não interferem com seus controladores biológicos. Foi o que fizeram Barker & Addison (1996, 1997) com experimentos de laboratório em *Microctonus hyperodae*, um himenóptero controlador de *L. bonariensis*. De fato, *A. lolii* infectando *L. perenne* não atuou no controlador biológico e até facilitou sua atuação em controlar a praga quando ela era alimentada também com *Lolium* infectado pelo endófito. Em alguns casos, entretanto, o desenvolvimento das larvas do parasitóide foi retardado em hospedeiros que haviam sido alimentados com dieta artificial contendo diterpenos, alcalóides normalmente produzidos por *A. lolii*. Do mesmo modo, Bultman et al. (1997) estudaram em *F. arundinacea*, infectada com *A. coenophialum*, uma possível interferência dos alcalóides produzidos pelo fungo não apenas na praga *S. frugiperda*, mas também em dois parasitóides que controlam essa praga, ou seja, *Euplectrus comstockii* e *E. plathypenae*. De modo geral, foi constatado que o fungo tem apenas um efeito moderadamente negativo nos parasitóides que se instalam nas larvas da praga. A massa pupal dos parasitóides sofre decréscimo, mas não as taxas de desenvolvimento e sobrevivência.

Um outro efeito indireto dos fungos endofíticos é bastante interessante do ponto de vista aplicado é o controle de ectoparasitas de animais domésticos. Larvas de *Haematobia irritans*, conhecida como mosca de chifre, uma espécie de ectoparasita do gado bovino, foram mortas quando crescendo em esterco bovino suplementado com extrato de sementes da planta, infectados com *N. coenophialum*. O extrato continha lolinas (Dougherty et al., 1998). Esses efeitos

possivelmente também ocorrem em insetos que utilizam esterco de animais alimentados com *F. arundinacea* infectada pelo endófito *N. coenophialum*.

### Efeitos indiretos no controle de doenças por eliminação de insetos vetores e formação de galhas por insetos-praga

O primeiro trabalho que mostrou a importância dos fungos endofíticos no controle de pragas agrícolas curiosamente foi também uma demonstração indireta de que um fungo endofítico, impedindo a formação de galhas de insetos, também pode controlar uma doença causada por um fungo fitopatogênico em olmeiro (Webber, 1981). Da mesma maneira, Carroll (1986) sugere que o fungo *P. oblonga* é o responsável pela redução na disseminação do fungo fitopatogênico *Ceratocystis ulmi*, pois impedindo a instalação de galhas no olmeiro, impede também a instalação da doença. Vários outros casos nos quais fungos endofíticos impedem ou alteram a instalação de larvas de insetos potencialmente vetores de doenças foram também objeto de estudos.

Hata & Futai (1995) estudaram a micobiota endofítica de galhas de *Thecodiplosis japonensis* em *Pinus*. O fungo endofítico *Phialocephala* sp. foi o mais comumente encontrado. Entretanto, endofíticos não foram isolados de galhas jovens, sugerindo que eles não devem ter sido inoculados através dos insetos. Nesses casos, pode-se comprovar que o inseto não é um vetor de fungos endofíticos, mas, por outro lado, nada impede que ele possa transmitir fungos fitopatogênicos.

Um outro interessante efeito de endófitos sobre galhas de insetos foi observado em carvalho, no qual fungos endofíticos aparentemente dormentes tornam-se ativos em presença de galhas e, destruindo as folhas, matam também os insetos, protegendo, assim, os seus hospedeiros. Esse processo foi descrito em três associações de endófitos com insetos, uma delas entre o fungo *Gloeosporium quercinum* e o inseto *Neuroterus numismalis* (Butin, 1992).

## Efeitos na disseminação de sementes e proteção de plantas

Já foi mencionado que fungos endofíticos podem ter um efeito indireto na disseminação de sementes por insetos, especialmente as formigas. Em festuca, sementes infectadas com determinados endófitos são desprezadas depois de coletadas, o que favorece sua dispersão (Knoch et al., 1993).

Em mais um caso estudado (Valentine et al., 1992), em um cultivar de *L. perenne* com dois tipos de sementes, um com 88% e outro com apenas 1% do endófito *A. lolii*, foram mostradas diferenças significativas em experimentos realizados em casa de vegetação quanto ao número de ovos, larvas e adultos existentes. Eles foram encontrados em muito maior número em plantas provenientes de sementes sem endófito comparativamente com as sementes que possuíam o endófito. Dessa maneira, uma vez instalados em sementes, os endófitos protegem o hospedeiro contra *L. bonariensis*.

A passagem de um fungo de uma geração para outra pelas sementes apresenta uma enorme importância para o controle de insetos-praga, como mencionado por Clay (1989), o que também já foi salientado na presente revisão. A inoculação de fungos endofíticos em sementes, à semelhança do que é feito com bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos, pode abrir novos campos na aplicação de microrganismos endofíticos no controle de pestes agrícolas. Já existem estudos nessa área e eles serão discutidos mais adiante quando for abordado o papel da tecnologia do DNA recombinante em microrganismos endofíticos visando ao controle de pragas.

## Efeitos na fisiologia da planta hospedeira afetando o controle de insetos

Em certos vegetais, a produção de toxinas não é unicamente função existente nos fungos endofíticos. Há uma interação fungo-planta afetando essa produção e toxinas podem ser formadas e se espalharem pelo hospedeiro. Isso evidentemente pode ocasionar um controle de insetos, mesmo na ausência de um endófito no local de ataque da praga. O desenvolvimento e a nutrição de larvas da mariposa *Plutella xylostella* foram estudados em brassicas, em

laboratório. As larvas foram afetadas por ingestão de folhas antes que o fungo endófito *Acremonium alternatum* atingisse essas folhas. Houve também diferenças na eficiência de utilização de alimentos por fêmeas e machos do inseto. Os resultados devem estar relacionados com o metabolismo de fitosterol nas plantas e indicam que fungos endófitos que existem no solo podem, mesmo por meio de uma tênue interação, influir nas relações entre insetos e plantas (Raps & Vidal, 1998). Além disso, níveis de alcalóides e outras toxinas podem ser alterados não só quantitativamente como qualitativamente, de acordo com o estado fisiológico da planta. Como os fungos endófitos são importantes no controle de insetos, mas também podem causar, pela produção de alcalóides e micotoxinas, problemas no gado que se alimenta das plantas que os contêm, foi feito um estudo em *L. perenne* infectado por *N. lolii* que produz o alcalóide peramina, o mais importante no controle da praga *L. bonariensis*. Foi verificado em oito diferentes associações de fungo-planta que, com a idade, a quantidade de peramina decresce nas folhas e na fase de inflorescência das plantas, a peramina atinge seus níveis de concentração mais baixos (Ball et al., 1997a). Outras interações aparentemente simples podem ocorrer; *E. typhina* produz estromas em colmos de plantas hospedeiras, o que ocasiona um aumento da transpiração pelos estromas. Essa alteração reduz o ataque por insetos herbívoros (White et al., 1993).

### **Utilização direcionada dos microrganismos endófitos: a tecnologia do DNA recombinante**

A presença ou ausência de microrganismos endófitos em vegetais é de extrema importância para a proteção dos hospedeiros contra ataque de insetos, como abordado no presente capítulo e também como pode ser verificado pela extensa literatura no controle de moléstias vegetais causadas por bactérias, fungos e nematóides. Com relação aos insetos, algumas aplicações por inoculação de microrganismos endófitos já foram mencionadas acima, tais como sua introdução em sementes ou em plantas, como por exemplo, microrganismos entomopatogênicos, que atuarão, dessa maneira, protegendo a planta e

disseminando-se entre as pragas, causando sua redução em número. Também, pela infestação de uma planta por insetos, especialmente afídeos, fica possível monitorar a presença de toxinas no interior dessas plantas, o que é importante quando se consideram gramíneas forrageiras (Eichenser & Dahlman, 1992). Finalmente, programas de melhoramento têm sido conduzidos e neles procura-se associar variedades de plantas melhoradas com presença de microrganismos endofíticos que atuem eficientemente no controle de pragas, mas que não prejudiquem o gado que vai se alimentar dessas plantas (Saha et al., 1987). Todos esses aspectos aplicados foram e estão sendo ainda timidamente atacados por grupos de pesquisa e, quando feitos, o são por grupos e plantas de países de clima temperado. Evidentemente, resultados mais promissores devem ser esperados, quando aplicados em plantas de clima tropical que apresentam uma diversidade e incidência de pragas muito maior. Mais recentemente, a tecnologia do DNA recombinante está sendo empregada para uma manipulação genética de microrganismos endofíticos visando à introdução de novas características genéticas de interesse agrônômico e inclusive visando ao controle biológico de pragas agrícolas. Esses estudos que estão sendo realizados para controle de insetos serão agora abordados.

Talvez o primeiro trabalho direcionado à introdução de um gene por tecnologia do DNA recombinante em um microrganismo endofítico visando ao controle de insetos foi descrito por Fahey, em 1988. Como membro da equipe de uma empresa de biotecnologia, a Crop Genetics International, ele descreve os passos para construir e utilizar uma bactéria, a *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, para obtenção de um produto comercial que foi chamado de "Incide" (composto pelos termos "in" = dentro e "cide" = matar). Essa bactéria recebeu um gene de outra bactéria, o *Bacillus thuringiensis*, produtor de toxinas ativas contra insetos, especialmente lepidópteros e coleópteros. Dessa maneira, a bactéria modificada geneticamente produz toxina. Introduzida na planta hospedeira, ela atua protegendo a planta contra o ataque de insetos suscetíveis a essa toxina. O autor cita várias vantagens do processo de inoculação dessa bactéria em plantas de milho para torná-las resistentes aos insetos, tais como: a) para ser usado, o

produto requer uma única aplicação em sementes ou aspersão em plantas jovens; b) o produto não requer inoculação de doses elevadas de bactérias, pois elas se multiplicam após a aplicação; c) a bactéria modificada geneticamente fica restrita e mantida dentro da planta, não havendo, portanto, disseminação do microrganismo engenheirado; d) o processo não produz resíduos tóxicos; e) este e outros produtos semelhantes requerem um tempo menor para seu desenvolvimento tecnológico, pois é mais fácil modificar um microrganismo do que uma planta; f) o microrganismo engenheirado não é transmitido via semente, de modo que fica contido na planta e, do ponto de vista de uma empresa de biotecnologia, ele tem que ser adquirido e inoculado em novas sementes usadas em plantios; g) o processo tem ampla aplicabilidade, pois pode ser usado para diferentes espécies de plantas; h) a multiplicação da bactéria no interior da planta é alta, pois foram detectadas até  $10^8$  bactérias por grama da planta inoculada.

Como se verifica, a quantidade de células bacterianas endofíticas dentro de um hospedeiro pode ser muito grande, o que inclusive pode dar resultados falso-positivos quando se faz transformação em plantas. É, por exemplo, o caso de Tor et al. (1992) que, estudando transformação em plantas do gênero *Discorea*, que compreende o cará ou inhame, pela introdução do gene *GUS*, verificaram que eram as bactérias endofíticas da planta que apresentavam a atividade *GUS* e não a planta hospedeira.

Como se verifica, o melhor modelo estudado até o momento é o da bactéria endofítica gram positiva *C. xyli* subsp. *cynodontis*, que ocorre no xilema de várias espécies vegetais. Por exemplo, Turner et al. (1991) introduziram o plasmídeo pCG610 com segmento de *C. xyli* subsp. *cynodontis*, que se integrou em seqüência homóloga do cromossomo da bactéria. Além disso, o plasmídeo continha duas cópias do gene *CryIA(c)* produtor de endotoxina de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Verificaram a instabilidade do sistema e, nesse trabalho, discutiram os riscos e a possibilidade de utilização do processo, controlando insetos. Um vetor de expressão foi construído para essa bactéria, expressando o gene *cryA(c)* de *B. thuringiensis*. Esse gene codifica uma proteína com atividade inseticida contra vários insetos, entre eles *O. nubilalis*, a broca européia do milho

(Fahey et al., 1991; Tomasino et al., 1995). Se essa bactéria alterada geneticamente for inoculada em sementes ou plântulas de milho, ocorrem plantas adultas com maior resistência a *O. nubilalis*. Da mesma maneira, o gene que codifica a enzima endoglucanase foi introduzido em *C. xyli* e os transformantes foram bastante estáveis e mantiveram-se estáveis no xilema do milho, demonstrando a potencialidade do uso de microrganismos geneticamente modificados por tecnologia do DNA recombinante no controle biológico de pragas e moléstias, pelo menos em milho (Haapalainen et al., 1998).

Tester (1992) inoculou plantas de milho com 18 dias de idade com *C. xyli* possuindo gene de endotoxina de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e utilizou como testemunha plantas inoculadas com a bactéria selvagem. Verificou que, em ambos os casos, a quantidade de nitrogênio foi aumentada, mas as plantas com a bactéria engenheirada possuíam mais água. No solo, os resíduos das duas plantas, com e sem bactéria engenheirada, não foram diferentes. Foi verificado também que a bactéria geneticamente modificada não era capaz de sobreviver fora da planta, o que torna o produto bastante apropriado do ponto de vista da biossegurança.

Lampel et al. (1994), como nos casos anteriores, também introduziram em *C. xyli* subsp. *cynodontis* o gene *cryIA(c)*. Em bioensaios, as bactérias possuíam atividade inseticida contra a broca europeia do milho, embora algumas delas perdessem o gene, o que pode representar um problema no controle biológico, como foi salientado pelos autores. A construção de vetores de secreção foi também efetuada por Uratani et al. (1995) para permitir a secreção de proteínas na bactéria endofítica *C. xyli* subsp. *cynodontis*. Testes de campo foram efetuados em milho com a bactéria contendo o gene *cryIA(a)* para avaliar o controle da broca europeia do milho (Tomasino et al., 1995).

Além da *C. xyli*, a introdução de genes de *B. thuringiensis* foi também realizada com bactérias fixadoras de nitrogênio, como as do gênero *Bradyrhizobium*. Nesse caso, a introdução de gene produtor de toxina em bactéria fixadora de nitrogênio e posterior inoculação em *Cajanus cajan*, além de facilitar a fixação do nitrogênio atmosférico, conferiu à planta hospedeira resistência a

larvas do inseto *Rivelia angulata* (Nambiar et al., 1990). Algumas revisões sobre o uso de bactérias e fungos endofíticos geneticamente manipulados podem ser consultadas para mais detalhes sobre o assunto (Di Fiore & Del Gallo, 1995; Hallman et al., 1997; Azevedo, 1998).

Embora em bactérias haja mais dados publicados, como verificado acima, com relação aos fungos endofíticos, os trabalhos envolvendo a tecnologia do DNA recombinante restringem-se mais ao estudo de sistemas de transformação genética, introdução de alguns genes e posterior inoculação dos fungos nos hospedeiros apropriados. Já no início dos anos 90, em revisão sobre fungos endofíticos do gênero *Acremonium*, Van-Heeswijck & McDonald (1992) preconizavam o uso de linhagens de fungos endofíticos elite ou modificados por engenharia genética no controle de insetos e de moléstias que incidem sobre gramíneas como *L. perenne*. De fato, vários modelos têm sido desenvolvidos visando a alterar geneticamente um fungo endofítico para depois reintroduzi-lo em plantas, favorecendo o controle de pestes. Estudos procurando obter transformantes com genes repórteres em fungos endofíticos foram feitos por Murray et al. (1992), que utilizaram uma linhagem de *Acremonium* designada de 187B, que não produzia a toxina lolitrem B e, portanto, era apropriada para ser reintroduzida em planta hospedeira. Esse fungo recebeu o gene da beta-glucoronidase (*Gus*) e o número de transformantes foi de cerca de 700-800 por micrograma de DNA. O fungo transformado foi reintroduzido em *Lolium* e foi verificada a expressão do gene *Gus* no interior do hospedeiro, mostrando ser o processo apropriado para introdução de genes por meio de endófitos em plantas. Da mesma forma, Tsai et al. (1992) padronizaram a técnica de transformação para *A. coenophialum*.

Vários genes de fungos endofíticos relacionados à produção de toxinas estão sendo clonados e estudados com maior profundidade. Wang et al. (1999) clonaram o gene da DMATsintase (dimetilail triptofano sintase), responsável pelo primeiro passo da síntese de ergot no fungo *Claviceps purpurea*. Conhecida a seqüência de nucleotídios desse gene, foi verificado que nos fungos endofíticos *Balansia obtecta*, que produz ergobalansina, e *Neotyphodium* spp., que produz

ergovalina, genes correspondentes ao clonado também ocorrem. Outro gene para a produção de peptídio sintase também foi estudado, envolvendo o passo final da síntese de ergot. Tudzynski et al. (1999) também clonaram o gene DMATS de *C. purpurea*, responsável por um dos passos na produção do alcalóide ergot *in planta*. Outros genes do agregado gênico foram estudados; assim, vão sendo desvendados os genes envolvidos e seu papel na produção de alcalóides do tipo ergot. Young et al. (1999) também clonaram um agregado gênico contendo genes para a síntese de micotoxinas, como paxilina e lolitrem B de fungos endofíticos como o *Epichloë*.

Em nossos laboratórios na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, já há alguns anos estão sendo desenvolvidos estudos com microrganismos endofíticos isolados de bananeiras, milho e plantas cítricas, entre outras. Sistemas de transformação eficientes foram estabelecidos para alguns destes microrganismos endofíticos e também protocolos de introdução de microrganismos endofíticos em plantas estão bem definidos. Esses são estudos pioneiros referentes à manipulação genética em microrganismos endofíticos de plantas tropicais (Longo, 1996; Pamphile et al., 1997; Glienke-Blanco, 1999; Pereira et al., 1999; Gai et al., 1999). Sua utilização no controle de pestes agrícolas pode ser uma alternativa para a redução do uso de compostos químicos na agricultura.

## Considerações finais

Embora descritos no século XIX, os microrganismos endofíticos só vieram a ser melhor estudados a partir do final dos anos 70. Em cerca de 20 anos, o potencial dos endófitos no controle de pestes agrícolas foi reconhecido e a presente revisão é uma amostra de que, embora muito já tenha sido feito, há um enorme caminho a percorrer. Basta examinar as referências aqui citadas e a recente revisão de Azevedo et al. (2000) para se constatar que praticamente nada foi feito com relação ao controle de pragas agrícolas exercido por microrganismos endofíticos, em espécies tropicais. Esse é um vasto campo aguardando ser desbravado. O que se espera é que, com maior diversidade inerente

aos trópicos, novas formas de controle e novos microrganismos endofíticos de utilidade sejam descobertos e descritos. Considerando-se a enorme biodiversidade existente em nosso país e os danos causados por insetos em culturas tropicais, essa é uma área de pesquisa prioritária que deverá, se bem explorada, produzir um retorno não só em termos científicos como também biotecnológicos, com evidentes vantagens do ponto de vista ecológico, social e econômico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, S.; GOVINDARAJAN, S.; FUNK, C. R.; JOHNSON-CICALESE, J. M. Fatality of house crickets on perennial ryegrass infected with a fungal endophyte. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 39, p.183-190, 1985.
- AHMAD, S.; GOVINDARAJAN, S.; JOHNSON-CICALESE, J. M.; FUNK, C. R. Association of a fungal endophyte in perennial ryegrass with antibiosis to larvae of the southern armyworm, *Spodoptera eridania*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 43, p.287-294, 1987.
- AHMAD, S.; JOHNSON-CICALESE, J. M.; DICKSON, W. K.; FUNK, C. R. Endophyte-enhanced resistance in perennial ryegrass to the bluegrass billbug *Sphenophorus parvulus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.41, p.3-10, 1986.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998. 1163p.
- ARECHAVALETA, M.; BACON, C. W.; HOVELAND C. S.; RADCLIFE, D. E. Effects of tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agronomy Journal*, v.81, p. 83-90, 1989.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L., ed. **Ecologia microbiana**. Jaguaruina: Embrapa Meio Ambiente, 1998. p.117-137.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR; W. PEREIRA, J.O.; ARAUJO, E.L. Endophytic microorganism : a televon insect control and recent advances on tropical plants. EJB: ELETTRONIC JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY (on line) IS April 2000 v. 3, n.1 (cited 21 April 2000) Available on web: <http://www.eij.org/content/vol3/issue1/full1/index.html>.issn-ca 0717-3458
- BACON, C. W. Procedure for isolating the endophyte from tall fescue and screening isolates from ergot alkaloids. *Applied and Environmental Microbiology*, v.54, p.2615-2618, 1988.
- BACON, C. W.; HILLS, N. S. Symptomless grass endophytes: products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptation of grasses. In: REDLIN, S.C.; CARRIS, L. M., ed. **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 1996. p.155-178.
- BACON, C. W.; PORTER, J. K.; ROBINS, J. D.; LUTTRELL, E. S. *Epichloë typhifera* from toxic tall fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology*, v.34, p.576-581, 1977.
- BALL, O. J. P.; BARKER, G. M.; PRESTIDGE, R. A.; LAUREN, D. R. Distribution and accumulation of the alkaloid peramine in *Neotyphodium lolii*-infected perennial ryegrass. *Journal of Chemical Ecology*, v. 23, p.1419-1434, 1997 a.
- BALL, O. J. P.; MILES, C. O.; PRESTIDGE, R. A. Ergopeptide alkaloids and *Neotyphodium lolii*-mediated resistance in perennial ryegrass against adult *Heteronychnus arator* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Economic Entomology*, v.90, p.1382-1391, 1997b.
- BARKER, G. M.; POTTINGER, R. P.; ADDISON, P. J.; PRESTIDGE, R. A. Effect of *Lolium* endophyte fungus infection on behaviour of adult Argentine stem weevil. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v.27, p.271-277, 1984.

- BARKER, G. M.; ADDISON, P. J. Influence of clavicipitaceous endophyte infection in ryegrass on development of the parasitoid *Microctonus hyperodae* loai (Hymenoptera: Braconidae) in *Listronotus bonariensis* (Kuschel) (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**, v.6, p.281-287, 1996.
- BARKER, G. M.; ADDISON, P. J. Clavicipitaceous endophytic infection in ryegrass influences attack rate of the parasitoid *Microctonus hyperodae* (Hymenoptera: Braconidae, Euphorinae) in *Listronotus bonariensis* (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, v.26, p.416-420, 1997.
- BILLS, G. F.; GAICOBBE, R. A.; LEE, S. H.; PELÁEZ, F.; KACZ, J. S. Tremorgenic mycotoxins paspalitrem A and C, from a tropical *Phomopsis*. **Mycological Research**, v.96, p.977-983, 1992.
- BILLS, G. F.; POLISHOOK, J. D. Microfungi from *Carpinus caroliniana*. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.1477-1482, 1991.
- BING, L. A.; LEWIS, L. C. Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. **Environmental Entomology**, v.20, p.1207-1211, 1991.
- BING, L. A.; LEWIS, L. C. Temporal relationships between *Zea mays*, *Ostrinia nubilalis* (Lep.: Pyralidae) and endophytic *Beauveria bassiana*. **Entomophaga**, v.37, p.525-536, 1992 a.
- BING, L. A.; LEWIS, L. C. Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner). **Biocontrol Science and Technology**, v.2, p.39-47, 1992b.
- BING, L. A.; LEWIS, L. C. Occurrence of the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. and virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hübner). **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.45, p.147-156, 1993.
- BREEN, J. P. Temperature and seasonal effects on expression of *Acremonium* endophyte-enhanced resistance to *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). **Environmental Entomology**, v.21, p.68-74, 1992.
- BREEN, J. P. Enhanced resistance to fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in *Acremonium* endophyte-infected turfgrasses. **Journal of Economic Entomology**, v.86, p.621-629, 1993a.
- BREEN, J. P. Enhanced resistance to three species of aphids (Homoptera: aphididae) in *Acremonium* endophyte-infected turfgrasses. **Journal of Economic Entomology**, v.86, p.1279-1286, 1993b.
- BREEN, J. P. *Acremonium*-endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. **Annual Review of Entomology**, v.39, p.401-423, 1994.
- BULTMAN, T. L.; BOROWICZ, K. L.; SCNEBLE, R. M.; COULDRON, T. A.; BUSH, L. P. Effect of a fungal endophyte on the growth and survival of two *Euplectrus* parasitoids. **Oikos**, v.78, p.170-176, 1997.
- BULTMAN, T. L.; CONARD, N. J. Effects of endophytic fungus, nutrient level and plant damage on performance of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, v.27, p.631-635, 1998.
- BUTIN, H. Effect of endophytic fungi from oak (*Quercus rubor*, L.) on mortality of leaf inhabiting gall insects. **European Journal of Forest Pathology**, v.22, p.237-246, 1992.
- CALHOUN, L. A.; FINDLAY, J. A.; MILLER, J. D.; WHITNEY, N. J. Metabolites toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes. **Mycological Research**, v.96, p.281-286, 1992.
- CARRIERE, Y.; BOUCHARD, A.; BOURASSA, S.; BRODEUR, J. Effect of endophyte incidence in perennial ryegrass on distribution, host-choice and performance of the hairy chinch bug (Hemiptera: Lygaeidae). **Journal of Economic Entomology**, v.63, p.324-328, 1997.
- CARROLL, G. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N. J.; VAN DER HEAVEL, J., ed. **Microbiology of the phylloplane**. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. p.205-222.
- CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogens to mutualistic symbionts. **Ecology**, v.69, p.2-9, 1988.
- CARROLL, G. Fungal associates a woody plants as insect antagonists in leaves and stems. In: BEARBOSA, P.; KRISCHIK, V. A.; JONES, C. G., ed. **Microbial mediation of plant-herbivore interactions**. New York: John Wiley & Sons, 1991. p.253-271.

- CARROLL, G. Forest endophytes: pattern and process. *Canadian Journal of Botany*, v.73, suppl. 1, p. S1316-S1324, 1995.
- CHEPLICK, G. P.; CLAY, K. Acquired chemical defenses in grasses: the role of fungal endophytes. *Oikos*, v.52, p.309-318, 1988.
- CHRISTENSEN, M. J.; LATCH, G. C. M.; TAPPER, B. A. Variation within isolates of *Acremonium* endophytes from perennial ryegrass. *Mycological Research*, v.95, p.988-923, 1991.
- CLARK, C. L.; MILLER, J.D.; WHITNEY, N. L. Toxicity of conifer needle endophytes to spruce budworm. *Mycological Research*, v.93, p.508-512, 1989.
- CLAY, K. Fungal endophytes of grasses. A defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*, v.69, p.10-16, 1988a.
- CLAY, K. Fungal endophytes of grasses. Their potential as biocontrol agents. *Mycological Research*, v.92, p.1-12, 1988b.
- CLAY, K. Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potential as biocontrol agents. *Mycological Research*, v.93, p.1-12, 1989.
- CLAY, K. Interactions among fungal endophytes, grasses and herbivores. *Researches on Population Ecology*, v.38, p.191-201, 1996.
- CLAY, K.; HARDY, T. N.; HAMMOND JR., A. M. Fungal endophytes of *Cyperus* and their effect on the insect herbivore. *American Journal of Botany*, v.72, p.1284-1289, 1985a.
- CLAY, K.; HARDY, T. N.; HAMMOND JR., A. M. Fungal endophytes of grasses and their effects on an insect herbivore. *Oecologia*, v.66, p.1-6, 1985b.
- CLAY, K.; MARKS, S.; CHEPLICK, G. P. Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. *Ecology*, v.74, p.1767-1777, 1993.
- CLAYDON, N.; GROVE, J. F.; POPE, M. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. *Phytochemistry*, v.24, p. 937-943, 1985.
- CLEMENT, S. L.; LESTER, D. G.; WILSON, A. D.; PIKE, K. S. Behavior and performance of *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae) on fungal endophyte-infected and uninfected perennial ryegrass. *Journal of Economic Entomology*, v. 85, p. 583-588, 1992.
- CLEMENT, S. L.; PIKE, K. S.; KAISER, W. J.; WILSON, A. D. Resistance of endophyte-infected plants of tall fescue and perennial ryegrass to the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, v. 63, p. 646-648, 1990.
- CLEMENT, S.L.; WILSON, A. D.; LESTER, D. G.; DAVITT, C. M. Fungal endophytes of wild barley and their effects in *Diuraphis noxia* population development. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 82, p.275-281, 1997.
- CRUTCHFIELD, B. A.; POTTER, D. A. Preferences of Japanese beetle and southern masked chafer (Coleoptera:Scarabaeidae) grubs among cool-season turfgrasses. *Journal of Entomological Science*, v. 29, p.398-406, 1994.
- DAVIDSON, A. W.; POTTER, D. A. Response of plant-feeding predatory and soil-inhabiting invertebrates to *Acremonium* endophyte and nitrogen fertilization in tall fescue turf. *Journal of Economic Entomology*, v. 88, p.367-379, 1995.
- DI FIORE, S.; DEL GALLO, M. Endophytic bacteria: their possible role in the host plants. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; DE ZAMAROCZY, M., ed. *Azospirillum VI and related microorganisms*. Berlin: Springer Verlag, 1995. p.169-187.
- DOUGHERTY, C. T.; KNAPP, F. W.; BUSH, L. P.; MAUL, J. E.; VAN WILLIGEN, J. Mortality of horn fly (Diptera: Muscidae) larvae in bovine dung supplemented with loline alkaloids from tall fescue. *Journal of Medical Entomology*, v. 35, p. 798-803, 1998.
- EISENCHER, H.; DAHLMAN, D. L. Antibiotic and deterrent qualities of endophyte-infected tall fescue to two aphid species (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology*, v.21, p. 1046-1051, 1992
- FAETH, S. H.; HAMMON, K. E. Fungal endophytes and phytochemistry of oak foliage: determinantes of oviposition preference of leafminers? *Oecologia*, p.728-736, 1996.

- FAETH, S. H.; HAMMON, K. E. Fungal endophytes in oak trees: Long-term patterns of abundance and associations with leafminers. *Ecology*, v. 78, p. 810-819, 1997 a.
- FAETH, S. H.; HAMMON, K. E. Fungal endophytes in oak-trees: Experimental analysis of interactions with leafminers. *Ecology*, v.78, p. 820-827, 1997 b.
- FAHEY, J. W. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. In: BIOLOGICALLY active natural products. Washington: American Chemical Society, 1988. Chapter 9, p.120-128.
- FAHEY, J. W.; DIMOCK, M. B.; TOMASINO, S. F.; TAYLOR, J. M.; CARLSON, P. S. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: a case study in industry. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S., ed. *Microbial ecology of leaves*. New York: Springer-Verlag., 1991. p.402-411.
- FINDLAY, J. A.; BUTHELEZI, S.; LI, G. Q.; SEVECK, M.; MILLER, J. D. Insect toxins from an endophytic fungus from wintergreen. *Journal of Natural Products*, v.60, p.1214-1215, 1997.
- FOKKEMA, N. J.; VAN DEN HEUVEL, J., ed. *Microbiology of the phylloplane*. Cambridge: Cambridge University Press, 1986.
- FUNK, C. R.; HALISKY, P. M.; JOHNSON, M. C.; SIEGEL, M. R.; STEWART, A. V.; AHMAD, S.; HURLEY, R.; H.; HARVEY, I. C. An endophytic fungus and resistance to sod webworms: association in *Lolium perenne*. *Bio Technology*, v.1, p.189-191, 1983.
- GAI, C. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W.; MACCHERONI JR., W. Colonização de limão cravo *Citrus limonia* por leveduras e fungos endofíticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador, BA. Anais... Salvador: SBM, 1999. p.43.
- GAYNOR, D. L.; HUNT, W. F. The relationship between nitrogen supply, endophytic fungus and Argentine stem weevil resistance in ryegrass. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, v. 44, p. 257-263, 1983.
- GLIENKE-BLANCO, C. *Guignardia citricarpa* Kiely: análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro. Piracicaba: ESALQ-USP, 1999. 200p. Tese de Doutorado.
- HAAPALAINEN, M. L.; KOBETS, N.; PIRUZIAN, E.; METZLER, M. C. Integrative vector for stable transformation and expression of 1,3-glucanase gene in *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. *FEMS Microbiology Letters*, v.162, p. 1-7, 1998.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v.43, p.895-914, 1997.
- HARDY, T. N.; CLAY, K.; HAMMOND JR., A. M. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): A laboratory bioassay and larval preference study for the fungal endophyte of perennial ryegrass. *Journal of Economic Entomology*, v.78, p.571-575, 1985.
- HATA, K.; FUTAI, K. Endophytic fungi associated with healthy pine needles and needles infested by the pine needle gall midge *Thecodiplosis japonensis*. *Canadian Journal of Botany*, v. 73, p.384-390, 1995.
- ISAAC, S. *Fungal-plant interactions*. London: Chapman & Hall, 1992. 418p.
- JOHNSON, J. A.; WHITNEY, N. J. Cytotoxicity and insecticidal activity of endophytic fungi from black spruce (*Picea mariana*) needles. *Canadian Journal of Microbiology*, v.40, p. 24-27, 1994.
- JOHNSON, M. C.; DAHLMAN, L. D.; SIEGEL, M. R.; BUSH, L. P.; LATCH, G. C. M.; POTTER, D. A.; VARNEY, D. R. Insect feeding deterrents in endophyte-infected tall fescue. *Applied and Environmental Microbiology*, v.49, p.568-571, 1985.
- JU, Y.; SACALIS, J. N.; STILL, C. C. Bioactive flavonoids from endophyte-infected blue grass (*Poa ampla*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p. 3785-3788, 1998.
- KANDA, K.; HIRAI, Y.; KOGA, H.; HASEGAWA, K. Endophyte-enhanced resistance in perennial ryegrass and tall fescue to bluegrass webworm. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, v.38, p.141-145, 1994.
- KINDLER, D.; BREEN, J. P.; SPRINGER, T. Russian wheat aphid resistance in cool-season grasses. *Journal of Economic Entomology*, v.84, p.685-692, 1990.
- KIRFMAN, G. W.; BRANDENBURG, R. L.; GARNER, G. B. Relationship between insect abundance and endophyte infestation level in tall fescue in Missouri. *Journal of the Kansas Entomological Society*, v.59, p.552-554, 1986.

- KNOCH, T. R.; FAETH, S. H.; ARNOTT, D. L. Endophytic fungi alter foraging and dispersal by desert seed-harvesting ants. *Oecologia*, v. 95, p.470-473, 1993.
- KOGA, H.; HIRAI, Y.; KANDA, K.; TSUKIBOSHI, T.; UEMATSU, T. Successive transmission of resistance to bluegrass webworm to perennial ryegrass and tall fescue plants by artificial inoculation with *Acremonium* endophytes. *Japan Agricultural Research Quarterly*, v.31, p. 109-115, 1997.
- LAMPELL, J. S.; CANTER, G. L.; DIMOCK, M. B.; KELLY, J. L.; ANDERSON, J. J.; URATANI, B. B.; FOULKE JR., J.S.; TURNER, J. T. Integrative cloning expression and stability of the *CryIA(c)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p.501-508, 1994.
- LAPPALAINEN, J. H.; HELANDER, M. L. The role of foliar microfungi in mountain birch-insect herbivore relationships. *Ecography*, v. 20, p.116-122, 1997.
- LASOTA, J. A.; WALDVOGEL, M. G.; SHETLAR, D. J. Fungus found in galls of *Adelges abietis* (L.) (Homoptera: Adelgidae): identification within tree distribution and possible impact on insect survival. *Environmental Entomology*, v.12, p.245-246,1983.
- LATCH, G. C. M.; CHRISTENSEN, M. J. Artificial infections of grasses with endophytes. *Annals of Applied Biology*, v.107, p.17-24, 1985.
- LATCH, G. C. M.; CHRISTENSEN, M. J.; GAYNOR, D. L. Aphid detection of endophyte infection in tall fescue. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v.28, p.129-132, 1985a.
- LATCH, G. C. M.; HUNT, W. F.; MUSGRAVE, D. R. Endophytic fungi affect growth of perennial ryegrass. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v.28, p.165-168, 1985b.
- LECUONA, R. E. *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*. Castela: R.E. Lecuona Editor, 1996. 338p.
- LEUCHTMANN, A. Systematics, distribution, and host specificity of grass endophytes. *Natural Toxins*, v.1, p.150-162, 1992.
- LEUCHTMANN, A.; CLAY, K. Experimental infection of host grasses and sedges with *Atkinsonella hypoxylon* and *Balansia cyperii* (Balansiae, Clavicipitacea). *Mycologia*, v.80, p.299-297, 1988.
- LEWIS, G. C.; BING, L. A. *Bacillus thuringiensis* Berliner and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin for European corn borer control: Potential for immediate and season-long suppression. *Canadian Entomologist*, v.123, p.387-393, 1991.
- LEWIS, G. C.; CLEMENTS, R. O. A survey of ryegrass endophyte (*Acremonium loliae*) in the U. K. and its apparent ineffectuality on a seedling pest. *Journal of Agricultural Science*, v.107, p.633-638, 1986.
- LEWIS, G. C.; VAUGHAM, B. Evaluation of a fungal endophyte (*Neotyphodium lolii*) for control of leatherjackets (*Tipula spp.*) in perennial ryegrass. *Tests of Agrochemicals and Cultivars*, v.18, p.34-35, 1997.
- LONGO, A. C. *Transformação genética e variabilidade detectada por RAPD em isolados endofíticos de Colletotrichum musae*. Piracicaba: ESALQ-USP, 1996. 101p. Tese de Doutorado.
- MATHIAS, J. K.; RATXCLIFFE, R. H.; HELLMAN, J. L. Association of na endophytic fungus in perennial ryegrass and resistance to the hairy chinch bug (Hemiptera: Lygaeidae). *Journal of Economic Entomology*, v.83, p.1640-1646, 1990.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Controle biológico*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. v.1, 262p.
- MILES, C. O.; DIMENA, M. E.; JACOBS, S. W.L.; GARTHWAITE, I.; LANE, G. A.; PRESTIDGE, R. A.; MARSHAL, S. L.; WILKINSON, H. H.; SCHARDL, C. L.; BALL, O. J. P.; LATCH, C. M. Endophytic fungi in indigenous australasian grasses associated with toxicity to livestock. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, p.601-606, 1998.
- MILLER, J. D. Toxic metabolites of epiphytic and endophytic fungi of conifer needles. In: FOKKEMA, N.J.; VAN DEN HEUVEL, L., ed. *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. p.221-231.
- MUEGGE, M. A.; QUISENBERRY, S. S.; BATES, B. A.; JOOST, R. E. Influence of *Acremonium* infection and pesticide use on seasonal abundance of leafhoppers and froghoppers (Homoptera: Cicadellidae; Cercopidae) in tall fescue. *Environmental Entomology*, v.20, p.1531-1536, 1991.

- MURRAY, F. R.; LATCH, G. C. M.; SCOTT, D. B. Surrogate transformation of perennial ryegrass *Lolium perenne* using genetically modified *Acremonium* endophyte. **Molecular and General Genetics**, v.233, p.1-9, 1992.
- MURPHY, J. A.; SUN, S.; BETTS, L. L. Endophyte-enhanced resistance to billbug (Coleoptera: Curculionidae) sod webworm (Lepidoptera: Pyralidae) and white grub (Coleoptera: Scarabeidae) in tall fescue. **Environmental Entomology**, v.22, p.699-703, 1993.
- NAMBIAR, P. T. C.; MA, S. W.; IYER, V. N. Limiting and insect infestation of nitrogen-fixing root nodules of the Pigeon pea (*Cajanus cajan*) by engineering the expression of an entomocidal gene in its root nodules. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56 p.2866-2869, 1990.
- PAMPHILE, J. A.; AZEVEDO, J. L.; LANGUIN, T.; DABOUSII, M. J. Transformação de *Fusarium moniliforme* endofítico com o gene *gusA* e seu uso em estudos de colonização de raízes de milho. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, supl., p.296, 1997.
- PATTERSON, C. G.; POTTER, D. A.; FANNIN, F. F. Feeding deterrence of alkaloids from endophyte-infected grasses to Japanese beetle grubs. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.61, p.285, 1992.
- PEREIRA, J. O.; CARNEIRO-VIEIRA, M. L.; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.15, p.37-40, 1999.
- PETRINI, L.E.; PETRINI, O.; LAFLAMME, G. Recovery of endophytes of *Abiens balsamea* from needles and galls of *Paradiplosis tumifex*. **Phytoprotection**, v.70, p.97-103, 1989.
- POTTER, D. A.; PATTERSON, C. G.; REDMOND, C. T. Influence of turfgrass species and tall fescue endophyte on feeding ecology of Japanese beetle and southern masked chafer grubs (Coleoptera: scarabeidae). **Journal of Economic Entomology**, v.85, p.900-909, 1992.
- PRESTIDGE, R. A.; GALLAGHER, R. T. Endophyte confers resistance to ryegrass: Argentine stem weevil larval studies. **Ecological Entomology**, v.13, p.429-435, 1988.
- PRESTIDGE, R. A.; ZIJPP, S.; BADAN, D. Effects of Argentine stem weevil on pastures in Central Volcanic Plateau. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, v.12, p.323-331, 1984.
- RAPS, A.; VIDAL, S. Indirect effects of an unspecialized endophytic fungus on specialized plant-herbivorous interactions. **Oecologia**, v.114, p.541-547, 1998.
- REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. St. Paul: The American Phytopathological Society Press, 1996. 223p.
- RICHARDSON, M. D.; CABRERA, R. I.; MURPHY, J. A.; ZAUIROV, D. E. Nitrogen form and endophyte-infection effects on growth, nitrogen uptake and alkaloid content of chewing fescue turfgrass. **Journal of Plant Nutrition**, v.22, p.67-79, 1999.
- RIEDEL, W. E.; KIECKHEFER, R. E.; PETROSKI, R. J.; POWELL, R. G. Naturally- occurring and synthetic loline alkaloid derivatives: Insect feeding behavior modification and toxicity. **Journal of Entomological Science**, v. 26, p.122-129, 1991.
- SAHA, D. C.; JOHNSON-CICALESE, J. M.; HALISKY, P. M. HEEMSTRA, M. I.; FUNK, C. R. Occurrence and significance of endophytic fungi in the fine fescues. **Plant Disease**, v.71, p.1021-1024, 1987.
- SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.29, p.319-343, 1998.
- SHERWOOD-PIKE, M.; STONE, J. K.; CARROLL, G. C. *Rhizoctonia parkeri* a ubiquitous foliar endophyte of Douglas fir. **Canadian Journal of Botany**, v.64, p.1849-1855, 1986.
- SIEGEL, M. R.; LATCH, G. C. M.; BUSH, L. P.; FANNIN, F. F.; ROWAN, D. D.; TAPPER, B. A.; BACON, C. W.; JOHNSON, M. C. Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. **Journal of Chemical Ecology**, v.16, p.3301-3316, 1990.
- TESTER, C. F. Influence of a genetically modified endophytic bacterium on composition and decomposition of corn residue. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, p.1107-1112, 1992.
- TIBBETS, T. M.; FAETH, S. H. *Neotyphodium* endophytes in grasses: deterrent or promoters of herbivory by leaf-cutting ants? **Oecologia**, v.118, p.297-305, 1999.

- TSAI, H. F.; SIEGEL, M. R.; SCHARDL, C. L. Transformation of *Acremonium coenophialum*, a protective fungal symbiont of the grass *Festuca arundinacea*. **Current Genetics**, v.22, p.399-406, 1992.
- TOMASINO, S. F.; LEISTER, R. T.; DIMOCK, M. B.; BEACH, R. M.; KELLY, J. L. Field performance of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* expressing the insecticidal protein gene *cryIA* (c) of *Bacillus thuringiensis* against European corn borer in field corn. **Biological Control**, v.5, p.442-448, 1995.
- TOR, M.; MANTELL, S. H.; AINSWORTH, C. Endophytic bacteria expressing beta-glucuronidase cause false positives in transformation of *Dioscorea* species. **Plant Cell Reports**, v.11, p.452-456, 1992.
- TUDZYNSKI, P.; HOLTER, K.; CORREIA, T.; ARNTZ, C.; GRAMMELL, N.; KELLER, U. Genetics of alkaloid biosynthesis in *Claviceps purpurea*: evidence for a gene cluster. **Fungal Genetics Newsletter**, v.46, suppl., p.140, 1999.
- TURNER, J. T.; LAMPELL, J. S.; STEARMEN, R. S.; SUNDIN, G. W.; GUNYUZLU, U. P.; ANDERSON, J. J. Stability of the alfa-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.3522-3528, 1991.
- URATANI, B. B.; ALCORN, S. C.; TSANG, B. H.; KELLY, J. L. Construction of secretion vectors and use of heterologous signal sequences for protein secretion in *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.8, p.892-898, 1995.
- VAN-HEESWIJCK, R.; MCDONALD, G. *Acremonium* endophyte in perennial ryegrass and other pasture grasses in Australia and New Zealand. **Australian Journal of Agriculture Research**, v.43, p.1683-1709, 1992.
- VALENTINE, S. C.; CAON, G.; HOPKINS, D. C. ALLEN, P. G.; BARTSCH, B. D. Suitability of a new cultivar of perennial ryegrass as a host for the Argentine stem weevil (*Listronotus bonariensis*). **Plant Protection Quarterly**, v.7, p.28-29, 1992.
- WANG, J.; MACHADO, C.; PANACCIONE, D.; SCHARDL, C. Ergot alkaloid biosynthesis genes cloned from *Claviceps* and *Balansia*. **Fungal Genetics Newsletter**, v.46, suppl., p.120, 1999.
- WEBBER, J. A natural control of Dutch elm disease. **Nature**, London, v.292, p.449-451, 1981.
- WHITE JR., J. F.; GLENN, A. E.; CHANDLER, K. F. Endophyte-host associations in grasses. XVIII- Moisture relations and insect herbivory of the emergent stromal leaf of *Echinochloa*. **Mycologia**, v.85, p.195-202, 1993.
- WILSON, D.; CARROLL, G. C. Avoidance of high-endophyte space by gall-forming insects. **Ecology**, p.2153-2163, 1997.
- YOUNG, C.; MCMILLAN, L.; SCOTT, B. Molecular cloning of an indole-diterpenoid gene cluster from *Penicillium paxillii*. **Fungal Genetics Newsletter**, v.46, suppl., p.121, 1999.

[The page contains extremely faint and illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the document. The text is too light to transcribe accurately.]

# 4

## CONTROLE BIOLÓGICO DE OÍDIOS

Marciel J. Stadnik

Wagner Bettiol

### INTRODUÇÃO

Os sintomas de Oídio, em todos os hospedeiros, são de fácil identificação, pois apresentam um bolor pulverulento, de coloração branca ou acinzentada, que pode recobrir folhas, ramos, gemas e flores. O bolor pulverulento é formado por estruturas (micélio, conídios e conidióforos) do patógeno. O recobrimento dos órgãos dos vegetais pode ser na forma de manchas isoladas ou na superfície total. Normalmente a doença se manifesta na face superior das folhas, entretanto pode ocorrer também na face inferior. Além do recobrimento das superfícies, pode ocorrer, em estágio mais avançado da doença, o surgimento de lesões amareladas e posteriormente necróticas. A doença provoca subdesenvolvimento da planta, das folhas e dos frutos, queda de folhas e morte de ramos novos. Conseqüentemente, há redução de produtividade do hospedeiro, a qual se deve à diminuição na capacidade fotossintética da planta e à utilização de nutrientes das células pelo patógeno. Dessa maneira, os Oídios podem causar grandes danos à produção, atingindo valores de até 40% em cereais (Stadnik 1999). Os agentes causais de Oídio podem atacar um grande número de plantas cultivadas, invasoras e silvestres, tais como abóbora, abacate, caju, manga, pepino, melão, melancia, soja, feijão, tomate, trigo, aveia, videira, roseira e cássia, entre outras. Apesar de Oídios estarem amplamente distribuídos pela natureza, os ambientes secos e quentes favorecem a sua ocorrência.

Os fungos que causam Oídios são parasitas biotróficos obrigatórios, portanto dependem do hospedeiro vivo para o seu desenvolvimento, não possuindo fase saprofítica. A forma de parasitismo dos Oídios é bastante evoluída, pois explora o hospedeiro sem levá-lo à morte, fato que é essencial para a sua sobrevivência. Os agentes causais são fungos da classe dos Ascomicetos, família Erysiphaceae, gêneros *Blumeria*, *Erysiphe*, *Leveillula*, *Microsphaera*, *Phyllactinia*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* e *Uncinula*. A fase imperfeita (*Oidium* e *Oidiopsis*) desses gêneros é responsável pela ocorrência de Oídio e caracteriza-se pela produção de hifas claras e septadas, conidióforos curtos, eretos e não-ramificados, conídios em cadeia, hialinos, unicelulares de forma retangular a ovalada. Na fase perfeita, os corpos de frutificação são do tipo cleistotécios, com ascas em seu interior, que dão origem a ascosporos unicelulares, hialinos e ovalados. Na figura 1 é apresentado o ciclo do Oídio da videira.

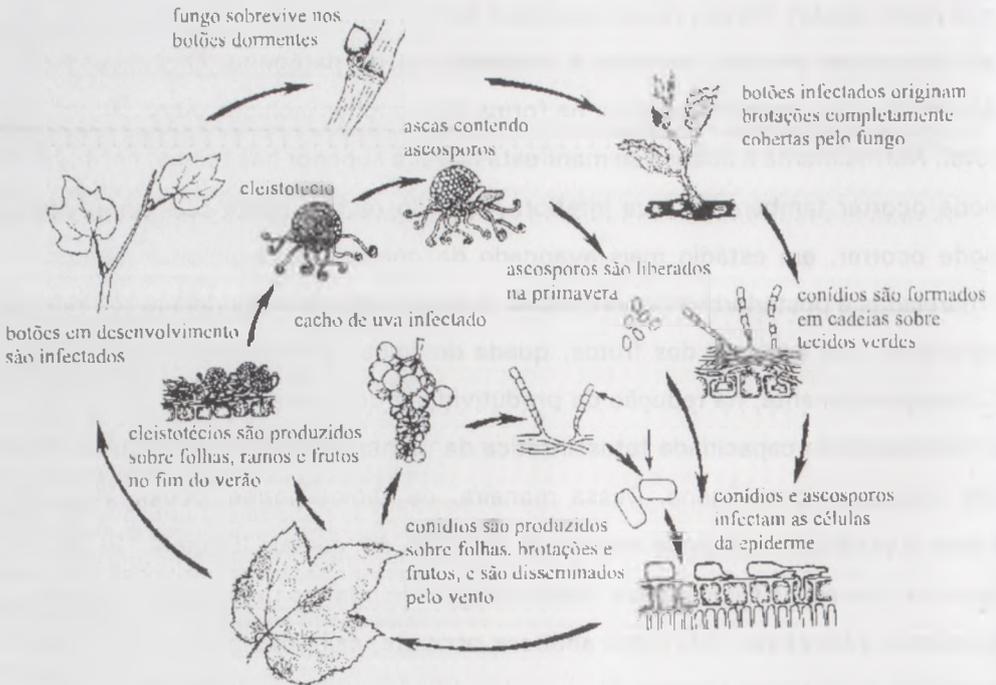


FIGURA 1. Ciclo do Oídio da videira causado por *Uncinula necator*. Adaptado de Pearson & Goheen (1990)

Nas condições de clima tropical, o patógeno sobrevive por meio de estruturas da fase imperfeita no próprio hospedeiro ou nos alternativos. Já nas regiões temperadas, a sobrevivência é geralmente devida aos cleistotécios. A disseminação do patógeno é feita principalmente pelo vento. Os conídios que atingem o hospedeiro germinam numa ampla faixa de umidade relativa do ar, mas não na presença de água livre, sendo que a infecção é realizada pelos apressórios formados na extremidade dos tubos germinativos. Após a infecção, são formados os haustórios no interior das células epidérmicas, que são os responsáveis pela retirada dos nutrientes dos hospedeiros. As hifas que ficam na superfície do hospedeiro se desenvolvem e ocorre uma ampla produção de conídios.

Embora Oídios pareçam um alvo fácil para os antagonistas na superfície das folhas, somente alguns fungos e bactérias antagonizam eficientemente suas estruturas vegetativas e reprodutivas. Neste capítulo, são abordados os mecanismos de interação antagônica entre esses microrganismos e Oídios. Em seguida são revisados individualmente diferentes aspectos dos principais agentes de biocontrole atualmente conhecidos e ao final desta parte serão listados outros organismos com potencial para o biocontrole de Oídios. Para concluir, algumas perspectivas e limitações no uso desses bioagentes são comentados.

## **Mecanismos de interações antagônicas**

Os mecanismos de interações antagônicas entre microrganismos e o Oídio podem ser divididos em parasitismo, antibiose e indução de resistência. Um antagonista pode, no entanto, agir por mais de um mecanismo. Na verdade, o uso de mais de um mecanismo é visto como uma característica favorável para o sucesso de um agente de biocontrole (Bélanger, 1998). O parasitismo e a antibiose agem sobre o patógeno diretamente, enquanto a indução de resistência tem a ação direcionada ao hospedeiro.

## Antibiose

A antibiose é definida como a interação na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o Oídio. *Pseudomonas fluorescens* (Kremer & Grossmann, 1994) e *Sporothrix flocculosa* (Bélanger, 1999) são alguns exemplos de microrganismos em que a ação antagônica depende principalmente da antibiose. Moléculas ativas destes organismos são liberadas e causam rápida plasmólise das células do Oídio.

## Hiperparasitismo

O termo parasitismo é empregado para designar uma relação nutricional entre dois seres vivos em que um dos componentes da relação, o parasita, obtém todo ou parte de seu alimento às custas do outro componente, o hospedeiro. O hiperparasitismo é um nível mais elevado de parasitismo, no qual o hospedeiro (Oídio) é também um parasita. Apesar de ocorrer freqüentemente na natureza, somente um número restrito de parasitas de Erysiphaceae tem sido encontrado (Hijewegen & Buchenauer, 1984; Bélanger, 1999). A espécie mais comum, e certamente melhor estudada, é *Ampelomyces quisqualis* Ces., a qual é quase exclusiva de Erysiphaceae.

Parasitas de Oídios podem crescer no interior (*A. quisqualis* Ces.) ou simplesmente na superfície do hospedeiro. Neste último caso, estruturas especializadas, parecidas com apressórios, são aparentemente formadas (*Acrodontium crateriforme*) (Hijewegen & Buchenauer, 1984).

## Indução de resistência

O aumento da resistência usando agentes externos, sem a modificação do genoma da planta, é conhecido como resistência induzida ou adquirida. A pré-inoculação com patógenos avirulentos ou virulentos (Thordal-Christensen & Smedegaard-Petersen, 1988), assim como fungos saprofiticos (Gregersen & Smedegaard 1988), pode induzir resistência local a Oídios de diversas espécies de plantas. A indução de resistência em partes da planta, distantes do local de aplicação do agente biótico, tem sido também demonstrada

por Hwang & Heitefuss (1982). Entretanto, esse efeito sistêmico é geralmente mais fraco que o efeito local.

Embora o grau de necrotização dos tecidos tenha sido algumas vezes correlacionado com o nível de resistência induzida (Thordal-Christensen & Smedegaard-Petersen, 1988), parece que um requerimento generalizado de necroses para induzir resistência inexistente. Além de fungos, também bactérias, leveduras e vírus podem induzir a resistência de plantas a diferentes espécies de Oídios (Reglinski et al., 1994; Steiner & Schönbeck, 1995; Conti et al., 1994). Extratos da levedura *Sacharomyces cerevisiae* induzem resistência ao Oídio da cevada. Uma baixa eficiência de penetração por *Sphaerotheca fuliginea* devido à resistência induzida, pela pré-inoculação por TNV, tem sido associada à formação de papilas fortemente autofluorescentes, ao aumento da atividade de peroxidase e à deposição de lignina nas paredes das células epidérmicas do pepino, que impede a penetração do fungo (Conti et al., 1994).

## Agentes de biocontrole

Até o presente, os principais agentes de biocontrole estudados no controle de Oídios são: os fungos parasitas *A. quisqualis* e *Verticillium lecanii*; o indutor de resistência *Trichoderma harzianum*; as leveduras antagonistas por antibiose *Stephanoascus* spp. (anamorfo: *Sporothrix* spp.) e *Tiellettiopsis* spp.; e as bactérias *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens*.

## Fungos e leveduras

### *Ampelomyces quisqualis*

O fungo *Ampelomyces quisqualis* Ces. é um Coelomiceto que infecta as fases anamórficas e teleomórficas de muitas espécies de Oídios (Sztejnberg et al., 1989; Sundheim & Krekling, 1982; Falk et al., 1995ab). Este micoparasita, que tem sido estudado por aproximadamente 150 anos, foi descoberto casualmente quando pesquisadores europeus no século passado estudavam o Oídio da videira (*Uncinula necator*). Muitos dos pesquisadores daquela época observaram picnídios marrons associados ao Oídio, mas pensavam inicialmente

que se tratavam de estruturas reprodutivas adicionais de uma "nova espécie ou raça de Oídio" (von Mohl, 1854). Ao contrário, Cesati (1852), Riess (1852) e Ehrenberg (1853) concluíram que se tratava de uma outra espécie fúngica que foi nomeada por eles de *Ampelomyces quisqualis*, de *Byssocystis textilis* e de *Cicinnobolus florentinus*, respectivamente. No entanto, a forma de vida hiperparasítica desse fungo permanecia ainda desconhecida. Somente as investigações de De Bary (1870) forneceram as provas definitivas de que *A. quisqualis* era um fungo parasita do Oídio. De Bary fez a primeira descrição completa do fungo, dando-lhe o nome de *Cicinnobolus cesatii*. Nas décadas posteriores, os resultados de De Bary foram confirmados e complementados por inúmeras publicações. As características morfológicas e fisiológicas do parasita (Yarwood, 1939; Linnemann, 1968; Rao & Mhaskar, 1976; Hashioka & Nakai, 1980; Sundheim, 1982a; Sundheim & Krekling, 1982; Beuther, 1985), bem como a sua ocorrência em diversas espécies de Oídio e em diversas regiões foram descritas (Falk et al., 1995). Também a sua ocorrência sobre outras espécies hospedeiras fúngicas (Linnemann, 1968; Jarvis & Slingsby, 1977) e a sistemática do fungo foram amplamente investigadas (Chona & Munjal, 1956; Rogers, 1959; Da Ponte, 1966; Kiss, 1997b).

Aparentemente, *A. quisqualis* não apresenta especialização parasitária dentro de membros de Erysiphaceae (Falk et al., 1995ab). O micoparasita ocorre em mais de 65 espécies dos gêneros *Brasiliomyces*, *Blumeria*, *Erysiphe*, *Leveillula*, *Microsphaera*, *Phyllactinia*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca*, *Uncinula* e nos gêneros anamórficos *Oidium*, *Oidiopsis* e *Ovulariopsis* (Falk et al., 1995a; Kiss, 1997a). Entretanto, comparado aos demais gêneros, os Oídios de gramíneas (*Blumeria graminis*) são parasitados menos frequentemente na natureza (Kiss, 1997a).

Esporos de *A. quisqualis*, depositados sobre folhas infectadas por Oídio, germinam quando a umidade relativa está próxima de 100%. O esporo forma um tubo germinativo que cresce em direção ao Oídio. Após o envolvimento das hifas, o parasita forma estruturas semelhantes a apressórios e penetra no hospedeiro. A penetração é um processo mecânico e enzimático combinado (Sundheim & Krekling, 1982). Dentro do hospedeiro, *A. quisqualis* cresce pelos

septos e paredes celulares (De Bary, 1870; Linnemann, 1968; Hashioka & Nakai, 1980; Sundheim & Krekling, 1982). Os poros dos septos oferecem entradas naturais para as hifas de *A. quisqualis* que podem se estrangular até a um quarto ( $1\mu\text{m}$ ) do seu tamanho normal (Hashioka & Nakai, 1980).

*A. quisqualis* pode infectar hifas, conidióforos, conídios e os cleistotécios do Oídio (Sztejnberg et al., 1989; Falk et al., 1995ab), crescendo ligeiramente nessas estruturas, e após cinco dias começa a formar picnídios, de preferência nos conidióforos. Após o rompimento das paredes celulares do hospedeiro, devido ao crescimento dos picnídios, *A. quisqualis* nutre-se saprofiticamente das partes mortas do Oídio e também de nutrientes da superfície vegetal. Por isso, diz-se que esse parasita possui uma fase inicial biotrófica e outra posterior necrotrófica (Philipp & Crüger, 1979; Hashioka & Nakai, 1980; Sundheim, 1982a; Hijwegen, 1988). Na fase biotrófica de parasitismo, *A. quisqualis* interfere com o metabolismo energético, a síntese protéica e a síntese da parede celular. O parasita se nutre de carboidratos fosforilados e nucleotídeos do hospedeiro. Devido a *A. quisqualis* não produzir toxinas (Beuther et al., 1981), a exaustão das reservas energéticas do Oídio parece ser responsável pela degeneração da ultra-estrutura do hospedeiro (Philipp, 1985).

*A. quisqualis* produz constitutivamente diversas enzimas extracelulares, tais como  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase, fosfatase ácida, ribonuclease e glucanases (Philipp, 1985).  $\beta$ -N-Acetilglucosaminidase é uma enzima freqüentemente encontrada em filtrados de cultura de *A. quisqualis* que tem como importantes funções fornecer acetilglucosamina para o fungo (acetilglucosamina pode servir como nutriente e como elemento estrutural para a síntese de sua parede celular) e causar distúrbios na síntese da parede celular do hospedeiro (Beuther, 1985).

Células do Oídio parasitadas não mostram inicialmente mudanças estruturais visíveis (Hashioka & Nakai, 1980). Nesta fase, somente uma zona hialina no plasma do hospedeiro ao redor da ponta da hifa do hiperparasita indica a atividade de enzimas extracelulares (Philipp, 1985). A colônia de Oídio é capaz de continuar seu crescimento radial, mas a formação de conídios é cessada ou atrasada sobre

seus conidióforos parasitados ainda na fase biotrófica do parasitismo (Philipp et al., 1984). Cerca de dez dias após o começo do parasitismo pode-se reconhecer facilmente o *A. quisqualis* a olho nu. As colônias parasitadas tomam um aspecto felpudo-plumoso em algumas partes e, em outras, nas quais a esporulação é reduzida e os conidióforos são degenerados, mostram-se aplanadas. Pode-se observar ainda pequenas manchas marrons, que quando visualizadas por um microscópio estereoscópio, revelam muitos picnídios de forma arredondada a clavada. Esses picnídios liberam numa mucilagem, centenas de conídios unicelulares hialinos, os quais são disseminados pela água (Philipp & Crüger, 1979).

Plantas de pepino infectadas por Oídio apresentam uma acentuada desorganização morfológica das membranas de cloroplastos. Entretanto, cloroplastos de plantas infectadas com Oídio e tratadas com *A. quisqualis* se assemelham àqueles de plantas sadias. Técnicas de fluorescência indicam também que perdas de clorofila não ocorrem nestas plantas. Por esta razão, métodos de fluorescência têm sido propostos por Abo-foul (1996) para se avaliar a eficiência do bioagente no controle do Oídio.

O fungo sobrevive em condições desfavoráveis por meio da formação de picnídios grandes ou formando micélio com paredes engrossadas (Yarwood, 1939; Linnemann, 1968; Jarvis & Slingsby, 1977). Embora *A. quisqualis* não sobreviva durante o inverno em cleistotécios de *U. necator* localizados sobre folhas, ele persiste no ritidoma da videira. Devido os cleistotécios de *U. necator* no ritidoma serem responsáveis pela liberação do inóculo inicial após o inverno, a colonização destas partes da planta por *A. quisqualis* parece desempenhar um importante papel no controle natural do Oídio da videira sob condições de clima temperado (Falk et al., 1995a).

A produção de inóculo em laboratório não oferece nenhum obstáculo. Devido à sua característica saprofítica, *A. quisqualis* cresce e esporula em diversos meios de cultura, tais como batata-dextrose (Philipp & Crüger, 1979) ou extrato de malte (Fernandes & Santos, 1996).

Sob condições de casa-de-vegetação, o hiperparasita pode controlar

eficientemente Oídio do pepino (Philipp & Crüger, 1979; Jarvis & Slingsby, 1977; Sundheim, 1982ab) e de diversas outras plantas. Como consequência, a produtividade do pepino aumenta freqüentemente a níveis semelhantes àqueles obtidos pelo tratamento com fungicidas (Sundheim, 1982b; Philipp et al., 1984).

O sucesso de *A. quisqualis* depende da umidade. Nas primeiras 24h da inoculação com a suspensão conidial, a superfície foliar deve permanecer umedecida, para que ocorra uma suficiente taxa de germinação e penetração. Condições de umidade relativa alta, em estágios posteriores, são também favoráveis ao parasitismo (Philipp & Crüger, 1979). Alguns aditivos podem prevenir temporariamente o ressecamento dos conídios de *A. quisqualis* sob as superfícies foliares. Philipp & Hellstern (1986) testaram diversos aditivos, e conseguiram otimizar o parasitismo de *S. fuliginea* usando uma emulsão de 1% de parafina líquida (Tabela 1). Temperaturas acima de 30°C são prejudiciais a *A. quisqualis*. Aplicações repetidas do parasita em intervalos de 6 a 10 dias têm sido recomendadas para se controlar um possível ressurgimento do Oídio (Philipp & Crüger, 1979).

TABELA 1. Efeito da adição de parafina líquida na suspensão conidial sobre o parasitismo do Oídio do pepino por *Ampelomyces quisqualis*, em diferentes condições de umidade relativa (UR em%) (adaptado de Philipp & Hellstern, 1986).

Tratamento	parasitismo (%)		
	55% UR	70% UR	80% UR
Sem parafina (SP)	0	0	0
0,5% parafina	71,6	86,1	-
1,0% parafina	95,9	97,5	97,5
SP + câmara úmida <sup>1</sup>	97,5	97,5	97,5

<sup>1</sup>Plantas permaneceram durante a fase de infecção por 48h a 20-22°C em câmara úmida.



Aparentemente, pode-se usar *A. quisqualis* em combinação com outros métodos de controle. Este hiperparasita mostra geralmente uma alta tolerância a fungicidas usados contra o Oídio (Philipp & Crüger, 1979; Philipp et al., 1982, 1984; Sundheim & Amundsen, 1982; Philipp & Kirchhoff, 1983), além de tolerar diversos acaricidas e inseticidas (Sztejnberg & Mazar, 1983). Porém, Fernandes & Santos (1996) demonstraram *in vitro* que um isolado de *A. quisqualis* pode ser fortemente inibido por fungicidas, como o benomyl na concentração de 10ppm.

*A. quisqualis* vem sendo comercializado com o nome de AQ10 pela Ecogen na forma de grânulos dispersos em água e é recomendado para o controle de Oídios de cucurbitáceas, videira, morango, tomate, maçã e plantas ornamentais.

### ***Stephanoascus* spp.**

*Stephanoascus* spp., mais conhecido na literatura pela sua fase anamórfica *Sporothrix*, ou ainda, *Pseudozyma*, é um ascomiceto que reduz o crescimento e a esporulação do Oídio (Jarvis & Slingby, 1977; Bélanger, 1998). *Sporothrix flocculosa* (*Pseudozyma flocculosa*) e *Sporothrix rugulosa* são fungos leveduriformes epifíticos que foram isolados e identificados no Canadá há aproximadamente uma década (Traquair et al., 1988). Esses antagonistas têm se revelado altamente eficientes contra o Oídio do pepino (Jarvis et al., 1989), sendo *S. flocculosa* aparentemente o mais ativo sob diferentes condições ambientais. Hajlaoui & Bélanger (1991, 1993) demonstraram que esses dois antagonistas são igualmente efetivos contra *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* e *B. graminis* var. *tritici*, responsáveis pelos Oídios da rosa e do trigo, respectivamente. Em experimentos controlados, *S. flocculosa* mostrou-se menos exigente, em termos de requerimento de temperatura e umidade para manter sua eficácia que *S. rugulosa* ou *Tilletiopsis washingtonensis* (Hajlaoui & Bélanger, 1993; Jarvis et al., 1989).

Estudos microscópicos indicam que *S. flocculosa* não penetra no seu hospedeiro, mas induz a plasmólise de células do Oídio (Hajlaoui et al., 1992). Filtrados de cultura do fungo induzem as mesmas reações celulares que

aquelas observadas quando o Oídio é colocado diretamente em contato com *S. flocculosa* (Hajlaoui et al., 1994). Análise química dos filtrados de cultura revelou a presença de no mínimo quatro moléculas com atividade antifúngica, sendo três delas relacionadas com ácidos graxos (Benyagoub & Bélanger, 1996; Choudhury et al., 1994). Essas moléculas interferem na fluidez da membrana. Sendo assim, a composição da membrana determina provavelmente o nível de especificidade da toxina. Na verdade, a resistência de *S. flocculosa* contra as suas próprias toxinas versus a sensibilidade relativa de outros fungos é atribuída à composição do esterol e ao teor de ácidos graxos saturados que compõem a sua membrana (Beyagoub & Bélanger, 1995). Curiosamente, fungos do filoplano, que entram provavelmente em contato com *S. flocculosa*, são mais suscetíveis ao antagonista que fungos residentes na rizosfera (Bélanger & Deacon, 1996).

Em condições comerciais, *S. flocculosa* pode controlar tão bem o Oídio da rosa quanto os fungicidas (Bélanger et al., 1994). Além disto, o tratamento biológico pode melhorar a qualidade das flores em algumas variedades de rosa, devido à eliminação do estresse (fitotoxicidade) causado por fungicidas. Recentemente, Benyagoub & Bélanger (1995) selecionaram uma linhagem mutante de *S. flocculosa*, a qual mostra resistência ao fungicida dodemorph, mas mantém as mesmas características originais como agente de biocontrole. Esse fato deve facilitar o uso de *S. flocculosa* dentro de um programa integrado contra o Oídio da rosa. Atualmente, um biofungicida (Sporodex™) à base de *S. flocculosa* está sendo comercializado no Canadá contra o Oídio da rosa e do pepino (Bélanger, 1999).

### ***Tilletiopsis* spp.**

*Tilletiopsis* spp. Ders são basidiomicetos leveduriformes, freqüentemente encontrados nas superfícies foliares. Eles colonizam intensamente o filoplano, sendo que a maioria das colônias são formadas próximas a áreas fisicamente danificadas ou a locais infectados por Oídio ou Ferrugem (Last, 1970; Hoch & Provvidenti, 1979; Hijwegen & Buchenauer, 1984; Boekhout, 1991; Urquhart et al., 1994).

Hoch & Provvidenti (1979) foram os primeiros a provar o antagonismo entre *Tilletiopsis* sp. e o Oídio, e trabalhos posteriores em casa de vegetação mostraram que estes agentes podem controlar eficientemente o Oídio (Hijwegen & Buchenauer, 1984; Klecan et al., 1990; Hajlaoui & Bélanger, 1991; Urquhart et al., 1994; Urquhart & Punja, 1997).

Em ordem decrescente de frequência, as seguintes espécies de *Tilletiopsis* têm sido isoladas de folhas de diversas plantas: *T. washingtonensis*, *T. minor*, *T. pallescens* e *T. albescens* (Urquhart et al., 1994). Membros do gênero *Tilletiopsis* se reproduzem assexuadamente pela formação de blastósporos, balistósporos ou clamidósporos. Esses esporos germinam e formam hifas monocarióticas regularmente ramificadas e septadas (Boekhout, 1991). Os clamidósporos são formados a partir de blastósporos e permitem ao fungo persistir no ambiente em períodos desfavoráveis ao seu desenvolvimento. Já os balistósporos germinam em uma ampla faixa de pH (3,8-7,9) e são provavelmente responsáveis pela disseminação do fungo (Knudsen & Skou, 1993; Urquhart et al., 1994).

A sobrevivência desses fungos depende de fatores ambientais, particularmente umidade e temperatura, e da disponibilidade de nutrientes na superfície foliar que são originados de perdas da folha ou de outras fontes, tais como secreções de afídios (Last, 1970; Hoch & Provvidenti, 1979; Hijwegen & Buchenauer, 1984; Boekhout, 1991; Urquhart et al., 1994; Bettiol, 1997). A umidade influencia fortemente a colonização de *Tilletiopsis* spp. (Knudsen & Skou, 1993; Urquhart et al., 1994; Urquhart & Punja, 1997). Em plantas de pepino, mantidas a 70% de umidade relativa, colônias de *T. pallescens* desenvolvem-se fracamente e permanecem restritas às regiões adjacentes às nervuras foliares, sete dias após a aplicação de blastósporos. Já em condições de 90% de umidade relativa, redes extensivas de hifas se desenvolvem dentro de três dias, e após cinco dias ocorre a produção de blastósporos e o colapso das hifas do Oídio (Urquhart & Punja, 1997). Temperaturas entre 15°C e 25°C são ótimas para o crescimento e a esporulação. Já temperaturas abaixo de 10°C ou acima de 30°C prejudicam sensivelmente o crescimento de *Tilletiopsis* spp. (Urquhart et al.,

1994).

Mesmo em condições aparentemente favoráveis (25°C e 95% UR), a população de *Tilletiopsis* spp. declina fortemente dentro de sete dias após a inoculação de folhas de pepino sadias com uma suspensão de blastósporos (Urquhart et al., 1994). A colonização por *Tilletiopsis* spp. aumenta com a idade das folhas que provavelmente possuem mais nutrientes livres e/ou estão expostas por mais tempo à inoculação natural (Knudsen & Skou, 1993).

A avaliação da sobrevivência de leveduras sobre as folhas pode ser realizada pelas técnicas de impressão foliar, pela quantificação de unidades formadoras de colônia e/ou pela visualização de propágulos *in situ* (Knudsen & Skou, 1993; Urquhart et al., 1994; Urquhart & Punja, 1997). Para isolar *Tilletiopsis* spp. tem-se usado o meio de farinha de milho ágar, contendo ampicilina (100mg/ml), dicloran (10mg/ml) e rosa de bengala (20mg/ml) (Urquhart et al., 1994).

Sem que ocorra a penetração no hospedeiro, *Tilletiopsis* spp. causam o colapso das hifas (Hoch & Provvidenti, 1979) e reduzem a produção de conídios do Oídio (Urquhart et al., 1994). Devido a filtrados da cultura de *Tilletiopsis* spp. reproduzirem os mesmos sintomas da aplicação de suspensão de esporos, tem-se acreditado que o modo de ação do biocontrole baseia-se em enzimas (Hijwegen, 1992; Urquhart et al., 1994) e/ou metabólitos secundários com atividade antimicrobiana (Ng et al., 1997). A detecção indireta de atividade de b-1,3 glucanase no filtrado de cultura de *T. pallenscens* sugere uma possível participação desta enzima como um mecanismo de antagonismo por *Tilletiopsis* spp. (Urquhart et al., 1994).

Diversas espécies de *Tilletiopsis* têm mostrado potencial como agente biológico dos Oídios da cevada (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) (Klecan et al., 1989; Knudsen & Skou, 1993), do pepino (*Sphaerotheca fuliginea*) (Hijwegen 1986, 1992; Urquhart et al., 1994), do tremoço (*E. martii*), da roseira (*Sphaerotheca pannosa*) (Ng et al., 1997) e do carvalho (*Microsphaera alphitoides*) (Hijwegen & Buchenauer, 1984).

Embora os balistósporos sejam disseminados com os esporos do

Oídio para novas áreas, eles são insuficientes para assegurar uma redução aceitável do nível de doença. Por isto, aplicações repetidas são recomendadas à medida que as folhas de pepino crescem em número e tamanho. Aplicação profilática tem pouco efeito sobre a doença e, por isto, o tratamento deve ser iniciado imediatamente após a visualização das primeiras colônias de Oídio. Aplicação de balistósporos ou micélio de *T. albescens* é igualmente efetiva para controlar o Oídio e a eficiência de biocontrole tende a aumentar exponencialmente com a concentração de unidades de germinação aplicadas (Knudsen & Skou 1993).

A sobrevivência e o desenvolvimento de agentes de controle biológico no filoplano, em número satisfatório, são pré-requisitos importantes para que eles sejam efetivos contra o patógeno (Bettiol, 1997). Apesar da potencialidade de *Tilletiopsis* spp. como agentes de biocontrole, os requerimentos de altas concentrações de inóculo e de alta umidade relativa para se garantir uma redução do Oídio aceitável são alguns dos principais empecilhos para a comercialização de um produto a base desse organismo (Bélanger et al., 1998).

Visando a um aumento da sobrevivência de leveduras no filoplano tem-se tentado reduzir o estresse da umidade por meio da formulação do inóculo com óleos vegetais ou minerais e/ou pela adição de nutrientes (Urquhart et al., 1994; Urquhart & Punja, 1997). Uma formulação consistindo de óleo de canola (1%) e lecitina (0,1%) aumentou a sobrevivência de *T. pallescens* em folhas de pepino (Urquhart & Punja, 1996) e não foi fitotóxica (Ng et al., 1997). Formulações de *Tilletiopsis* com substâncias lipofílicas, tais como Óleo 11E e lipídios do leite têm aumentado a eficiência de controle. Embora essas formulações sozinhas possam reduzir o Oídio, maior controle é alcançado quando *T. minor* está presente (Hijwegen, 1992).

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

*Trichoderma* spp. são hifomicetos amplamente estudados no controle de fitopatógenos, principalmente daqueles do solo. Porém, tem-se relatado que *Trichoderma* spp. podem afetar também os Oídios. A maioria desses trabalhos

relata o efeito desses fungos sobre os conidióforos e a germinação dos conídios, em que a antibiose parece ser envolvida na redução da doença. Assim, a pulverização de plantas de cevada com culturas puras de *Trichoderma viride* reduziu a severidade do Oídio (Jenkyn & Bainbridge, 1978).

Sob condições de casa-de-vegetação, a pulverização com *T. harzianum* T39 (o ingrediente ativo de Trichodex usado em Israel para controlar diversas doenças de plantas) reduziu em até 97% a severidade do Oídio do pepino (*Sphaerotheca fuliginea*), mas a sua eficácia declinou em 18-55% com o progresso da epidemia (Elad et al., 1999ab).

Microscopia eletrônica de varredura de folhas de pepino e pimentão revelou que hifas, conidióforos, conídios e tubos germinativos de *S. fuliginea* e de *L. taurica* colapsam na presença de *T. harzianum* T39. Mas isto acontece mesmo na ausência de contato físico entre o antagonista e os patógenos. Como *T. harzianum* não parasita Oídios nem produz antibióticos, tem-se concluído que a resistência induzida do hospedeiro deve ser, no mínimo parcialmente, responsável pelo controle do Oídio (Elad et al., 1999b). Um efeito significativo do tratamento do solo com *T. harzianum* T39 sobre o Oídio tem sido também observado em várias culturas (Tabela 2). Isso confirma a participação da resistência induzida na supressão da doença (Elad et al., 1999c).

TABELA 2. Efeito do tratamento do solo com *Trichoderma harzianum* T39 sobre a severidade dos Oídios do pepino, pimentão e fumo (adaptado de Elad et al., 1999c)

Espécie	Patógeno	Testemunha	<i>T. harzianum</i>
Pepino	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	68 <sup>1</sup>	31
Pimentão	<i>Leveillula taurica</i>	37	9
Fumo	<i>Erysiphe cichoracearum</i>	48	8

<sup>1</sup> Valores são expressos em % de área coberta com Oídio.

## ***Verticillium lecanii***

*Verticillium lecanii* Viegas é um fungo polífago que parasita desde artrópodos até fungos biotróficos, tais como ferrugens e oídios (Hijwegen & Buchenauer, 1984; Bélanger, 1998).

O parasitismo de *V. lecanii* sobre *S. fuliginea* envolve os seguintes eventos: 1) contato e firme fixação através de uma matriz mucilaginosa do antagonista ao hospedeiro; 2) pressão mecânica e produção de enzimas degradadoras da parede celular, tais como quitinases; 3) penetração e ativo crescimento do antagonista no interior das hifas do hospedeiro; 4) digestão dos tecidos dos hospedeiros e liberação do antagonista de células mortas de *S. fuliginea*. *V. lecanii* causa inclusive uma maior vacuolização, distorção e necrotização dos haustórios os quais se encontram no interior da planta (Askary et al., 1997).

Tentativas pioneiras para controlar o Oídio com *V. lecanii* não foram bem sucedidas, provavelmente devido ao parasita não sobreviver muito tempo sobre superfícies foliares. Entretanto, o recente sucesso comercial de alguns bioinseticidas baseados nesse organismo renovaram o interesse por ele (Bélanger, 1998). Tem-se mostrado que *V. lecanii* pode controlar eficientemente afídios e moscas-brancas, duas das mais comuns pragas de plantas cultivadas em estufas. A descoberta de que *V. lecanii* também é um parasita de Ferrugens e Oídios tem levado cada vez mais a se acreditar que este fungo seja uma alternativa promissora de amplo espectro de ação para o controle de pragas e doenças de casa de vegetação (Askary, 1997; Verhaar, 1998). Uma das principais limitações do uso de *V. lecanii* é, entretanto, o requerimento de alta umidade relativa do ar para obtenção de um eficiente biocontrole (Bélanger, 1998).

## **Bactérias**

### ***Bacillus* spp.**

A aplicação de metabólitos de *Bacillus subtilis* 1 e 24h antes ou após a inoculação de *S. fuliginea* reduziu as lesões de folhas do pepino em 90-99% (Bettiol et al., 1997). *B. brevis* produz um antibiótico peptídico Gramicidina S, o

qual inibe a germinação de *S. fuliginiea*. Em campo, *B. brevis* reduziu o Oídio do pepino em 40% (Seddon et al., 1999). Nesses dois exemplos, a antibiose parece ser o mecanismo responsável pela redução da doença, entretanto Kehlenbeck & Schönbeck (1995) acharam que metabólitos microbianos produzidos por uma cepa de *B. subtilis* induzem resistência ao Oídio e conduzem maiores produtividades.

SerenadeO, um produto contendo células de *B. subtilis*, tem sido comercializado pela AgraQuest numa formulação pó-molhável para o controle de Oídio em diversas culturas.

### ***Pseudomonas fluorescens***

Alguns isolados de *Pseudomonas fluorescens* podem reduzir em até 50% o número de colônias do Oídio da cevada. O mecanismo de ação é baseado provavelmente na produção dos antibióticos viscosina e pirrolnitrina, assim como enzimas que degradam a parede celular do fungo (Kremer & Grossmann, 1994).

### **Outros agentes de biocontrole**

Outros fungos, tais como *Acremonium alternatum* (Malathrakis 1985), *Acrodontium crateriforme*, *Aphanocladium album*, *Aspergillus fumigatus*, *Calcarisporium arbuscula*, *Cladobotryum varium*, *Cladosporium* spp., *Dissoconium aciculare*, *Dreschlera spifera*, *Fusarium oxysporum*, *Paecilomyces farinosus*, *Penicillium* spp., *Ramichloridium apiculatum* e *Trichothecium roseum* podem reduzir a severidade do Oídio em cucurbitáceas e em outras espécies de plantas (Jenkyn & Bainbridge, 1978; Hijwegen & Buchenauer, 1984; Shivastava & Bisht, 1986; Hijwegen, 1988; Gregersen & Smedegaard, 1989; Minuto et al., 1991). A aplicação de suspensão aquosa desses fungos inibe a germinação, o desenvolvimento e/ou esporulação das colônias do Oídio. No entanto, na maioria dos casos, os mecanismos de ação dos antagonistas são ainda desconhecidos.

## Conclusões

Enquanto o controle biológico de vários Oídios tem sido estudado extensivamente em plantas dicotiledôneas (ex.: pepino) e especialmente em cultivo protegido, somente poucos estudos têm sido conduzidos com plantas monocotiledôneas em campo, tais como os cereais. Para a maioria dos antagonistas estudados até o momento, a exigência de alta umidade relativa tem sido o principal fator limitante para o sucesso deste método de controle. Assim, quando as condições ambientais são ideais para o desenvolvimento do Oídio (baixa umidade do ar), não o são para o crescimento do antagonista. Por isto, o uso de bioagentes parece estar atualmente restrito ao cultivo protegido, em que as condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento desses agentes são encontradas mais freqüentemente. Isolados de bioagentes apresentando maior eficiência de controle, menores exigências ambientais e maior compatibilidade num manejo integrado de doenças e pragas devem ser continuamente selecionados.

A diversidade de microrganismos afetando Oídios é alta, porém ainda é pequeno o conhecimento da microbiota associada a Oídios, em condições tropicais. Por isso, o levantamento e o estudo dos efeitos dos organismos oriundos dessas regiões se faz necessário e deverá fornecer futuramente novas alternativas para o biocontrole de Oídios.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO-FOUL, S.; RASKIN, V.I.; SZEJNBERG, A.; MARDER, J.B. Disruption of chlorophyll organization and function in powdery mildew-diseased cucumber leaves and its control by the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis*. *Phytopathology*, v.86, n.2, p.195-199, 1996.
- ASKARY, H.; BENHAMOU, N.; BRODEUR, J. Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. *Phytopathology*, v.87, n.3, p.359-368, 1997.
- BÉLANGER, R.R. Control of powdery mildews without chemicals: biological and prophylactic alternatives. In: INTERNATIONAL POWDERY MILDEW CONFERENCE, 1., 1999, Avignon, Resumos. Avignon, 1999. p.37.
- BÉLANGER, R.R.; DEACON, J.W. Interaction specificity of the biocontrol agent *Sporothrix flocculosa*: a video microscopy study. *Phytopathology*, v.86, n.12, p.1317-1323, 1996.
- BÉLANGER, R.R.; DIK, A.J.; MENZIES, J.G. Powdery Mildews: Recent Advances Toward Integrated Control. In: BOLAND, G.J.; KUYKENDALL, L.D., ed. *Plant microbe interactions in biological control*. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 89-109.

- BÉLANGER, R.R.; LABBÉ, C.; JARVIS, W.R. Commercial-scale control of rose powdery mildew with a fungal antagonist. *Plant Disease*, v.78, n.4, p. 420-424, 1994.
- BENYAGOUB, M.; BÉLANGER, R.R. Development of a mutant strain of *Sporothrix flocculosa* with resistance to dodemorph-acetate. *Phytopathology*, v.85, n.7, p.766-769, 1995.
- BETTIOL, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v.5, p.59-97, 1997.
- BETTIOL, W.; GARIBALDI, A.; MIGHELI, Q. *Bacillus subtilis* for the control of powdery mildew on cucumber and zucchini squash. *Bragantia*, v.56, n. 2, p.281-287, 1997.
- BEUTHER, E.; PHILIPP, W.-D.; GROSSMANN, F. Untersuchungen zum Hyperparasitismus von *Ampelomyces quisqualis* auf Gurkenmehltau (*Sphaerotheca fuliginea*). *Journal of Phytopathology*, v.101, p.265-270, 1981.
- BEUTHER, E. Extrazelluläre polysaccharidabbauende Enzyme des Mehltauhyperparasiten *Ampelomyces quisqualis* Ces. Stuttgart: Universität Hohenheim, 1985. 107p. Tese, Doutorado.
- BOEKHOUT, T. A revision of ballistoconidia-forming yeasts and fungi. *Studies of Mycology*, v.33, p.1-192, 1991.
- CESATI, V. *Ampelomyces quisqualis* Ces.. *Botanische Zeitschrift*, v.10, p.301-302, 1852.
- CHONA, B.L.; MUNJAL, R.L. *Cicinnobolus cesatii* De Bary: Hyperparasite of powdery mildews in India. *Indian Phytopathology*, v.9, p.99-105, 1956.
- CHOUDHURY, S.R.; TRAQUAIR, J.A.; JARVIS, W.R. 4-Methyl-7,11-heptadecadienal and 4-methyl-7,11-heptadecadienoic acid: new antibiotics from *Sporothrix flocculosa* and *Sporothrix rugulosa*. *Journal of Natural Products*, v.57, n.6, p.700-704, 1994.
- CONTI, G.G.; BASSI, M.; MAFFI, D.; VIOLINI, G.; MAGNANI, L.; GATTI, L. Induced systemic resistance against *Sphaerotheca fuliginea* in cucumber: efficiency of Tobacco Necrosis Virus (TNV) and copper sulphate (CuSO<sub>4</sub>) in eliciting defense reactions. *Journal of Phytopathology*, v.140, n.2, p.123-132, 1994.
- DA PONTE, J. A new species of *Cicinnobolus*, parasite on *Oidium abelmoschi* Thüm. *Sydowia*, v.20, p.239-241, 1966.
- DE BARY, A. *Eurotium*, *Erysiphe*, *Cicinnobolus*: Nebst Bemerkungen über die Geschlechtsorgane von Ascomyceten. III. *Cicinnobolus*. *Abh. Seckenberg. Naturforschung*, v.7, p.413-435, 1870.
- EHRENBERG, C.G. Weintraubenkrankheit. *Botanische Zeitschrift*, v.11, p.15-16, 1853.
- ELAD, Y.; KIRSHNER, B.; NITZANI, Y.; SZTEJNBERG, A. Management of powdery mildew and gray mold of cucumber by *Trichoderma harzianum* T39 and *Ampelomyces quisqualis* AQ10. *Biocontrol*, v.43, p.242-251, 1999a.
- ELAD, Y.; MESSIKA, Y.; SZTEJNBERG, A. Can *Trichoderma harzianum* affect Powdery Mildew diseases?. In: INTERNATIONAL POWDERY MILDEW CONFERENCE, 1., 1999, Avignon, Resumos. Avignon, 1999b. p.37-38.
- ELAD, Y.; RAV DAVID, D.; LEVI, T.; KAPA, A.; KIRSHNER, B.; GUVIRIN, E.; LEVINE, A. *Trichoderma harzianum* T39 - mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. In: LYR, A.; RUSSELL, P.E.; DEHNE, H.-W.; SISLER, H.D., eds. *Modern fungicides and antifungal compounds II*. Andover: Intercept Ltd., 1999c. p. 459-468.
- FALK, S.P.; GADOURY, D.M.; CORTESI, P.; PEARSON, R.C.; SEEM, R.C. Parasitism of *Uncinula necator* cleistothecia by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. *Phytopathology*, v.85, n.7, p.794-800, 1995a.
- FALK, S.P.; GADOURY, D.M.; PEARSON, R.C.; SEEM, R.C. Partial control of powdery mildew by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. *Plant Disease*, v.79, n.5, p.483-490, 1995b.
- FERNANDES, M.C.A.; SANTOS, A.D. Cultivo de *Ampelomyces quisqualis* e interferência de fungicidas no seu crescimento, "in vitro". *Fitopatologia Brasileira*, v.21, n.1, p.26-29, 1996.
- GREGERSEN, P.L.; SMEDEGAARD, V. Induction of resistance in barley against *Erysiphe graminis* f. sp. hordei after preinoculation with the saprophytic fungus, *Cladosporium macrocarpum*. *Journal of Phytopathology*, v.124, n.1-4, p.128-136.
- HAJLAOUI, M.R.; BÉLANGER, R.R. Comparative effects of temperature and humidity on the activity of three potential antagonists of rose powdery mildew. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, v.97, n.4, p.203-208, 1991.

- HAJLAOUI, M.R.; BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R.R. Cytochemical study of the antagonistic activity of *Sporothrix flocculosa* on rose powdery mildew, *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*. *Phytopathology*, v.82, p.583-589, 1992.
- HAJLAOUI, M.R.; BÉLANGER, R.R. Antagonism of the yeast-like phylloplane fungus *Sporothrix flocculosa* against *Erysiphe graminis* var. *tritici*. *Biocontrol Science and Technology*, v.3, n.4, p.427-434, 1993.
- HAJLAOUI, M.R.; TRAQUAIR, J.A.; JARVIS, W.R.; BÉLANGER, R.R. Antifungal activity of extracellular metabolites produced by *Sporothrix flocculosa*. *Biocontrol Science and Technology*, v.4, n.2, p.229-237, 1994.
- HASHIOKA, Y.; NAKAI, Y. Ultrastructure of pycnidial development and mycoparasitism of *Ampelomyces quisqualis* parasitic on Erysiphales. *Transactions of Mycological Society*, v.21, p.329-338, 1980.
- HIJWEGEN, T. Effect of seventeen fungicidous fungi on sporulation of cucumber powdery mildew. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, v.94, n.4, p.185-190, 1988.
- HIJWEGEN, T. Biological control of cucumber powdery mildew with *Tilletiopsis minor* under greenhouse conditons. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, v.98, n.4, p.221-225, 1992.
- HIJWEGEN, T. & BUCHENAUER, H. Isolation and identification of hyperparasitic fungi associated with Erysiphaceae. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, v.90, p.79-84, 1984.
- HOCH, H.C.; PROVVIDENTI, R. Mycoparasitic relationships: cytology of the *Sphaerotheca fuliginea* - *Tilletiopsis* sp. interaction. *Phytopathology*, v.69, p.359-362, 1979.
- HWANG, B.K.; HEITEFUSS, R. Induced resistance of spring barley to *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Phytopathologische Zeitschrift*, v.103, p.41-47, 1982.
- 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.728-730, 1977.
- JARVIS, W.R.; SHAW, L.A.; TRAQUAIR, J.A. Factors affecting antagonism of cucumber powdery mildew by *Stephanosascus flocculosus* and *S. rugulosus*. *Mycological Research*, v.92, n.2, p.162-165, 1989.
- JENKYN, J.F.; BAINBRIDGE, A. Biology and pathology of cereal powdery mildews. In SPENCER, D.M., ed. *The Powdery Mildews*. New York: Academic Press, 1978. p. 284-312.
- KEHLENBECK, H.; SCHÖNBECK, F. Effects of induced resistance on disease severity/ yield relations in mildewed barley. *Journal of Phytopathology*, v.143, n.9, p.561-567, 1995.
- KISS, L. Graminicolous powdery mildew fungi as new natural hosts of *Ampelomyces* mycoparasites. *Canadian Journal of Botany*, v.75, n.5, p.680-683, 1997a.
- KISS, L. Genetic diversity in *Ampelomyces* isolates, hyperparasites of powdery mildew fungi, inferred from RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Mycological Research*, v.101, n.9, p.1073-1080, 1997b.
- KLECAN, A.L.; HIPPE, S.; SOMERVILLE, S.C. Reduced growth of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* induced by *Tilletiopsis pallescens*. *Phytopathology*, v.80, n.4, p.325-331, 1990.
- KNUDSEN, I.M.B.; SKOU, J.P. The effectivity of *Tilletiopsis albescens* in biocontrol of powdery mildew. *Annals of Applied Biology*, v.123, n.1, p.173-185, 1993.
- KREMER, M.; GROSSMANN, F. Untersuchungen zur antagonistischen Wirkung fluorizierender Pseudomonaden gegen Blattkrankheiten der Gerste. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Fortwirtschaft*, v.301, p.366, 1994.
- LAST, F.T. Factors associated with the distribution of some phylloplane microbes. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, v.76, p.140-143, 1970.
- LINNMANN, G. *Ampelomyces quisqualis* Ces., ein Parasit auf Mucorineen. *Archiv für Mikrobiologie*, v.60, p.59-75, 1968.
- MALATHRAKIS, N.E. The fungus *Acremonium alternatum* Linc.:Fr. a hyperparasite of the cucurbits powdery mildew pathogen *Sphaerotheca fuliginea*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, v.92, n.5, p.509-515, 1985.

- MINUTO, G.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Antagonistic activity of some microorganisms against powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) of zucchini. **Bulletin SROP**, v.14, n.5, p.181-186, 1991.
- MOHL, H. von. Über die Traubenkrankheit. **Botanische Zeitschrift**, v.12, p.137-146, 1854.
- NG, K.K.; MACDONALD, L.; PUNJA, Z.K. Biological control of rose powdery mildew with the antagonist yeast *Tilletiopsis pallescens*. **Hortscience**, v.32, n.2, p.262-266, 1997.
- PEARSON, C.; GOHEEN, A.C. Compendium of grape diseases. 2.ed. St Paul: APS, 1990. 93p.
- PHILIPP, W.-D. Extracellular enzymes and nutritional physiology of *Ampelomyces quisqualis* Ces., hyperparasite of powdery mildew in vitro. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.114, n.3, p.274-283, 1985.
- PHILIPP, W.-D.; CRÜGER, G. Parasitismus von *Ampelomyces quisqualis* auf Echten Mehltauipilzen an Gurken und anderen Gemüsearten. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.86, n.3/4, p.129-142, 1979.
- PHILIPP, W.-D.; BEUTHER, E.; GROSSMANN, F. Untersuchungen über den Einfluß von Fungiziden auf *Ampelomyces quisqualis* in Hinblick auf eine integrierte Bekämpfung von Gurkenmehltau unter Glas. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.89, p.575-581, 1982.
- PHILIPP, W.-D.; GRAUER, U.; GROSSMANN, F. Ergänzende Untersuchungen zur biologischen und intergrierten Bekämpfung von Gurkenmehltau unter Glas durch *Ampelomyces quisqualis*. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.91, n.4, p.438-443, 1984.
- PHILIPP, W.-D.; HELLSTERN, A. Biologische Mehltaubekämpfung mit *Ampelomyces quisqualis* bei reduzierter Luftfeuchtigkeit. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.93, n.4, p.384-391, 1986.
- PHILIPP, W.-D.; KIRCHHOFF, J. Wechselwirkungen zwischen Triadimefon und dem Mehltauhyperparasiten *Ampelomyces quisqualis* in vitro. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.90, n.1, p.68-72, 1983.
- RAO, V.G.; MHASKAR, D.N. Some nutrial studies on five isolates of *Ampelomyces quisqualis* Ces. **Phytopathologia Mediterranea**, v.15, p.14-17, 1976.
- REGLINSKI, T.; NEWTON, A.C.; LYON, G.D. Assessment of the ability of yeast-derived resistance elicitors to control barley powdery mildew in the field. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.101, n.1, p.1-10, 1994.
- RIESS, H. Über *Byssocystis textilis*. **Hedwigia**, v.1, p.23, 1852.
- ROGERS, D.P. On *Cicinobolus*. **Mycologia**, v.51, p.96-98, 1959.
- SEDDON, B.; MACKAY, N.; SCHMITT, A.; EISEMANN, S.; KOUMAKI, C.; MALATHRAKIS, N.E. Biological control of *Sphaerotheca fuliginea* with *Bacillus brevis* and Gramicidin S. In: INTERNATIONAL POWDERY MILDEW CONFERENCE, 1., Avignon, Resumos. Avignon, 1999. p.50-51.
- SHIVASTAVA, S.L.; BISHT, S. Inhibitory effect of some phylloplane fungi on powdery mildew disease development. **Indian Phytopathology**, v.39, n.1, p.83-86, 1986.
- STADNIK, M.J. Induction of resistance in wheat by a benzothiadiazole derivative against the powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*): practical aspects and mechanisms of action. Stuttgart: Universität Hohenheim, 1999. 139p. Tese, Doutorado.
- STEINER, U.; SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: HAMMERSCHMIDT, R., KUC, J. ed. **Induced resistance to disease in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.86-110, 1995.
- SUNDHEIM, L. Effects of four fungi on conidial germination of the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis*. **Acta Agric. Scandinavia**, v.32, p.341-347, 1982a.
- SUNDHEIM, L. Control of cucumber powdery mildew by the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* and fungicides. **Plant Pathology**, v.31, p.209-214, 1982b.
- SUNDHEIM, L.; AMUNDSEN, T. Fungicide tolerance in the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* and integrated control of cucumber powdery mildew. **Acta Agric. Scandinavia**, v.32, p.349-355, 1982.
- SUNDHEIM, L.; KREKLING, T. Host-parasite relationships of the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* and its powdery mildew host *Sphaerotheca fuliginea*. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.104, p.202-210, 1982.

- SZTEJNBERG, A.; GALPER, S.; MAZAR, S.; LISKER, N. *Ampelomyces quisqualis* for biological and integrated control of powdery mildews in Israel. *Journal of Phytopathology*, v.124, n.1-4, p.285-295, 1989.
- SZTEJNBERG, A.; MAZAR, S. Studies of the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* and preliminary trials on biological control of powdery mildew. *Phytoparasitica*, v. 11, p. 219-220, 1983.
- THORDAL-CHRISTENSEN, H., SMEDEGAARD-PETERSEN, V. Comparison of resistance-inducing abilities of virulent and avirulent races of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* and a race of *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* in barley. *Plant Pathology*, v.37, p.20-27,1988.
- TRAQUAIR, J.A.; SHAW, L.A.; JARVIS, W.R. New species of *Stephanoascus* with *Sporothrix* anamorphs. *Canadian Journal of Botany*, v.66, p.926-933, 1988..
- URQUHART, E.J.; MENZIES, J.G.; PUNJA, Z.K. Growth and biological control activity of *Tilletiopsis* species against powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) on greenhouse cucumber. *Phytopathology*, v.84, n.4, p.341-351, 1994.
- URQUHART, E.J.; PUNJA, Z.K. Epiphytic growth and survival of *Tilletiopsis pallescens*, a potential biological control agent of *Sphaerotheca fuliginea*, on cucumber leaves. *Canadian Journal of Botany*, v.75, n.6, p.892-901, 1997.
- VERHAAR, M.A. Biological control of powdery mildew in cucumber (*Sphaerotheca fuliginea*) and rose (*S. pannosa*) by means of mycoparasites. Wageningen: Universidade de Wageningen, 1998. 164p. Tese, Doutorado.
- YARWOOD, C.E. An overwintering pycnidial stage of *Cicinnobolus*. *Mycologia*, v.31, p.420-422, 1939.

# 5

## CONTROLE BIOLÓGICO DE *RHIZOCTONIA SOLANI* POR ISOLADOS DE *RHIZOCTONIA* SPP. NÃO-PATOGÊNICOS OU HIPOVIRULENTOS

Ana Maria R. Cassiolato

Nilton Luiz de Souza

### INTRODUÇÃO

*Rhizoctonia* spp. é um patógeno amplamente disseminado, estando presente na maioria dos solos cultivados e não-cultivados em todo o mundo. Ecologicamente, esse gênero é bastante diversificado e conhecido como patógeno de muitas famílias botânicas, como saprófitas no solo, ou como micorrizas em orquídeas. Isolados de *R. solani* Kühn e de *Rhizoctonia* spp. são responsáveis por sérios danos em importantes espécies de plantas cultivadas, tanto no campo como em cultivo protegido, podendo levar à perdas de produção em áreas infestadas e resultar em aumento de custos para o consumidor (Burpee et al., 1980b; Ogoshi, 1987; Parmeter & Whitney, 1970). O controle de *Rhizoctonia* spp. é difícil, visto que possui uma ampla gama de hospedeiros e pode sobreviver por muitos anos como micélio na matéria orgânica ou como escleródio no solo (Boosalis & Scharen, 1959; Hyakumachi & Ui, 1982).

A maioria das espécies de *Rhizoctonia* pode ser separada em dois grandes grupos, cuja divisão é baseada no número de núcleos por célula das hifas vegetativas, ou seja, multinucleadas ou binucleadas. Os isolados do grupo

multinucleado (o qual inclui *R. solani*) apresentam células com mais de três núcleos, hifas com cerca de 6 -10mm de diâmetro e, em seu estágio teleomórfico, são conhecidos como *Thanatephorus* spp., com exceções para *R. oryzae* e *R. zeae* (ambos tendo os estágios teleomórficos representados por *Waitea circinata*). Por outro lado, os isolados binucleados, que compreendem mais de 40 taxas, apresentam dois núcleos por célula (raramente 1 ou 3), as hifas com diâmetro entre 4 - 7mm, e a maioria recebe o nome de *Ceratobasidium* spp. em seu estágio teleomórfico, e alguns de *Tulasnella* spp. (Ogoshi, 1985).

O isolamento a partir de plantas doentes ou do solo é relativamente fácil e a identificação das muitas espécies é complexa, pois estas usualmente mostram grande variabilidade nas características cultural, fisiológica, ecológica e patogênica, entre outras. Baseado nesses referenciais e na capacidade das hifas formarem anastomose, as espécies deste patógeno têm sido divididas em grupos de anastomose (AGs) e alguns destes são subdivididos em grupos de anastomose intra-específicos (IAGs). Hifas de isolados pertencentes ao mesmo AG são atraídas e conectadas, ou fundidas umas às outras, enquanto isolados de diferentes AGs não exibem esse comportamento. As fusões ou anastomoses que ocorrem entre hifas de diferentes isolados de *Rhizoctonia* spp. de mesmo AG, chamadas "imperfeitas", resultam em morte de células das hifas envolvidas, as quais ficam com a aparência de plasmolizadas, comparadas com as células adjacentes (Naito & Sugimoto, 1978; Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1991).

A divisão em grupos de anastomose tem sido, até o momento, o principal meio de separação da variabilidade existente no gênero *Rhizoctonia* spp. Os isolados dentro de um mesmo AG apresentam características similares e, em alguns casos, têm mostrado capacidade de trocar informações genéticas (Anderson, 1982; Hwang et al., 1986; Parmeter et al., 1969; Ruppel, 1972; Sherwood, 1969; 1970). Novas técnicas, entretanto, têm sido desenvolvidas para melhor estimar as relações genéticas entre isolados agrupados em AGs e IAGs, tais como métodos de hibridização DNA/DNA (Kuninaga & Yokozawa, 1982a, b; 1985; Vilgalys, 1988), análises por RFLP (Jabaji-Hare et al., 1990; Liu et al., 1993; Vilgalys & Gonzales, 1990), análise por RAPD (Duncan et al.,

1993), análise de restrição por PCR (Cubeta et al., 1991b; Mazzola et al., 1996) e análise por padrões de isoenzimas (Laroche et al., 1992). Estes resultados deram evidências de que os grupos intra-específicos pertencentes ao mesmo grupo de anastomose devem representar grupos evolucionários distintos e por isso não ocorrem cruzamentos entre as populações. Esses novos dados também permitiram constatar que apesar da *R. solani* ter sido sempre relatado como um patógeno com ampla gama de hospedeiros, isolados pertencentes a certos grupos de anastomose e grupos intra-específicos foram particularmente associados com certas plantas hospedeiras, definindo melhor alguns grupos causadores de uma doença (Anderson et al., 1982; Leach & Garber, 1970). Conseqüentemente, esses dados facilitaram a ação de patologistas e melhoristas de plantas, permitindo otimizar as medidas de controle físicas, genéticas ou biológicas.

São numerosas também as espécies binucleadas de *Rhizoctonia* spp. e, por geralmente apresentarem morfologia muito simples, elas não podem ser facilmente diferenciadas umas das outras. O emprego do método de separação por grupos de anastomose para os isolados multinucleados tem mostrado resultados semelhantes. Dois sistemas foram propostos para a separação desses isolados: um por Ogoshi et al. (1979) e outro por Burpee et al. (1980a, b). O sistema proposto por Ogoshi et al. (1979), originalmente empregado para os isolados binucleados obtidos no Japão, consistiu de 15 grupos de anastomose designados de AG-A até AG-O. Os grupos AG-P e AG-Q (Oniki et al., 1986), AG-R (Burpee et al., 1980a) e AG-S (Ogoshi et al., 1983a, b) foram posteriormente descritos e adicionados ao sistema. Exceções para isolados que formam simbioses micorrízicas com as orquídeas, *R. repens*, posteriormente divididos em 2 subgrupos, R.r.1 e R.r.2 (ambos tendo as fases teleomórficas representadas por *Tulasnella calospora*). As fases teleomórficas de *R. oryzae* e *R. zae* foram descritas por Warcup & Talbot (1962) como *Waitea circinata*. Gunnell (1986), citado por Demirci (1998), descreveu três variedades de *W. circinata* baseado nas diferenças da morfologia das colônias durante o estado vegetativo: *W. circinata* var. *circinata*, *W. circinata* var. *oryzae* (anamorfo de *R. oryzae*) e *W. circinata* var. *zae* (anamorfo de *R. zae*).

Dentre esses AGs, o grupo AG-B foi subdividido por Ogoshi et al. (1979) em 3 grupos intra-específicos, os quais apresentaram alta frequência de anastomose e foram denominados AG-Ba, AG-Bb e AG-B (outros), também conhecido como AG-B(0). Posteriormente, Ogoshi (1985) expandiu os critérios usados para a separação em grupos intra-específicos para incluir as características de aparência cultural e patogenicidade, em adição à frequência de anastomose.

O segundo sistema, proposto por Burpee et al. (1980a, b) para os isolados norte-americanos, consistiu de 7 grupos de anastomose denominados de CAG-1 até CAG-7, devido ao nome que recebem na fase teleomórfica, *Ceratobasidium* sp.

Os dois sistemas acima descritos foram comparados por Ogoshi et al. (1983a, b), os quais observaram que muitos AGs eram equivalentes para ambos os sistemas, e que apenas alguns AGs independentes não possuíam grupos correspondentes em ambos os sistemas. Os grupos norte-americanos foram correspondentes aos grupos japoneses exceto por CAG-5 e CAG-7, os quais foram designados AG-R e AG-S, respectivamente. É possível que existam muitos outros grupos, pois ainda hoje pouco se conhece sobre as espécies binucleadas de *Rhizoctonia*, bem como sua distribuição geográfica ou seu papel e predominância nos sistemas de produção agrícola. Porém, já se sabe que nem todos os isolados são patogênicos. Alguns grupos incluem patógenos importantes (AG-A, Ba, Bb, D, E, e G); outros grupos, como o AG-A, são mistos e contêm também parasitas fracos e simbiontes micorrízicos de orquídeas, enquanto outros contêm isolados não-patogênicos ou sapróbios no solo. De qualquer forma, está claro que os grupos de anastomose não apresentam uniformidade entre as características dos isolados e necessitam de maior atenção (Ogoshi, 1985).

## Controle biológico

A ocorrência de uma doença é consequência da ação de um conjunto de eventos bióticos e abióticos e, portanto, seu controle pode ser otimizado quando os principais componentes do sistema são identificados e limitados em sua atividade. Essa abordagem constitui o que se denomina Manejo Integrado das Doenças de Plantas. Porém, na atualidade, principalmente pela pressão dos consumidores para obter produtos sem resíduos de pesticidas, tem-se incorporado

ao manejo integrado outros objetivos, com ênfase à utilização de práticas culturais e do controle biológico, visando a reduzir ou suprimir o uso de pesticidas. Dependendo da doença em questão, certas estratégias são recomendadas. Assim, em alguns casos o alvo é a diminuição do inóculo inicial, em outros, a proteção durante o período de maior suscetibilidade do hospedeiro, ou ainda, a diminuição da taxa de crescimento da doença, mantendo-a em níveis economicamente aceitáveis (Sanhueza, 1997).

Um grande número de trabalhos já foi publicado mostrando antagonistas e seus potenciais para o controle biológico, entretanto, muitos desses sistemas testados falharam em manter a consistência dos resultados ou os níveis adequados de controle, exceto em determinados sistemas de produção (Cook & Baker, 1983). A descoberta de novos agentes de controle biológico e a demonstração de seus valores na redução da incidência e severidade da doença abriu novos caminhos para sua aplicação prática na agricultura e com segurança ambiental (Boland, 1990).

Devido à gama de hospedeiros atacados pelo gênero *Rhizoctonia*, assim como sua habilidade para sobreviver sob condições ambiente adversas, na forma de escleródios, ele reduz enormemente o potencial do emprego de várias estratégias de controle, como a rotação de culturas (Ranney, 1971). O controle químico, em muitos hospedeiros, tem sido pouco eficiente e, em raros casos, tem ocorrido pelo emprego de variedades resistentes. Alguns fungicidas mostraram variar em sua eficiência entre e dentro de grupos de anastomose de *R. solani* (Kataria et al., 1991), sugerindo que seu uso extensivo poderia resultar no desenvolvimento de resistência, como já aconteceu com populações de outros patógenos.

Em solos em que pôde se observar a redução da doença causada por *Rhizoctonia* spp., e conseqüentemente do inóculo, o efeito supressivo foi diretamente relacionado como os níveis das populações de antagonistas, os quais suprimiram o crescimento micelial, paralisaram e lisaram as hifas e/ou mataram os escleródios (Chet & Baker, 1980; Hyakumachi et al., 1990; Liu & Baker, 1980). Dentre os antagonistas mais relatados estão alguns gêneros de bactérias (*Azotobacter*, *Streptomyces*, *Mixobacteria*, *Pseudomonas* e *Bacillus*) e de fungos

(*Acremonium*, *Aspergillus*, *Pseudocercospora*, *Pythium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Laetisaria*, *Penicillium*, *Verticillium* e *Rhizoctonia*), sendo que alguns antagonistas já estão sendo comercializados.

Dentre os antagonistas estudados, vários isolados não-patogênicos ou hipovirulentos de *Rhizoctonia* spp. têm mostrado resultados promissores no controle de tombamento de mudas. A eficácia desses agentes, demonstrada pelas altas porcentagens de proteção (80 – 97%), suporta seu potencial para o emprego como agentes de biocontrole de *Rhizoctonia* spp. (Harris et al., 1993b, 1994; Herr, 1988; Ichielevich-Auster et al., 1985b; Sneh & Ichielevich-Auster, 1998). Um resumo desses resultados pode ser observado na Tabela 1, organizada por Sneh (1996), mas modificada.

TABELA 1. Relatos de isolados de *Rhizoctonia* spp. de vários AGs e seu efeito protetor contra *Rhizoctonia* spp.

Isolados (AGs)	Proteção contra AGs	Hospedeiros
<b>Binucleados</b>		
A (CAG-2)	2-2 <sup>1</sup> ; 4 <sup>1</sup>	pepino <sup>1</sup>
Ba	2-2 <sup>1</sup> ; 3 <sup>2</sup> ; 4 <sup>1,7</sup>	pepino <sup>1,2</sup> , feijão <sup>2</sup> , batata <sup>2</sup>
Bb	--	
B(o)	1-IA <sup>3</sup> ; 1-IB <sup>2,5</sup> ; 2-2 <sup>4</sup> ; 4 <sup>1,5,7</sup>	repolho <sup>5</sup> , cenoura <sup>5</sup> , pepino <sup>1,5,7</sup> , alface <sup>5</sup> , rabanete <sup>5</sup> , beterraba açucareira <sup>4</sup> , salsa <sup>5</sup> , beterraba <sup>5</sup> , tomate <sup>5</sup> , <i>Festuca</i> spp. <sup>3</sup>
F (CAG-4)	--	
G	3 <sup>2,8</sup> , 4 <sup>13</sup>	pepino <sup>2</sup> , feijão <sup>2</sup> , batata <sup>2,8</sup> , repolho <sup>13</sup>
H, I, K, L, M, N	--	
O	4 <sup>2</sup> pepino <sup>2</sup> , feijão <sup>2</sup> , batata <sup>2</sup>	
P	1-IA <sup>5</sup> , 4 <sup>5,7</sup>	repolho <sup>5</sup> , cenoura <sup>5</sup> , pepino <sup>5,7</sup> , alface <sup>5</sup> , rabanete <sup>5</sup> , beterraba <sup>5</sup> , tomate <sup>5</sup> , salsa <sup>5</sup>
R (CAG-5)	4 <sup>8</sup> feijão <sup>8</sup>	
S (CAG-7)	--	
Não identificado	4 <sup>6,9,10,13,14</sup> , 8 <sup>1</sup>	<i>Agrostis</i> spp. <sup>10</sup> , petúnia <sup>9,14</sup> , couve de Bruxelas <sup>9</sup> , violeta <sup>9,14</sup> , repolho <sup>13</sup> , <i>Capsium</i> sp. <sup>14</sup> , <i>Celosia</i> sp. <sup>14</sup>
<i>R. repens</i>	--	
<i>R. anaticula</i>	--	
<b>Multinucleados</b>		
1, 2	--	
3 <sup>13</sup>	3 <sup>11</sup>	batata <sup>11</sup>
4 <sup>13</sup>	1-IA <sup>4</sup> , 4 <sup>13</sup> , <i>R. zeae</i> <sup>12</sup>	repolho <sup>12</sup> , cenoura <sup>12</sup> , algodão <sup>12</sup> , pepino <sup>6</sup> , alface <sup>12</sup>
5, 7, 10, BI	--	
<i>R. zeae</i>	--	

1. Villajuan-Abgona et al. (1996a); 2. Cubeta et al. (1995); 3. Yuen et al. (1994); 4. Herr (1988); 5. Sneh & Ichielevich-Auster (1995); 6. Escande & Echandi (1991); Cubeta et al. (1991a); 7. Sneh & Ichielevich-Auster (1998); 8. Cardoso & Echandi (1978a, b); 9. Harris et al. (1993a); 10. Burpee & Goulty (1984); 11. Bandy & Tavantzis (1990); 12. Ichielevich-Auster et al. (1985b). Sneh et al. (1986); 13. Ross et al. (1998); 14. Harris et al. (1994b).

Na literatura, resultados vêm sendo acumulados, mostrando que o potencial de isolados não-patogênicos ou hipovirulentos do gênero *Rhizoctonia* spp., de diferentes AGs, é variável na proteção contra diferentes isolados patogênicos de *Rhizoctonia* spp. (Burpee & Goultly, 1984; Cardoso & Echandi, 1987b; Herr, 1988; Villajuan-Abgona et al., 1996b). Resultados têm mostrado taxas variando de fraca (17 – 53%) a alta proteção (70 – 96%), como as reportadas para algodão, feijão, pepino, rabanete e trigo (Cardoso & Echande, 1987b; Ichielevich-Auster et al., 1985a, b; Sneh & Ichielevich-Auster, 1998; Sneh, 1996; Villajuan-Abgona et al., 1996a, b).

Diferentes mecanismos parecem estar envolvidos na supressão da doença e a proteção pode ser obtida pela associação de um ou mais deles, sendo que aqueles postulados por vários autores e os mais aceitos são: 1) hipovirulência transmissível envolvendo micovírus dsRNA; 2) competição por nutrientes e sítios de infecção; 3) indução de resistência no hospedeiro através da formação de barreiras físicas e/ou produção de substâncias inibitórias; 4) degradação de camadas cuticulares da epiderme, com indução de resistência; 5) produção de enzimas líticas pelo antagonista à parede celular dos patógenos (como pectinases, celulases, quitinases etc.).

## 1. Hipovirulência

A hipovirulência, a qual literalmente significa virulência subnormal, inclui todos os estados anormais nos quais a quantidade de doença é reduzida. As diferenças entre os tipos de hipovirulência supõe-se estarem associadas a informações genéticas relativas a determinantes nucleares (hipovirulência nuclear, que pode ser causada por genes nucleares mutantes, heterocários, nucléolos híbridos ou determinantes genéticos extracromossomais encontrados nos núcleos) ou a determinantes citoplasmáticos (hipovirulência citoplasmática, que pode ser condicionada por agentes como vírus, *virus-like*, plasmídios ou organelas, como as mitocôndrias, os quais carregam elementos genéticos (Elliston, 1982)).

A hipovirulência existe entre populações de patógenos e em particular dentro de AGs de *R. solani*, variando em uma graduação contínua de altamente

virulento até não-patogênico (Herr, 1982, 1992; Herr & Roberts, 1980). É complexo diferenciar os isolados hipovirulentos dos não-patogênicos, pois são comuns fungos portadores de fatores de hipovirulência citoplasmática. Durante os isolamentos, os fungos contendo hipovirulência citoplasmática usualmente eram e muitas vezes são descartados como contaminantes, pois as alterações morfológicas causadas pela presença desses fatores normalmente mascaram as características rotineiramente empregadas na identificação taxonômica (Elliston, 1982).

Doenças degenerativas controladas por fatores nucleares ou citoplasmáticos em *Rhizoctonia* spp. têm sido relatadas, assim como a transmissão dessas características genéticas para hipovirulência entre isolados, nas espécies de fungos fitopatogênicos. Hashiba et al. (1984) observaram que 3 isolados de *R. Solani* AG-4, os quais continham plasmídios de DNA (designados pRS64), eram hipovirulentos e apresentavam um crescimento anormalmente lento.

Fatores citoplasmáticos reportados por Castanho & Butler (1978) e Castanho et al. (1978) mostraram causar doenças degenerativas. Dos 13 isolados estudados, 3 continham dsRNA, foram hipovirulentos e apresentaram menor pigmentação micelial, redução da taxa de crescimento e de produção de escleródios. A transmissão do dsRNA entre isolados deu-se através de anastomoses de hifas e o isolado receptor (normal) passou a apresentar hipovirulência e anormalidades em cultivo. Quando incorporados ao solo junto às sementes de beterraba açucareira, esses isolados reduziram o tombamento de plântulas, mesmo que por um curto período. Os isolados pertencentes ao grupo AG-1 continham 3 segmentos de dsRNA extranucleares, porém as partículas virais não foram encontradas. Subseqüentes estudos, usando os mesmos isolados, não puderam reproduzir os resultados acima apresentados (Finkler et al., 1985; Hyakumachi et al., 1985; Kousik et al., 1994; Zanzinger et al., 1984).

Observações subseqüentes sugeriram que a presença dos segmentos de dsRNA, apesar desses não estarem associados com fenótipos específicos, afetava a virulência em *R. solani* (Jianhua et al., 1997; Tavantzis, 1988; Tavantzis & Lakshman, 1995). Posteriormente, surgiram outras evidências de que esses

segmentos carregavam diferentes informações genéticas, ocorriam em fungos genotipicamente diferentes e, indiretamente, interferiam em vias metabólicas. É importante citar que comparações entre dsRNA, oriundos de isolados binucleados obtidos de um mesmo solo ou provenientes de outros continentes, apresentavam diversidade genética (Bharathan & Tavantzis, 1990, 1991). Esses isolados, geneticamente diferentes, parecem ter efeitos variados, direta ou indiretamente, na virulência sobre seus respectivos hospedeiros.

Uma outra constatação da presença de dsRNA em *R. solani* veio de Hyakumachi et al. (1985). Os autores identificaram, em isolados dos AG-1, 2, 3, 4 e 5, diversos fragmentos de dsRNA, os quais apresentavam comportamento variando de altamente virulentos até hipovirulentos, levando os autores a concluir que dsRNA e virulência não estavam tão estreitamente relacionados. Vários trabalhos vêm apresentando resultados positivos de supressão de doenças por isolados não-patogênicos ou hipovirulentos de *Rhizoctonia* spp., cujos fatores aparentemente não foram transmissíveis entre linhagens (Burpee & Goult, 1984; Cardoso & Echandi, 1987a, b; Harris et al., 1993a, b; Herr, 1988; Ichielevich-Auster et al., 1985b; Sneh et al., 1989a). Outras observações relataram a baixa especificidade na proteção contra *Rhizoctonia* spp. pertencentes à diferentes AGs. Ichielevich-Auster et al. (1985b), empregando o isolado *Rhizoctonia* spp. binucleado 521, obtiveram a proteção de algodão, rabanete e aveia contra isolados de *R. solani* de diferente AGs e *R. zeae*.

## 2. Competição por nutrientes e sítios de infecção

O princípio do biocontrole por competição é baseado no fato de propágulos da maioria dos patógenos existirem em estado de dormência e requererem nutrientes exógenos tanto para sua germinação, próximo aos sítios de infecção, como para a penetração e infecção do hospedeiro. Assim, os agentes de biocontrole competidores agressivos agem com saprófitas, colonizando os substratos que seriam utilizados pelos patógenos (Baker & Dickman, 1992).

Os isolados não-patogênicos ou hipovirulentos variam em seus efeitos protetores frente a diferentes isolados virulentos de *Rhizoctonia* spp., exibindo

diferentes níveis de proteção. Aumentos consideráveis nessas taxas de proteção têm sido observados quando os isolados não-patogênicos são pré-inoculados e, assim, podem colonizar a superfície do tecido vegetal antes dos patógenos. Usualmente, ao colonizarem essas superfícies, os isolados não-patogênicos formam uma densa malha de micélio ao redor das raízes, dos caules e das folhas, sugerindo a ocorrência de competição física entre os isolados não-patogênicos e virulentos por nutrientes ou reconhecimento e ocupação dos sítios de infecção (Burpee & Goult, 1984; Cardoso & Echande, 1987a, b; Harris et al., 1993a, b; Sneh et al., 1989a, b; Villajuan-Abgona, 1996b; Xue et al., 1998; Yuen et al., 1994).

Sneh et al. (1989a, b) relataram que a remoção de hifas de isolados hipovirulentos de *Rhizoctonia* spp. da superfície das raízes ou do hipocótilo anulava a proteção das plântulas contra os isolados virulentos de *R. solani*, sugerindo que aqueles, ao formarem um denso manto de hifas sobre as raízes, ocupavam os possíveis sítios de infecção nas plântulas, prevenindo o reconhecimento e ocupação por virulentos.

Baseados nos isolamentos de superfície desinfestadas de caule de mudas de repolho, Ross et al. (1998) observaram que isolados binucleados infectavam e colonizavam o tecido interno do hipocótilo; no entanto, estas plântulas não pareciam danificadas. A adição de inóculo de não-patogênicas no momento do transplante, no campo, não mostrou elevar a proteção quando comparada com a obtida com o transplante de mudas pré-inoculadas. Dessa forma, foi sugerido que os possíveis modos de ação seriam a competição por sítios de infecção ou por produção de fitoalexinas e a indução de resistência.

O conteúdo de  $Ca^{++}$  nos tecidos das plantas influencia as taxas de pectinas solúveis e insolúveis e sua elevação pode aumentar a ligação cruzada com pectinas das paredes celulares envolvendo  $Ca^{++}$ , ajudando a reduzir a degradação de pectinas por enzimas pectinolíticas produzidas pelos isolados virulentos (McGuire & Kelman, 1986). Como a concentração de  $Ca^{++}$  aumenta naturalmente com a idade da planta, a resistência a *R. solani* também pode aumentar (Bateman & Lumsden, 1965). A concentração 3 a 4 vezes maior de  $Ca^{++}$  no córtex das

plântulas colonizadas por isolados não-patogênicos de *Rhizoctonia* spp. pode ter contribuído para a proteção dos tecidos corticais contra a penetração dos isolados virulentos.

### 3. Indução de resistência

A indução de resistência em plantas refere-se às alterações (físicas ou químicas) que ocorrem após a planta ter entrado em contato com um patógeno em potencial. Essas mudanças dependem do reconhecimento entre o patógeno e o hospedeiro e podem ocorrer de forma localizada ou sistêmica. A indução de resistência em plantas é uma resposta comum também à presença de microrganismos não-patogênicos e se torna mais efetiva quando da inoculação de plantas com isolados não-patogênicos ou hipovirulentos, antes da inoculação do patógeno ou concomitantemente à ela. Uma vez que a resistência foi induzida, a planta expressa diferentes respostas de defesa também induzidas, incluindo produção de enzimas líticas à parede celular, tais como quitinases e 1,3-b-glucanases (Lawton & Lamb, 1987); síntese de fitoalexinas (Kuc & Rush, 1985); reforço da parede celular pelo aumento da atividade das peroxidases (Hammerschmidt & Kuc, 1982) e deposição de lignina, calose e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (Hammerschmidt et al., 1982; 1984).

Estudando a natureza da proteção de plântulas de feijão por isolados binucleados de *Rhizoctonia* sp., Cardoso & Echandi (1987b) observaram que estes, quando crescendo na presença de exsudatos de raízes de feijão, colonizaram extensivamente a rizosfera, o rizoplano e a superfície do hipocótilo, sem causar danos ao tecido. Esse fato sugeriu o controle de *R. solani* tanto por competição por sítios de infecção como por indução dos mecanismos de defesa da planta. Quando exsudatos de raízes de plântulas tratadas com os isolados não-patogênicos inibiram *R. solani in vitro*, ficou evidente que a presença destes isolados induzia mudanças na composição dos exsudatos, como a liberação de compostos tóxicos ao patógeno. A fungístase induzida reduzia o potencial de inóculo de *R. solani*, confirmando a hipótese de indução de resistência. Para confirmar, os autores eliminaram as hifas dos agentes de biocontrole que cresciam na superfície das

plântulas antes do transplante e constataram que as plantas continuavam protegidas, confirmando, portanto, ser esse o mecanismo principal de proteção nesse sistema estudado.

Coincidentes resultados foram obtidos por Sneh & Ichielevich-Auster (1995; 1998), os quais observaram que certos isolados não-patogênicos de *Rhizoctonia* spp, na presença de *R. solani*, *Pythium aphanidermatum* ou *Pseudomonas syringae* pv. *lacrymans*, induziam resistência e eram protetores de regiões mais altas de hipocótilo e folhas de plântulas de pepino. A redução no número de pontos de infecção formados pelo patógeno em plântulas colonizadas pelo isolado não-patogênico sugeriu fortemente seu papel na indução de resistência em plântulas.

Vários relatos têm mostrado alterações de cutícula e lignificação envolvidas na resistência de hipocótilos de feijão à infecção por isolados virulentos de *R. solani*. Isso deve-se, possivelmente, ao fato da lignificação tornar as paredes celulares das plantas mais resistentes aos ataques de enzimas hidrolíticas, reduzindo a difusão de toxinas do patógeno, impedindo a utilização de nutrientes do hospedeiro e reduzindo o avanço e crescimento do patógeno (Pascholati & Leite, 1994).

Da mesma forma, isolados não-patogênicos binucleados de *Rhizoctonia* spp., quando inoculados antes dos isolados patogênicos ou juntamente com estes, mostraram induzir alterações anatômicas e celulares em tecidos de plântulas de feijão (Xu et al., 1998). Estas também apresentaram poucas lesões necróticas e reduzida severidade da doença, quando comparadas com as não-tratadas. A colonização de células epidérmicas pelos isolados binucleados foi associada com uma deposição generalizada de um material eletrodenso, rico em lignina, suberina e compostos fenólicos, nas paredes celulares das plantas. Plantas pré-inoculadas (48h) com isolados binucleados apresentaram um significativo e sistemático aumento, nas células, de peroxidase, 1,3- $\beta$ -glucanase e quitinase quando comparadas com as plantas doentes ou testemunha. Ambos, 1,3- $\beta$ -glucanase e peroxidase, foram posteriormente correlacionadas com a indução de resistência, pois mudanças na produção de peroxidase, a qual cataliza as etapas finais da

polimerização na síntese de lignina, parecem estar diretamente associadas com o aumento da habilidade de proteger sistematicamente o tecido lignificado (Hammerschmidt & Kuc, 1982). Assim, a deposição desses compostos parece promover uma barreira física ou química contra a invasão de *R. solani*.

Mecanismos de indução de resistência em plantas pela presença de isolados hipovirulentos ou não-patogênicos de *Rhizoctonia* spp. têm sido sugeridos por alguns autores, porém, a exemplo deste e de outros sistemas, poucas são as confirmações de que isolados não-patogênicos de *Rhizoctonia* spp. induziram a produção de camadas cuticulares mais espessas, lignificação ou uma maior produção de polifenóis (Sneh et al., 1989a).

#### 4. Degradação das camadas da cutícula

A colonização das células epidérmicas por isolados não-patogênicos de *Rhizoctonia* spp. tem sido associada com a deposição de material eletricamente denso, rico em lignina, suberina e compostos fenólicos, na parede celular. A deposição desses compostos parece proporcionar uma barreira física ou química à invasão de *R. solani* e esta indução de resistência sistêmica pode ser analisada pela presença das enzimas peroxidases ou pelo aumento da atividade de enzimas como hidrolases, quitinases e 1,3- $\beta$ -glucanase, dentre outras.

Villajuan-Abgona et al. (1996b) observaram que o isolado não-patogênico, protetor e binucleado de *Rhizoctonia* spp. (W-7, AG-A) degradou a camada cuticular da epiderme do pepino sem penetrar as células epidérmicas, deixando a superfície coberta por uma fina camada de um material viscoso, ao mesmo tempo que induziu, de forma consistente, a capacidade de isolados patogênicos de *R. solani* em formar pontos de infecção no hipocótilo. Essa camada não foi observada nas plântulas do controle ou nas infectadas com *R. solani*, o qual penetrou o hipocótilo e as raízes, destruindo os tecidos vegetais. Os autores sugeriram que a camada viscosa seria formada por produtos da degradação da pectina da parede celular das plantas e que os oligômeros de pectina, liberados pela atividade de enzimas pectinolíticas de isolados não-patogênicos de *Rhizoctonia* spp., estimulavam as reações de defesa na planta. Hifas lisadas de ambos os isolados,

virulento e hipovirulento, também foram observadas em associação com a camada viscosa nas plântulas inoculadas com estes isolados. A lise provavelmente foi causada por enzimas líticas produzidas pelas células das plantas e induzidas pela presença do isolado não-patogênico e/ou pelas enzimas autolíticas dos fungos. Ficou sugerido, assim, que essa barreira e as enzimas líticas preveniram a penetração de ambos os isolados, não-patogênico e virulento, na epiderme das plantas.

O envolvimento da quitinase e de outros mecanismos de resistência na proteção de plântulas por isolados não-patogênicos tem sido demonstrado por alguns autores. Quitinase em combinação com 1,3- $\beta$ -glucanase pode proteger a planta de infecções por fungos devido à ação lítica direta sobre as paredes celulares do fungo (Mauch et al., 1998) ou por liberarem oligossacarídeos como sinais moleculares, os quais podem ativar uma variedade de defesas na planta (Ryan, 1988). Entretanto, vários autores, entre eles Tschen & Hsue (1995) e Xue et al. (1998), não encontraram correlação linear entre a indução de resistência e a elevada atividade de quitinase encontrada e/ou ocorrência de doenças.

A indução de resistência é composta por vários componentes e são necessárias mais investigações sobre esses ou outros mecanismos atuando, isolados ou em conjunto, na resistência sistêmica.

## 5. Produção de enzimas líticas por antagonistas

O significado do micoparasitismo para o controle de doenças é determinado pelas propriedades específicas dos antagonistas para excluir ou ocupar nichos de fungos fitopatogênicos, como também pelo comportamento ecofisiológico do patógeno. O micoparasitismo é um processo complexo que pode afetar tanto a hifa em contato como todo o micélio. Fatores genéticos e fisiológicos estão envolvidos na determinação da não-patogenicidade, hipovirulência ou virulência de isolados de *Rhizoctonia* spp. A digestão enzimática da parede celular dos fitopatógenos, por ação de glucanases, celulases e quitinases, tem sido rotineiramente detectada entre agentes de biocontrole, sendo também observada entre vários isolados não-patogênicos de *Rhizoctonia* spp.

(Benhamow & Chet, 1993; Chèrif & Benhamou, 1990; Deacon & Berry, 1992; Elad, 1986; Lifshitz et al., 1984).

Enzimas produzidas têm papel fundamental na patogenicidade de *Rhizoctonia* spp. e a baixa ou não produção de enzimas, como pectina liase (Marcus et al., 1986) e celulase (Sneh et al., 1989a), tem sido correlacionada com a hipovirulência de alguns isolados.

Os agentes de biocontrole, isolados binucleados de *Rhizoctonia* spp. e de *R. solani* hipovirulentos, não aparentam controlar *Rhizoctonia* spp. por antagonismo direto, parasitismo de hifas ou antibiose (Cardoso & Echandi, 1987a, b; Harris et al., 1993b, c; Ichielevich-Auster et al., 1985b; Sneh et al., 1989a; Villajuan-Abgona, 1996b). No entanto, alguns isolados têm mostrado ação protetora contra outros fitopatógenos, como *Pythium ultimum* (Walther & Gindrat, 1987), *P. ultimum* var. *sporangiferum* (Harris et al., 1993b; Siwek et al., 1995, 1997), *P. aphanidermatum* e *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Sneh & Ichielevich-Auster, 1995).

Isolados de *Rhizoctonia* spp. não-patogênicos, inoculados em sementes de beterraba açucareira, mostraram controlar *P. ultimum* tanto em solo natural como em solo artificialmente infestado (Walther & Gindrat, 1987). Apesar de não terem observado o micoparasitismo, os autores constataram a necessidade da presença de hifas ativas dos antagonistas para o controle do tombamento.

O micoparasitismo entre hifas de dois isolados binucleados não-patogênicos de *Rhizoctonia* spp. contra *P. ultimum* var. *sporangiferum*, crescendo em meio de cultura ágar-água ou sobre sementes tratadas, foi estudado por Siwek et al. (1995; 1997). Os autores não puderam evidenciar existência de efeitos de "pré-contato" nas hifas do patógeno pelos antagonistas, tais como a inibição de crescimento de pontas de hifas, alterações visíveis no citoplasma ou lise de hifas antes do contato, os quais geralmente ocorrem devido à ação de metabólitos extracelulares previamente liberados pelo antagonista. No entanto, foram reveladas interações de "pós-contato" entre os isolados binucleados e o fitopatógeno, com a constatação do crescimento paralelo de hifas do antagonista e do patógeno, formação de gancho, enovelamento de hifas ao redor do patógeno

e posterior penetração e crescimento dentro das suas estruturas, com a conseqüente desorganização do seu citoplasma. Foram detectadas também alterações na estrutura da parede celular do fitopatógeno e a presença de aberturas de penetração, aparentemente devido à digestão pelos isolados de *Rhizoctonia* spp. binucleados. Quando estes dois isolados foram testados como bioprotetores de sementes de pimentão, hifas do *P. ultimum* var. *sporangiiferum* também foram parasitadas, sendo constatados o crescimento paralelo de hifas sobre a superfície das sementes, formação de ganchos e enovelamentos de hifas por parte dos antagonistas. Essas observações indicaram que o micoparasitismo é o possível modo de ação desses isolados de *Rhizoctonia* spp. binucleados contra *P. ultimum* var. *sporangiiferum*, porém mais estudos serão necessários para melhor esclarecer o papel e o significado desse parasitismo na proteção de plântulas.

Um outro fator que parece essencial no controle desse patógeno, e de outros, é a presença de melanina nas hifas. Isolados não-patogênicos de *Rhizoctonia* spp. são freqüentemente hialinos (Villajuan-Abgona et al., 1996b). Pontas de hifas de isolados binucleados ou hipovirulentos de *Rhizoctonia* spp. penetram apenas intercelularmente nas camadas da epiderme do hospedeiro, não sendo capazes de penetrarem intracelularmente, como os isolados patogênicos (Eayre & Echandi, 1988; Sneh et al., 1989b). Seria interessante descobrir se a falta de melanina nas hifas de isolados não-patogênicos está realmente relacionada com a redução de virulência (ou com a avirulência).

### Sobrevivência no solo

Muitos isolados efetivos de *Rhizoctonia* spp. não-patogênicos ou hipovirulentos crescem relativamente mais devagar que os virulentos. O que pode ser uma desvantagem para estes agentes de biocontrole pode ser contornado através de inoculações empregando sementes colonizadas, as quais podem ser depositadas próximo às sementes, nas covas ou sementeiras. Essa rica fonte de nutrientes aumenta consistentemente o potencial de inóculo, proporcionando uma significativa vantagem competitiva sobre os propágulos dos isolados virulentos naturalmente existentes no solo, os quais estão freqüentemente

associados a restos de culturas exauridos (Sneh et al., 1986). Assim, as hifas fisiologicamente mais ricas e fortes dos isolados antagonistas deverão crescer vigorosamente e colonizar rapidamente as sementes germinadas, raízes e hipocótilos, formando o denso manto micelial antes e com maior potencial de inóculo que os virulentos. Quanto mais precoce a colonização pelos isolados não-patogênicos, mais altas serão as taxas de proteção obtidas (Harris et al., 1993b).

Os isolados de *Rhizoctonia* spp. não-patogênicos sobrevivem nas raízes até a época da colheita e, após este período, em restos das plantas (Sneh et al., 1986). Sua sobrevivência no solo depende do tipo de substrato colonizado, profundidade do solo e regime de água (Cubeta et al., 1991a).

*R. solani* pode sobreviver no solo e nos tecidos de vegetais como hifas espessas e escuras, resultantes da colonização parasítica ou saprofítica de tecidos vegetais, ou como escleródios dormentes (Boolis & Scharen, 1959; Naiki, 1985). Isolados binucleados de *Rhizoctonia* spp. sobrevivem nas raízes de culturas até o período da colheita e, após esta, nos restos de plantas (Sneh et al., 1986). Os isolados hipovirulentos ou não-patogênicos compreendem uma parte significativa na ampla distribuição da população de *Rhizoctonia* spp. no solo e podem atingir proporções consideráveis, tais como 10 - 30% ou mais (Cubeta et al., 1995; Ichievich-Auster et al., 1985a; Villajuan-Abgona et al., 1996a). A freqüência dos isolados no solo depende muito do método utilizado para o isolamento.

Ceresini & Souza (1997) constataram que dentre os 51 isolados de *Rhizoctonia* spp., obtidos de plantas de feijoeiro provenientes de regiões produtoras do Estado de São Paulo, 23 isolados eram binucleados. Destes, 24 isolados foram não-patogênicos às plântulas do feijoeiro em cultivo protegido (Cassiolato et al., 1997). Estudando isolados de *Rhizoctonia* spp., provenientes de áreas produtoras de amendoim do Estado de São Paulo, Ceresini et al. (1996) caracterizaram 42 dos 47 isolados como binucleados. Destes, 21 isolados foram não-patogênicos às plântulas do amendoim em cultivo protegido (Cassiolato et al., dados não publicados), uma proporção bem mais elevada se comparada aos resultados obtidos com os isolados de feijoeiros.

Os fatores que afetam a presença dos isolados hipovirulentos dos vários AGs no solo têm sido pouco estudados. Sua distribuição no solo parece estar relacionada com determinadas condições ambiente, as quais incluem o histórico de plantio, nutrição e clima, mas especialmente temperatura e umidade (Sneh, 1996). Assim, sua sobrevivência nos solos depende principalmente do tipo de substrato colonizado, da profundidade no solo e do regime de rega (Cubeta et al., 1991a). Quando substratos orgânicos frescos e/ou sementes germinadas estão à disposição, a densidade desses propágulos aumenta. A habilidade saprofítica associada à longa sobrevivência no solo dos isolados binucleados, e à semelhança de *R. solani*, parece ser uma importante característica para a redução dessa doença (Burpee & Goult, 1984; Cardoso & Echandi, 1987a; Escande & Echandi, 1991; Harris et al., 1993c, 1994; Herr, 1988, 1995; Ichielevich-Auster et al., 1985b; Sneh, 1996; Villajuan-Abgona et al., 1996b).

*Rhizoctonia* spp. binucleados têm sido detectados colonizando plântulas, protegendo-as da infecção por *R. solani*, assim como em restos de culturas, como cascas de amendoim, que podem servir de agentes de disseminação não-sintomática. As cascas colonizadas por *Rhizoctonia* spp. binucleadas apodrecem vagarosamente, tendo sido observadas no solo de 1-3 anos após a colheita do amendoim e o cultivo de outras culturas (Bell et al., 1986; Ceresini et al., 1996). No entanto, isolados patogênicos de *R. solani* (AG-4) também foram encontrados em cascas de vagens de amendoim destacadas, permanecendo no solo por cerca de 12 meses em áreas com outras culturas plantadas após o amendoim (Baird et al., 1993; Bell et al., 1986). Assim, isolados não-patogênicos de *Rhizoctonia* spp. no solo, com potencial de inóculo razoáveis, poderiam infestar as plântulas protegendo-as contra o ataque de *R. solani* e colonizar previamente os restos culturais, competindo com os isolados patogênicos e diminuindo sua concentração de inóculo para as próximas culturas.

### **Atuação como promotores de crescimento de plantas**

Em adição à proteção de plântulas, vários isolados não-patogênicos de *Rhizoctonia* spp. mostraram promover o crescimento de plantas, tanto na ausência do isolado

Os fatores que afetam a presença dos isolados hipovirulentos dos vários AGs no solo têm sido pouco estudados. Sua distribuição no solo parece estar relacionada com determinadas condições ambiente, as quais incluem o histórico de plantio, nutrição e clima, mas especialmente temperatura e umidade (Sneh, 1996). Assim, sua sobrevivência nos solos depende principalmente do tipo de substrato colonizado, da profundidade no solo e do regime de rega (Cubeta et al., 1991a). Quando substratos orgânicos frescos e/ou sementes germinadas estão à disposição, a densidade desses propágulos aumenta. A habilidade saprofítica associada à longa sobrevivência no solo dos isolados binucleados, e à semelhança de *R. solani*, parece ser uma importante característica para a redução dessa doença (Burpee & Goulty, 1984; Cardoso & Echandi, 1987a; Escande & Echandi, 1991; Harris et al., 1993c, 1994; Herr, 1988, 1995; Ichievich-Auster et al., 1985b; Sneh, 1996; Villajuan-Abgona et al., 1996b).

*Rhizoctonia* spp. binucleados têm sido detectados colonizando plântulas, protegendo-as da infecção por *R. solani*, assim como em restos de culturas, como cascas de amendoim, que podem servir de agentes de disseminação não-sintomática. As cascas colonizadas por *Rhizoctonia* spp. binucleadas apodrecem vagarosamente, tendo sido observadas no solo de 1-3 anos após a colheita do amendoim e o cultivo de outras culturas (Bell et al., 1986; Ceresini et al., 1996). No entanto, isolados patogênicos de *R. solani* (AG-4) também foram encontrados em cascas de vagens de amendoim destacadas, permanecendo no solo por cerca de 12 meses em áreas com outras culturas plantadas após o amendoim (Baird et al., 1993; Bell et al., 1986). Assim, isolados não-patogênicos de *Rhizoctonia* spp. no solo, com potencial de inóculo razoáveis, poderiam infestar as plântulas protegendo-as contra o ataque de *R. solani* e colonizar previamente os restos culturais, competindo com os isolados patogênicos e diminuindo sua concentração de inóculo para as próximas culturas.

### **Atuação como promotores de crescimento de plantas**

Em adição à proteção de plântulas, vários isolados não-patogênicos de *Rhizoctonia* spp. mostraram promover o crescimento de plantas, tanto na ausência do isolado

virulento como na presença de *R. solani* ou outros fitopatógenos. Taxas de desenvolvimento de plantas, quanto a peso e altura, variando de 15 a 60% ou mais, têm sido obtidas com cenoura, alface, algodão e trigo (Sneh et al., 1986), batata (Bandy & Tavantzis, 1990), *Capsicum* spp. (Harris et al., 1994; Ross et al., 1998), pimenta e plantas ornamentais (Harris et al., 1993b), rabanete (Hyakumachi et al., 1996) e pepino (Villajuan-Abgona et al., 1996a).

A agricultura sustentável requer a utilização de estratégias que permitam o aumento da produção de alimentos sem prejuízo ao meio ambiente e à saúde. Exceto pela incapacidade de causar sintomas da doença, espera-se dos isolados não-patogênicos (de mesma espécie ou gênero), com características similares aos respectivos fitopatógenos, a capacidade de competir, colonizar e ocupar os mesmos nichos ecológicos dos virulentos e proteger a planta. A capacidade de um isolado não-patogênico em proteger as plântulas contra doenças causadas por *Rhizoctonia* spp. e elevar a produtividade, permitindo um melhor desenvolvimento das plantas, pode ser de grande valia econômica. O desenvolvimento e a comercialização de formulações empregando isolados não-patogênicos selecionados de *Rhizoctonia* spp. poderão ser altamente rentáveis para a agroindústria, além de tornarem viável a sua aplicação na agricultura de forma segura para o ambiente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, N. A. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. **Annual Review of Phytopathology**, v.20, p.329-347, 1982.
- BAIRD, R.E.; BELL, D.K.; SUMNER, D.R.; MULLINIX, B.G.; CULBREATH, A.K. Survival of *Rhizoctonia solani* AG-4 in residual peanut shells in soil. **Plant Disease**, v. 77, p.973-975, 1993.
- BAKER, R.; DICKMAN, M.B. Biological Control of Fungi. In: BLAINE METTING, F.J., ed. **Soil microbial ecology**. New York: Marcel Dekker, 1992. p.275-306.
- BANDY, B.P.; TAVANTZIS, S.M. Effect of hypovirulent *Rhizoctonia solani* on Rhizoctonia disease, growth and development of potato plants. **American Potato Journal**, v.67, p.189-199, 1990.
- BATEMAN, D.F.; LUMSDEN, R.D. Relation of calcium content and nature of the pectic substances in bean hypocotyls of different ages to susceptibility to an isolate of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v.55, p.734-738, 1965.
- BELL, D.K.; SUMMER, D.R. Unharvested peanut pods as potential source of inoculum of soilborne plant pathogens. **Plant Disease**, v.68, p.1039-1042, 1986.
- BENHAMOU, N.; CHET, I. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. **Phytopathology**, v.83, p.1062-1071, 1993.

- BHARATHAN, N.; TAVANTZIS, S.M. Genetic diversity of double -stranded RNA from *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v.81, p.411-415, 1990.
- BHARATHAN, N.; TAVANTZIS, S.M. Assessment of genetic relatedness among double-stranded RNAs from isolates of *Rhizoctonia solani* from diverse geographic origins. **Phytopathology**, v.81, p.411-415, 1991.
- BOLAND, G.J. Biological control of plant disease with fungal antagonists: challenges and opportunities. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.12, p.295-299, 1990.
- BOOLIS, M.G.; SCHAREN, A.L. Methods for microscopic detection of *Aphanomyces euteiches* and *Rhizoctonia solani* associated with plant debris. **Phytopathology**, v.49, p.192-198, 1959.
- BURPEE, L.L.; GOULTY, L.G. Suppression of brown patch disease of creeping bentgrass by isolates of nonpathogenic *Rhizoctonia* spp. **Phytopathology**, v.74, p.692-694, 1984.
- BURPEE, L.L.; SANDERS, P.L.; COLE, H.J.; SHERWOOD, R.T. Anastomosis groups among isolates of *Ceratobasidium cornigerum* and related fungi. **Mycologia**, v.72, p.689-701, 1980a.
- BURPEE, L.L.; SANDERS, P.L.; COLE, H.J.; SHERWOOD, R.T. Pathogenicity of *Ceratobasidium cornigerum* and related fungi representing five anastomosis groups. **Phytopathology**, v.70, p.843-846, 1980b.
- CASSIOLATO, A.M.R.; CERESINI, P.C.; SOUZA, N.L. Potential of *Rhizoctonia* spp. binucleate and *R. solani* hypovirulent as biocontrol agent against *R. solani* Kuhn. APS/AMS Meeting, Rochester, NY, USA, 1997. **Phytopathology**, v.87 (supplement), p.S15, 1997.
- CARDOSO, J.E.; ECHANDI, E. Biological control of *Rhizoctonia* root rot of snap bean with binucleate *Rhizoctonia*-like fungi. **Plant Disease**, v.71, p.167-170, 1987a.
- CARDOSO, J.E.; ECHANDI, E. Nature of protection of bean seedlings from *Rhizoctonia* root rot by a binucleate *Rhizoctonia*-like fungus. **Phytopathology**, v.77, p.1548-1551, 1987b.
- CASTANHO, B.; BUTLER, E.E. *Rhizoctonia* decline: a degeneration disease of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v.68, p.1505-1510, 1978.
- CASTANHO, B.; BUTLER, E.E.; SHEPHERD, R.J. The association of double-stranded RNA with *Rhizoctonia* decline. **Phytopathology**, v.68, p.1515-1519, 1978.
- CERESINI, P.C.; SOUZA, N.L. Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e de *R. solani* Kühn GA 4 HGI e GA 2-2 IIIB ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.23, p.14-24, 1997.
- CERESINI, P.C.; FENILLE, R.C.; SOUZA, N.L. Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e de *R. solani* Kühn GA 4 HGI à vagens de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.22, p.145-156, 1996.
- CHET, I.; BAKER, R. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology**, v.70, p.994-998, 1980.
- CHÉRIF, M.; BENHAMOU, N. Cytochemical aspects of chitin break-down during the parasitic action of *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Phytopathology**, v.80, p.1406-1414, 1990.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St Paul: APS Press, 1983. 539p.
- CUBETA, M.A.; ECHANDI, E.; GUMPERTZ, M.L. Survival of binucleate *Rhizoctonia* species, biological control agents in soil and plant debris under field conditions. **Biological Control**, v.1, p.218-226, 1991a.
- CUBETA, M.A.; ECHANDI, E.; ABERNETHY, T.; VILGALYS, R. Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* species using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA gene. **Phytopathology**, v.81, p.1395-1400, 1991b.
- CUBETA, M.A.; ECHANDI, E.; SUM, M.L. Biological control of *Rhizoctonia* diseases with binucleate *Rhizoctonia* spp. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RHIZOCTONIA: Facts and Challenges in Pathology, Taxonomy, Ecology, and Disease Control, 1995, Noordwijkerhout, NE. **Abstracts...** Noordwijkerhout, 1995. N. P-8-16.
- DEACON, J.W.; BERRY, L.A. Modes of action of mycoparasites in relation to biological control of soilborne plant pathogens. In: TJAMOS, E.S.; PAPAIVIZAS, G.C.; COOK, R.J., ed. **Biological control of plant disease**. New York: Plenum Press, 1992. p. 157-167.

- DEMIRCI, E. *Rhizoctonia* species and anastomosis groups isolates from barley and wheat in Erzurum, Turkey. **Plant Pathology**, v.47, 10-15, 1998.
- DODMAN, R.L.; BARKER, K.A.; WALKER, J.C. A detailed study of the different modes of penetration by *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v.58, p.1271-1275, 1968.
- DUNCAN, S.; BARTON, J.E.; O'BRIEN, A. Analysis of variation in isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA assay. **Mycological Research**, v.97, p.1075-1082, 1993.
- EAYRE, C.G.; ECHANDI, E. Light and scanning microscopy of hypersensitive lesions associates with protection of *Phaseolus vulgaris* from *Rhizoctonia solani* induced by an avirulent binucleate *Rhizoctonia*-like fungus. **Phytopathology**, v.78, p.1524 (Abstr.), 1988.
- ELAD, Y. Mechanisms of interactions between rhizosphere microorganisms and soilborne plant pathogens. In: JENSEN, V.; KJOLLER, L.H.; SORENSEN, L.H., ed. **Microbial communities in soil**. London: Elsevier, 1986. p. 49-59.
- ELLISTON, J.E. Hypovirulence. **Advances in Plant Pathology**, v. 1, p.1-32, 1982.
- ESCANDE, A.R.; ECHANDI, E. Protection of potato from *Rhizoctonia* canker with binucleate *Rhizoctonia* fungi. **Plant Pathology**, v.40, p.197-202, 1991.
- FINKLER, A.; KOLTIN, Y.; BARASH, I.; SNEH, B.; POZINAK, D. Isolation of virus from virulent strains of *Rhizoctonia solani*. **Journal of General Virology**, v.66, p.1221-1232, 1985.
- HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**, v.20, 61-71, 1982.
- HAMMERSCHMIDT, R.; LAPORT, D.T.A.; MULDON, E.P. Cell wall hydroxyproline enhancement and lignin deposition as an early event in the resistance of cucumber to *Cladosporium cucumerum*. **Physiological Plant Pathology**, v.20, p.43-47, 1984.
- HARRIS, A.R.; SCHISLER, D.A.; NEATE, S.M. Culture of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* spp. on organic substrates for inoculation of seedlings in containers. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, p.337-341, 1993a.
- HARRIS, A.R.; SCHISLER, D.A.; RYDER, M.H. Binucleate *Rhizoctonia* isolates control *Pythium ultimum* var. *sporangiferum* and promote growth in *Capsicum* and *Celosia* seedlings in pasteurized potting medium. **Soil Biology and Biochemistry**, v.25, p.909-914, 1993b.
- HARRIS, A.R.; SCHISLER, D.A.; NEATE, S.; RYDER, M.H. Suppression of damping off caused by *Rhizoctonia solani* and growth promotion in bedding plant by binucleate *Rhizoctonia* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, v.25, p.263-268, 1993c.
- HARRIS, A.R.; SCHISLER, D.A.; NEATE, S.M.; RYDER, M.H. Suppression of damping-off caused by *Rhizoctonia solani*, and growth promotion, in bedding plants by binucleate *Rhizoctonia* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.263-268, 1994.
- HASHIBA, T.; HOMMA, Y.; HYAKUMACHI, M.; MATSUDA, I. Isolation of DNA plasmid in the fungus *Rhizoctonia solani*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.130, p.2067-2070, 1984.
- HERR, L.J. Characterization of hymenial isolates of *Thanatephorus cucumeris* on sugar beets in Ohio. **Plant Disease**, v.66, p.246-249, 1982.
- HERR, L.J. Biocontrol of *Rhizoctonia* crown and root rot of sugar beet by binucleate *Rhizoctonia* spp. and *Latimeria arvalis*. **Annals of Applied Biology**, v.113, p.107-108, 1988.
- HERR, L.J. Characterization of *Rhizoctonia* isolates associated with bottom rot of lettuce in organic soils in Ohio. **Phytopathology**, v.82, p.1046-1050, 1992.
- HERR, L.J. Biological control of *Rhizoctonia solani* by binucleate *Rhizoctonia* spp. and hypovirulent *R. solani*. **Crop Protection**, v.14, p.179-187, 1995.
- HERR, L.J.; ROBERTS, D.L. Characterization of *Rhizoctonia* populations obtained from sugar beets fields with differing soil textures. **Phytopathology**, v.70, p.476-480, 1980.
- HWANG, S.F.; SWANSON, T.A.; EVANS, I.R. Characterization of *Rhizoctonia solani* isolates from canola in west central Alberta. **Plant Disease**, v.70, p.681-683, 1986.

- HYAKUMACHI, M.; UI, T. The role of the overwintered plant debris and scleroti as inoculum in the field following sugar beet rot root. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, v.48, 628-633, 1982.
- HYAKUMACHI, M.; SUMINO, A.; UEDA, I.; SHIKATA, E. Relationship between the presence of dsRNA in *Rhizoctonia solani* and the pathogenicity. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, v.51, p.372-373, 1985.
- HYAKUMACHI, M.; KANZAWA, K.; UI, T. *Rhizoctonia* root rot decline in sugarbeet monoculture. In: HORNBY, D.; COOK, R.J.; HENIS, Y.; KO, W.H.; ROVIRA, A.D.; SCHIPPERS, B.; SCOTT, P.R., ed. *Biological control of soil-borne plant pathogens*. Wallingford: CAB International, 1990. p.227-247
- ICHIELEVICH-AUSTER, M.; SNEH, B.; KOLTIN, Y.; BARASH, I. Pathogenicity, host specificity and anastomosis groups of *Rhizoctonia* spp. isolated from soils in Israel. *Phytoparasitica*, v.13, p.103-112, 1985a.
- ICHIELEVICH-AUSTER, M.; SNEH, B.; KOLTIN, Y.; BARASH, I. Suppression of damping off caused by *Rhizoctonia* spp., by nonpathogenic *R. solani*. *Phytopathology*, v.75, p.1080-1084, 1985b.
- JABAJI-HARE, S.H.; MELLER, Y.; GILL, S.; CHAREST, M. Investigation of genetic relatedness among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* using cloned DNA probes. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v.12, p.393-404, 1990.
- JIANHUA, J.; LAKSHMAN, D.K.; TAVANTZIS, S.M. Association of distinct double-stranded RNAs with enhanced or diminished virulence in *Rhizoctonia solani* infecting potato. *MPMI*, v.10, p.1002-1009, 1997.
- KATARIA, H.R.; VERNA, P.R.; GISI, U. Variability in the sensitivity of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups to fungicides. *Journal of Phytopathology*, v.133, p.121-133, 1991.
- KOUSIK, C.S.; SNOW, J.P.; VALVERDE, R.A. Comparison of double stranded RNA components and virulence among isolates of *Rhizoctonia solani* AG1-1A and AG1-1B. *Phytopathology*, v.84, p.44-49, 1994.
- KUC, J.; RUSH, J.S. Phytoalexins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.236, p.455-472, 1985.
- KUNINAGA, S.; YOKOZAWA, R. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. I. Genetic relatedness within anastomosis group 1. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, v.48, p.659-667, 1982a.
- KUNINAGA, S.; YOKOZAWA, R. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. II. Genetic relatedness within anastomosis group 2. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, v.48, p.668-673, 1982b.
- KUNINAGA, S.; YOKOZAWA, R. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. VI. Genetic relatedness among seven anastomosis groups. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, v.51, p.127-132, 1985.
- LAROCHE, J.P.; JABAJI-HARE, S.H.; CHAREST, M. Differentiation of two anastomosis groups *Rhizoctonia solani* by isozyme analysis. *Phytopathology*, v.82, p.1387-1393, 1992.
- LAWTON, M.A.; LAMB, C. Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitors, wounding and infection. *Molecular Cell Biology*, v.7, p.335-341, 1987.
- LEACH, L.D.; GARBER, R.H. Control of *Rhizoctonia solani*. In: PARMETER, R.J., ed. *Rhizoctonia solani: biology and pathology*. London: Univ. California Press, 1970. p.189-198.
- LIFSHITZ, R.; DUPLER, M.; ELAD, Y.; BAKER, R. Hyphal interactions between a mycoparasite, *Pythium nunn*, and several soil fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, v.30, p.1482-1487, 1984.
- LIU, S.; BAKER, R. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, v.70, p.404-412, 1980.
- LIU, Z.L.; DOMIER, L.L.; SINCLAIR, J.B. ISG-specific ribosomal DNA polymorphism of the *Rhizoctonia solani* species complex. *Mycologia*, v.85, p.795-800, 1993.
- MARCUS, L.; BARASH, I.; SNEH, B.; KOLTIN, Y.; FINKLER, A. Purification and characterization of pectolytic enzymes produced by virulent and hypovirulent isolates of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.29, p.325-336, 1986.
- MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. Antifungal hydrolyses in pea tissues. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and b-1,3-glucanase. *Plant Physiology*, v.88, p.936-942, 1988.
- MAZZOLA, M. Classification and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from apple root and orchard soil. *Phytopathology*, v.86, p.354-360, 1996.

- McGUIRE, R.G.; KELMAN, A. Calcium in potato tuber cell walls in relation to tissue maceration by *Erwinia carotora* pv. *atroseptica*. *Phytopathology*, v.76, p.401-406, 1986.
- NAITO, S.; SUGIMOTO, T. Basidiospore infection and lesion development on sugarbeet leaves by *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, v.44, p.426-431, 1978.
- NAIKI, T. Population and survival of sclerotia of *Rhizoctonia solani*. In: PARKER, C.A.; ROVIRA, A.D.; MOORE, K.J.; WONG, P.T.W., ed. *Ecology and management of soilborne plant pathogens*. St. Paul: American Phytopathological Society, 1985. p. 51-53.
- OGOSHI, A. Anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia*. *Fitopatologia Brasileira*, v.10, p.371-390, 1985.
- OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annual Review of Phytopathology*, v.25, p.125-143, 1987.
- OGOSHI, A.; ONIKI, M.; ARAKI, T.; UI, T. Anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* in Japan and North America and their perfect state. *Transactions of Mycological Society of Japan*, v.24, p.79-87, 1983a.
- OGOSHI, A.; ONIKI, M.; ARAKI, T.; UI, T. Studies on the anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* and their perfect states. *Journal of the Faculty of Agriculture of Hokkaido University*, v.61, p.244-260, 1983b.
- OGOSHI, A.; ONIKI, M.; SAKAI, R.; UI, T. Anastomosis grouping among isolates of binucleate *Rhizoctonia*. *Transactions of Mycological Society of Japan*, v.20, p.33-39, 1979.
- ONIKI, M.; KOBAYASHI, K.; ARAKI, T.; OGOSHI, A. A new disease of turf-grass caused by binucleate *Rhizoctonia* AG-Q. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, v.52, p.850-853, 1986.
- PARMETER, J.R.J.; WHITNEY, H.S. Taxonomy and nomenclature of the imperfect stage. In: PARMETER, J.R.J. eds. *Rhizoctonia: biology and pathology*. Berkeley: Univ. California Press, 1970. p.7-19.
- PARMETER, J.R.J.; SHERWOOD, R.T.; PLATT, W.D. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology*, v.59, p.1270-1278, 1969.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência a doenças. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v.2, p.1-51, 1994.
- RANNEY, CDD Effective substitutes for alkylmercuric seed treatments in cotton seed. *Plant Disease*, v.55, p.285-288, 1971.
- ROSSI, R.E.; KEINATH, A.P.; CUBETA, M.A. Biological control of wirestem on cabbage using binucleate *Rhizoctonia* spp. *Crop Protection*, v.17, p.99-104, 1998.
- RUPPEL, E.G. Correlation of cultural characters and source of isolates with pathogenicity of *Rhizoctonia* from sugar beet. *Phytopathology*, v.62, p.202-205, 1972.
- RYAN, C.A. Oligosaccharides as recognition signals for the expression of defensive genes in plants. *Biochemistry*, v.27, p.8879-8883, 1988.
- SANHUEZA, R.M.V. Métodos alternativos de controle de doenças de plantas. *Summa Phytopathologica*, v.23, p.81, 1997.
- SHERWOOD, R.T. Morphology and physiology in four anastomosis groups in *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology*, v.59, p.1924-1929, 1969.
- SHERWOOD, R.T. Physiology of *Rhizoctonia solani*. In: PARMETER, J.R. J., ed. *Rhizoctonia: biology and pathology*. Berkeley: Univ. California Press, 1970. p.69-82.
- SIWEK, K.; HARRIS, A.R.; SCOTT, E.S. Hyphal interactions between binucleate *Rhizoctonia* and the plant pathogen *Pythium ultimum*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RHIZOCTONIA: Facts and Challenges in Pathology, Taxonomy, Ecology, and Disease Control, 1995, Noordwijkerhout, NE. Abstracts... Noordwijkerhout, 1995. N. P-4-2.
- SIWEK, K.; HARRIS, A.R.; SCOTT, E.S. Mycoparasitism of *Pythium ultimum* by antagonistic binucleate *Rhizoctonia* isolates in agar media and on capsium seeds. *Journal of Phytopathology*, v.145, p.417-423, 1997.

- SNEH, B. Mechanisms involved in protection of infection sites. In: BAKER, R.; DUNN, P., ed. **New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases**. New York: Alan Liss, 1990. p. 653-662.
- SNEH, B. Non pathogenic isolates of *Rhizoctonia* spp. (np-R) and their role in biological control. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G., ed. ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Dordrecht : Kluwer Acad. Publ., 1996. p. 473-483.
- SNEH, B.; ICHIELEVICH-AUSTER, M. Induced resistance of cucumber seedlings caused by non pathogenic *Rhizoctonia* (np-R) isolates. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *RHIZOCTONIA*: Facts and Challenges in Pathology, Taxonomy, Ecology, and Disease Control, 1995, Noordwijkerhout, NE. **Abstracts...** Noordwijkerhout, 1995. N. P-8-3.
- SNEH, B.; BURPEE, L.L.; OGOSHI, A. Identification of *Rhizoctonia* species. St. Paul: APS Press, 1991. 133p.
- SNEH, B.; ICHIELEICH-AUSTER, M. Induced resistance of cucumber seedlings caused by some non-pathogenic *Rhizoctonia* (np-R) isolates. **Phytoparasitica**, v.26, p.27-38, 1998.
- SNEH, B.; ICHIELEICH-AUSTER, M.; PLAUT, Z. Mechanism of seedling protection induced by a hypovirulent isolate of *Rhizoctonia solani*. **Canadian Journal of Botany**, v.67, p.2135-2141, 1989a.
- SNEH, B.; ICHIELEVICH-AUSTER, M.; SHOMER, I. Comparative anatomy of colonization of cotton hypocotyls and roots by virulent isolates of *Rhizoctonia solani*. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, p.2142-2149, 1989b.
- SNEH, B.; ZEIDAN, M.; ICHIELEVICH-AUSTER, M.; BARASH, I.; KOLTIN, Y. Increased growth responses induced by a nonpathogenic *Rhizoctonia solani*. **Canadian Journal of Botany**, v. 64, p.2372-2378, 1986.
- STOCKWELL, V.; HANCHEY, P. The role of the cuticle in resistance of bean to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v.73, p.1640-1642, 1983.
- TAVANTZIS, S.M. Biological control of *Rhizoctonia* disease and increased growth response of potato effected by hypovirulent *R. solani*. In: ENGELSTAD, S.; COLI, W.N.; CARLSON, J.L., ed. **Innovations in pest management**. Amherst: Univ. of Massachusetts Press, 1988. p. 44-46.
- TAVANTZIS, S.M.; LAKSHMAN, D.K. Virus-like double-stranded RNA elements and hypovirulence in phytopathogenic fungi. In: KOHMOTO, K.; SINGH, R.P.; SINGH, U.S., eds. **Pathogenesis and host-parasite specificity in plant disease: histopathological, biochemical, genetic and molecular basis**. Oxford: Elsevier, 1995. p. 249-267.
- TSCHEN, J.S.M.; HSUE, C.C. Control of *Rhizoctonia solani* by means of cross protection. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *RHIZOCTONIA*: Facts and Challenges in Pathology, Taxonomy, Ecology, and Disease Control, 1995, Noordwijkerhout, NE. **Abstracts...** Noordwijkerhout, 1995. N. P-8-9.
- VILGALYS, R. Genetic relatedness among anastomosis groups in *Rhizoctonia* as measured by DNA/DNA hybridization. **Phytopathology**, v.78, p.698-702, 1988.
- VILGALYS, R.; GONZALES, D. Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v.80, p.151-158, 1990.
- VILLAJUAN-ABGONA, R.; KAGEYAMA, K.; HYAKUMACHI, M. Biological control of *Rhizoctonia* damping off of cucumber by non pathogenic binucleate *Rhizoctonia*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 102, p.227-235, 1996a.
- VILLAJUAN-ABGONA, R.; KATSUNO, N.; KAGEYAMA, K.; HYAKUMACHI, M. Isolation and identification of hypovirulent *Rhizoctonia* isolates from soil. **Plant Pathology**, v.45, p.896-904, 1996b.
- WALTHER, D.; GINDRAT, D. Antagonism of *Rhizoctonia* spp. to *Pythium oligandrum* and damping-off fungi. **Journal of Phytopathology**, v.119, p.248-254, 1987.
- WARCUP, J.H.; TALBOT, P.H.B. Ecology and identity of mycelia isolated from soil. **Transactions of British Mycological Society**, v.45, p.495-518, 1962.
- XUE, L.; CHAREST, P.M.; JABAJI-HARE, S.H. Systemic induction of peroxidases, 1,3-b-glucanases, chitinases, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. **Phytopathology**, v.88, p.359-365, 1998.
- YUEN, G.Y.; CRAIG, M.L.; GIESLER, L.J. Biological control of *Rhizoctonia solani* on tall fescue using fungal antagonists. **Plant Disease**, v.78, p.118-123, 1994.
- ZANZINGER, D.H.; BANDY, B.; TAVANTZIS, S.M. High frequency of finding double-stranded RNA in naturally occurring isolates of *Rhizoctonia solani*. **Journal of General Virology**, v.65, p.1601-1605, 1984.

# 6

## SIDERÓFOROS E CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS

Cleusa Maria Mantovanello Lucon

### INTRODUÇÃO

Os agentes biocontroladores antagonizam patógenos através de mecanismos diretos e indiretos. Dentre os modos diretos de ação podem ser mencionados a competição, na qual a demanda por nutrientes ou espaço excede o suprimento imediato; a antibiose, na qual o antagonista secreta metabólitos prejudiciais ao patógeno e o parasitismo, no qual os nutrientes do patógeno são utilizados pelo agente de biocontrole. Por outro lado, interações indiretas são aquelas nas quais a própria planta responde à presença do antagonista através de mecanismos de resistência induzida a patógenos. Um mesmo antagonista pode ser capaz de apresentar mais de um mecanismo simultaneamente. Sabe-se, ainda, que diferentes antagonistas que atuam por diferentes mecanismos de ação podem, em conjunto, controlar a doença, como é o caso do controle biológico natural em solos supressivos.

Esforços têm sido realizados com a finalidade de se estudar os mecanismos de ação em organismos bem sucedidos no biocontrole, já que um melhor entendimento desses mecanismos poderia facilitar e contribuir para a otimização ou, ainda, para o direcionamento no desenvolvimento de métodos de

seleção e *screening*, necessários na fase inicial de todos os trabalhos de controle biológico de fitopatógenos. Essa etapa é considerada por muitos pesquisadores como uma das mais críticas para o sucesso da implantação do sistema.

Além disso, ferramentas modernas de biologia molecular têm auxiliado na compreensão dos mecanismos de ação utilizados por microrganismos biocontroladores. Essas oferecem, ainda, a possibilidade de aumentar a capacidade da atividade dos agentes de biocontrole, podendo resultar em um aumento na expressão dos genes responsáveis pelo mecanismo de interesse ou na deleção de outros genes que tragam características indesejáveis.

Dentre os modos diretos de ação, a competição por espaço ou sítios específicos nas raízes ou sementes tem sido sugerida como responsável pelo controle de numerosos patógenos de solo, embora relativamente poucos estudos tenham proporcionado evidências para a confirmação dessa hipótese.

A competição por ferro, mediada pela produção de substâncias quelantes do elemento, denominadas de sideróforos, por microrganismos antagonistas tem sido comprovada como um modo importante de ação dos agentes de biocontrole. Esse tipo de competição ocorre em solos em que o elemento ferro encontra-se em condições limitantes, o que é geralmente observado em solos com pH neutro a alcalino. Nessas condições, microrganismos e plantas dependem de agentes quelantes para solubilizar e transportar o ferro inorgânico.

Dentre os agentes quelantes mais importantes e de ocorrência natural, os sideróforos e fitossideróforos são encontrados em grande número e variedade, produzidos por microrganismos e relativamente poucas gramíneas Fe-eficientes, respectivamente.

Em geral, a maioria das pesquisas no transporte de ferro por microrganismos e plantas tem focado um único organismo. Entretanto, quase todos os microrganismos estudados têm sistemas de transporte de sideróforos, inclusive daqueles produzidos por outros organismos, permitindo, dessa forma, uma maior competição por Fe em ambientes naturais. Da mesma forma, algumas plantas Fe-eficientes mostraram a capacidade de adquirir ferro a partir de vários sideróforos microbianos. Todavia, os mecanismos envolvidos e a importância

relativa de microrganismos colonizadores de raízes e de seus sideróforos no mecanismo de aquisição de ferro pelas plantas no solo não são bem compreendidos.

A grande maioria dos fungos e das bactérias aeróbias tem genes codificadores para o funcionamento de sistemas de transporte Fe-induzido em condições limitantes do elemento. Fazem parte desse sistema os receptores e transportadores de sideróforos na membrana, as redutases, enzimas de degradação e proteínas reguladoras.

### Sideróforos e controle biológico

A maioria dos microrganismos aeróbios e anaeróbios responde a condições limitantes de ferro pela produção de sideróforos. Estes são agentes quelantes que possuem uma alta afinidade por Fe III, um baixo peso molecular (< 1500 Da) e seletivamente complexam e transportam Fe para o interior das células de microrganismos (Neiland, 1981; Leong, 1986).

Sabe-se que a solubilidade do hidróxido de ferro no solo é de aproximadamente  $10^{-38}$  M, sendo que a concentração do íon em pH 7 é de aproximadamente  $10^{-17}$  M, ou seja, longe de suprir o crescimento microbiano. Nessas condições, os microrganismos realmente ativos são somente aqueles capazes de produzir sideróforos (Lindsay & Schwab, 1982; Leong, 1986).

A competição por Fe, mediada pela produção de sideróforos, é considerada como um mecanismo importante no biocontrole de patógenos em solos em que o Fe disponível encontra-se em baixas concentrações (Leong, 1986).

Os sideróforos produzidos por agentes de biocontrole sequestram o Fe do ambiente, tornando-o indisponível aos fitopatógenos e/ou microrganismos deletérios, ocasionando, dessa forma, uma inibição no seu crescimento (Weller, 1988). Existem evidências genéticas e bioquímicas que demonstram seu papel na promoção de crescimento de plantas e no controle biológico de fitopatógenos (Dowling & O'Gara, 1994).

Os patógenos são sensíveis à ação de agentes quelantes de Fe produzidos pelos antagonistas, em virtude de não os produzirem; de os produzirem

em pequena quantidade ou com menor afinidade pelo elemento; de serem incapazes de utilizar sideróforos produzidos pelos antagonistas ou, ainda, de produzirem sideróforos que podem ser utilizados pelos antagonistas (Schroth & Hancock, 1982; Buyer & Leong, 1986; Magazin et al., 1986; Weller, 1988; Buyer et al., 1989).

A importância desse mecanismo tem sido comprovada pela comparação do efeito de isolados selvagens produtores de sideróforos e de mutantes deficientes para sua produção ou, ainda, pela adição ao solo de sideróforos purificados ou de agentes quelantes de ferro sintéticos (Kloepper et al. 1980 ab; Elad & Baker, 1985; Van Peer et al., 1990; Kraus & Loper, 1992; Duijff et. al., 1994).

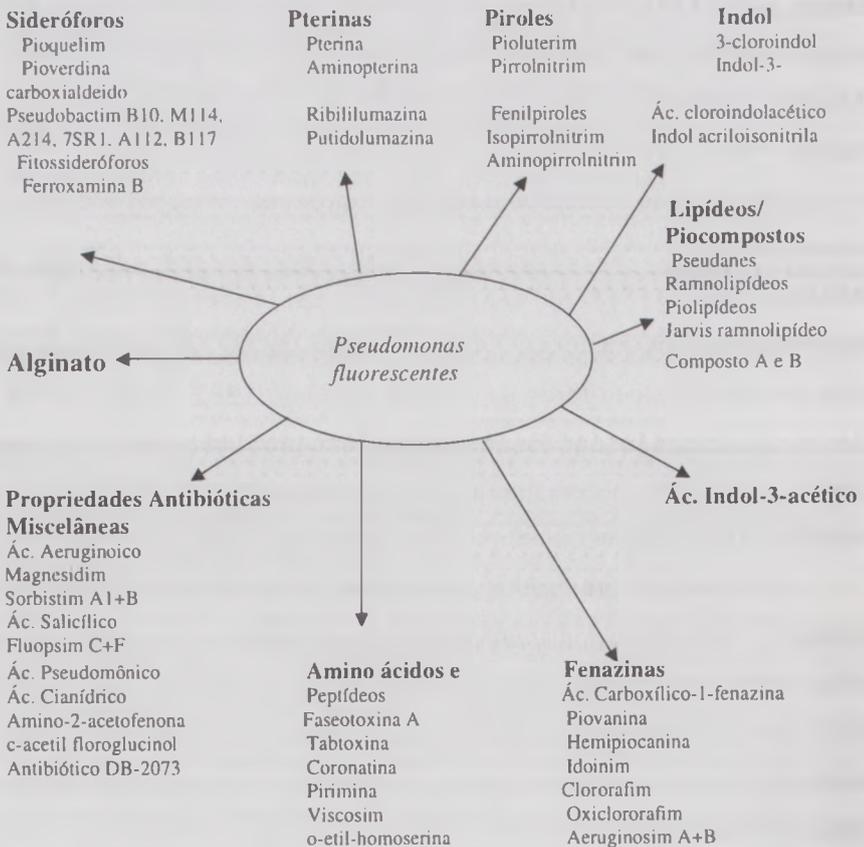


FIGURA 1. Metabólitos secundários e outros compostos produzidos por *Pseudomonas* spp. fluorescentes (Dowling & O'Gara, 1994)

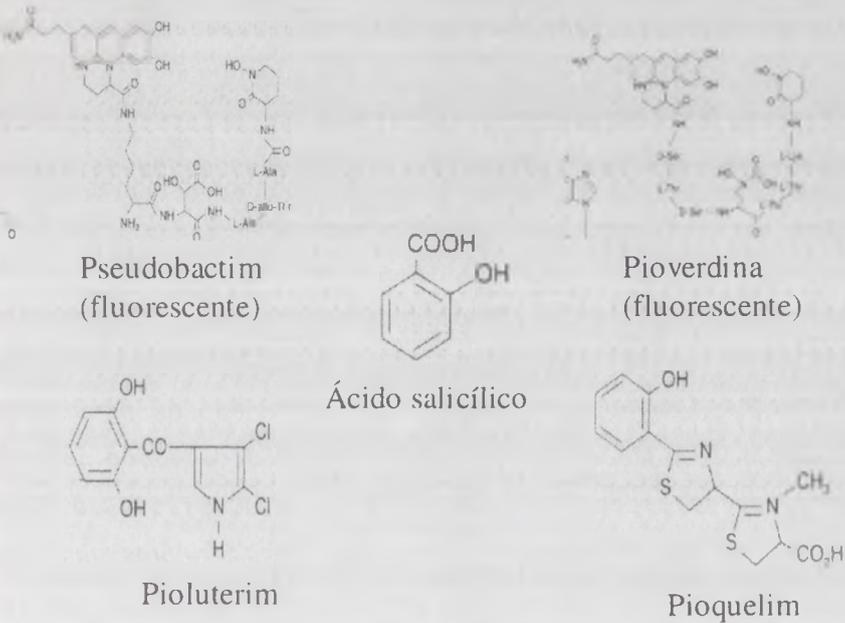


FIGURA 2. Estruturas de alguns sideróforos bacterianos implicados no controle biológico de doenças de plantas

Desde o primeiro relato de controle biológico de fitopatógenos, muitas bactérias têm sido empregadas, apesar das mais utilizadas serem linhagens pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Estas são capazes de produzir uma grande variedade de metabólitos (Figuras 1 e 2), incluindo sideróforos fluorescentes e não-fluorescentes, tais como ácido salicílico, pioverdinas, pseudobactim, ferribactim, fotossideróforos, ferricromo, ferroamina B e pioquelim. Todavia, sabe-se que são os sideróforos fluorescentes que possuem a mais alta afinidade por Fe e, portanto, geralmente encontram-se implicados no biocontrole de fitopatógenos (Dowling & O'Gara, 1994).

Kloepper e seus colaboradores (1980ab), foram os primeiros a demonstrar a (ab) importância da competição por ferro, mediada pela produção de sideróforos, como mecanismo de controle biológico. Os pesquisadores observaram, inicialmente em condições de laboratório, que alguns isolados bacterianos possuíam uma atividade bacteriostática, a *Ewinia carotovora*, agente causal de podridão mole em tubérculos de batata, devido à produção de sideróforos

em meio de cultura com baixa concentração do elemento. Quando o meio era suplementado com 1mM de  $\text{FeCl}_3$ , o antagonismo não era observado. Posteriormente, o mesmo foi observado em condições de casa-de-vegetação em solo suplementado com Fe II (Fe EDTA) e com o sideróforo purificado denominado pseudobactim. Observou-se que tanto o isolado B-10, como uma suspensão de células, quanto 10mM de pseudobactim causaram aumentos significativos no crescimento de plantas, quando comparados ao controle tratado somente com água. Constataram também que a população de fungos no rizoplane era reduzida em 59% e 74% em plantas tratadas com o isolado ou pseudobactim, respectivamente. Os autores denominaram essas bactérias como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) e concluíram que o aumento no crescimento das plantas era devido à produção de sideróforos, responsáveis pelo seqüestro do Fe III, tornando o elemento indisponível aos demais microrganismos rizosféricos, provavelmente deletérios às plantas (Figura 3).

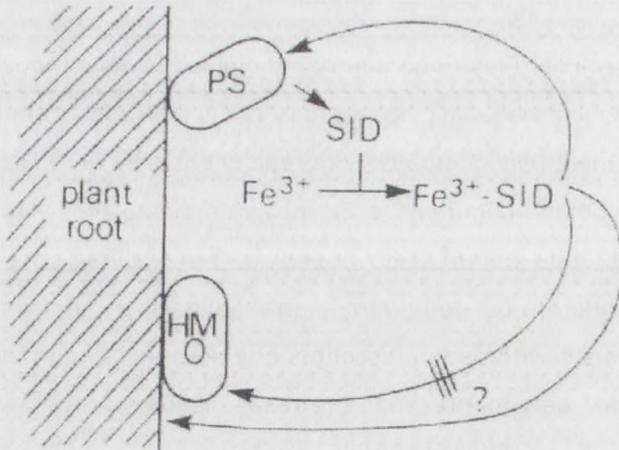


FIGURA 3. Diagrama hipotético do mecanismo de promoção do crescimento de plantas por rizobactérias (RPCP) pela produção de sideróforos (SID), competição por  $\text{Fe}^{3+}$  com microrganismos deletérios (MD)

Além dos trabalhos de Kloepper e seus colaboradores, vários outros trabalhos, nesse mesmo período, relataram o envolvimento de sideróforos no controle de diversos patógenos, como *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces*

*graminis* var. *tritici*, *Pythium ultimum*, *Thielaviopsis basicola* e microrganismos deletérios da rizosfera (Scher & Baker, 1982; Weller & Cook, 1983; Ahl et al., 1986; Yuen & Schroth, 1986; Xu & Gross, 1986; Schipper et al., 1987).

Posteriormente, pela utilização de mutantes de linhagens de *Pseudomonas* spp., deficientes para a produção de sideróforos, alguns pesquisadores demonstraram que a produção de pioverdina foi responsável pelo controle de *Pythium ultimum*, causador de *damping-off* em algodão e trigo (Becker & Cook, 1988), e que a produção de pioquelim encontrava-se envolvida no controle de *Pythium* sp., causador de *damping-off* em tomateiros (Buysens et al., 1996). Todavia, foi observado ainda que, em alguns casos, a produção de sideróforos não foi o mecanismo responsável no controle de *damping off* causado por *Pythium* sp. em plantas de pepino (Kraus & Loper, 1992; Paulitz & Loper, 1991).

A produção de sideróforos por *Pseudomonas* spp. demonstrou, também, ser um importante mecanismo de ação no controle da murcha vascular em plantas de cravo (*Dianthus caryophyllus*), causada por *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* (Van Peer et al., 1990; Duijff et al., 1993 e 1994).

Alguns pesquisadores constataram que algumas linhagens biocontroladoras, altamente ativas, apesar de sintetizarem somente um tipo de sideróforo, possuíam em suas membranas receptores para diferentes tipos (Marugg et al., 1989; Morris et al., 1992).

Dentre os fatores importantes que podem afetar o controle mediado pela produção de sideróforos, além do pH do solo e da disponibilidade de Fe no ambiente, podem ser mencionados a cultura em questão, a especificidade do patógeno a ser suprimido, a composição do solo, a linhagem bacteriana que sintetiza o sideróforo e sua afinidade pelo elemento (Dowling & O'Gara, 1994).

Duijff et al. (1994) verificaram que um isolado de *Pseudomonas* sp. proporcionou o controle de murcha de *Fusarium* em níveis moderados do patógeno, em ambiente com baixa quantidade de Fe. Entretanto, em locais onde as concentrações do patógeno encontravam-se altas, a produção de sideróforos de forma isolada não foi suficiente para reduzir os sintomas da doença de forma significativa.

## Mecanismos gerais de transporte de ferro por microrganismos

O transporte do complexo fluorescente Fe-sideróforo por microrganismos requer receptores específicos presentes na membrana externa de suas células. Algumas linhagens de bactérias, como por exemplo, as do gênero *Pseudomonas*, geralmente produzem somente um tipo de sideróforo, embora sejam capazes de utilizar uma grande variedade por possuírem diferentes receptores de membrana (Marugg, 1989; Morris et al., 1992).

Com a finalidade de se estudar os mecanismos de transporte de ferro em microrganismos, tem sido empregada como modelo a bactéria gram negativa *Escherichia coli*, que apresenta um sistema de baixa afinidade por ferro inorgânico e possui pelo menos três sistemas para o transporte de Fe (Figura 4), todos induzidos pelo estresse do elemento (Crowley et. al., 1991).

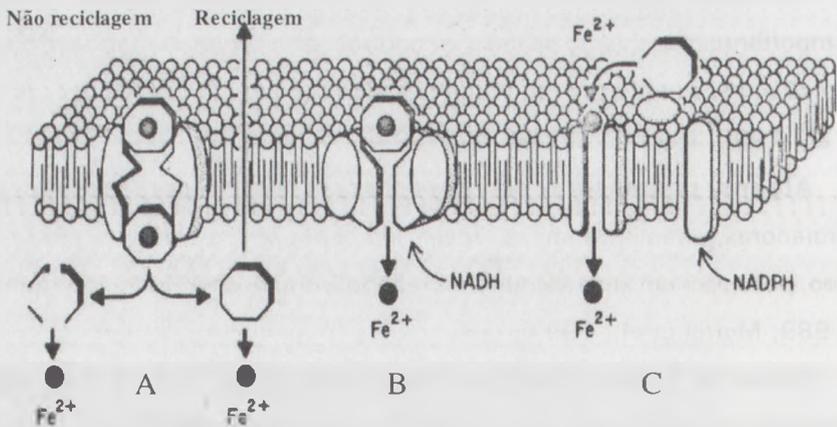


FIGURA 4. Mecanismo geral de transporte de ferro via sideróforo por microrganismos e, possivelmente, por plantas. A. Remoção do Fe do sideróforo transportador no citoplasma seguido de reciclagem do quelado sem ferro ou destruição do quelado; B. *Shuttle* direto com remoção do Fe na superfície da célula sem o transporte concomitante do sideróforo; C. *Shuttle* indireto com remoção do Fe em sítio distante do canal de íons para ferro inorgânico (Crowley et al., 1991).

*E. coli* é capaz de sintetizar dois tipos diferentes de sideróforos: o enterobactim, um catecolato, e o aerobactim, um sideróforo hidroxamato produzido por algumas linhagens. O transporte desses sideróforos envolve dois sistemas separados: um para o enterobactim e um segundo para o aerobactim. Além destes, a bactéria possui um outro mecanismo para o transporte de

sideróforos hidroxamatos produzidos por outras bactérias e outros fungos, incluindo o coprogem, o ácido rodotorúlico e certos ferricromos e ferrioxaminas (Payne, 1988).

Dois outros sistemas transportadores de Fe, não mediados por sideróforos, incluem um para o dicitrato férrico, induzido por baixas concentrações de ferro na presença de 0,1mM citrato (Frost & Rosenberg, 1973), e um segundo sistema induzível para o transporte de Fe (Hantke, 1987).

Estudos genéticos demonstraram que os sistemas de transporte de sideróforos em *E.coli* requerem muitos produtos gênicos, todos negativamente regulados pela proteína designada Fe-ligante, Fur, para regulação e absorção do elemento (Bagg & Neilands, 1987; Ernest et al., 1978).

Para a síntese de enterobactim, o sistema de transporte sozinho requer pelo menos dezesseis genes: sete para a produção de sideróforos, oito para o transporte de proteínas no envelope externo, no periplasma e na membrana citoplasmática e um para a proteína no citoplasma da célula que remove Fe a partir do sideróforo. O transporte de sideróforos hidroxamato-férrico por *E. coli* requer genes para duas proteínas citoplasmáticas de membrana, FhuB e FhuC, uma proteína FhuD e genes individuais para proteínas receptoras de cada tipo de sideróforo hidroxamato. Todos esses genes encontram-se no cromossomo bacteriano, com exceção daqueles para síntese e transporte de aerobactim, que encontram-se no plasmídeo pColV (Crosa, 1984; Crowley et al., 1991).

Três produtos de genes designados TonB, ExbB e ExbD são requeridos para os sistemas de transporte de ferrienterobactina, hidroxamato-férrico, dicitrato-férrico e vitamina B12. A proteína TonB parece estar envolvida na transferência de energia do citoplasma para a membrana externa e as ExbB e ExbD, localizadas na membrana citoplasmática, podem estar envolvidas na estabilização física da TonB (Postle & Skare, 1988; Fisher et al., 1989).

Estudos detalhados da membrana externa de *E.coli* revelaram uma série de proteínas receptoras na membrana que são altamente específicas para determinados tipos individuais de sideróforos e para dicitrato-férrico, incluindo FepA para transporte de ferrienterobactim para aerobactim-férrico, FhuA, FhuE e

FhuF para o sideróforo hidroxamato-férrico, ferricromo, coprogem e ferrioxamina, respectivamente, e FecA para ferridictrato. (Nelson et al., 1988).

Depois do transporte no periplasma, o transporte subsequente dos sideróforos-férricos ou dicitratos-férricos no protoplasma envolve correspondentes específicos das proteínas citoplasmáticas de membranas, incluindo FepB, FepC, FecD e FepG, para ferrienterobactim, FecB, FecC e FecD e FecE, para dicitrato-férrico, e três proteínas de membrana designadas FhuB, FhuC e FhuD, para sideróforos hidroxamato-férrico. As últimas cinco proteínas não reconhecem especificamente sideróforos do tipo hidroxamato, mas são requeridas coletivamente no transporte de todos hidroxamatos-férricos através da membrana citoplasmática (Burkhardt & Braun, 1987, citado por Crowley et al., 1991).

Em comparação com *E.coli*, o sistema receptor/transportador de sideróforos em outras bactérias e fungos não está bem caracterizado. Isso devido, primeiramente, à não disponibilidade da linhagem mutante que facilitaria a identificação dos genes que codificam as proteínas de transporte, embora muitas pesquisas enfatizem a especificidade de receptores de sideróforos (Ecker & Emery, 1983).

Em contraste a *E. coli*, a qual tem receptores que são altamente específicos, outros microrganismos podem empregar receptores com diferentes graus de especificidade para os vários tipos de sideróforos. Isso sugere que microrganismos possuem pelo menos duas estratégias diferentes para competir e utilizar os sideróforos produzidos por outras bactérias e/ou fungos.

Segundo Crowley et al. (1991), a primeira estratégia empregada por microrganismos seria a presença de receptores altamente específicos e a segunda se caracterizaria pela presença de um ou poucos receptores de ampla especificidade. Os autores sugeriram que a vantagem de receptores altamente específicos seria a de possuir um menor Km, que facilitaria a ligação de sideróforos específicos. Na segunda estratégia, a presença de receptores de ampla especificidade seria, comparativamente, menos vantajosa, pois possuiria uma menor afinidade de ligação com os tipos individuais de sideróforos.

Por outro lado, com mais de 100 diferentes sideróforos conhecidos, os

receptores de ampla especificidade podem permitir a utilização de um maior número e tipo de sideróforos. Um sistema amplamente específico pode evitar a complexidade genética e a despesa metabólica para um organismo produtor de diferentes receptores para os possíveis tipos de sideróforos existentes. Mais do que isso, a vantagem dessa estratégia dependeria da variabilidade do habitat natural do microrganismo. Se certos tipos de sideróforos predominam em um habitat natural, um determinado número de receptores pode ser suficiente para permitir a aquisição de forma competitiva de Fe a partir de misturas de quelados (Van der Helm et al., 1987, citado por Crowley et al., 1991).

Evidências sugerem que o mecanismo de reconhecimento de sideróforos por proteínas receptoras de alguns microrganismos é baseado nos grupos funcionais adjacentes. O centro metal do sideróforo ligado ao ferro consiste de três ligantes bidentados que têm uma coordenação octahedral em volta do átomo de FeIII (Crowley et al., 1991).

O centro metal pode ter duas formas enantioméricas, designadas L e D, as quais dividem e torcem a estrutura das coordenadas ligantes (Crowley et al., 1991).

Com relação a sideróforos hidroxamato, os ligantes podem também ter configurações cis e trans. O uso de sideróforos enantioméricos para estudar receptores com alta afinidade e receptores estereoespecíficos em fungos tem demonstrado a presença de ferricromos em *Penicillium parvum* (Winkelmann & Braun, 1981), coprogem e ferricromo em *Neurospora crassa* (Matzanke et al., 1984) e ácido rodotorúlico em *Rhodotorula pilmanae* (Muller et al., 1985).

Em contraste a esses fungos, actinomicetos como *Streptomyces pilosus* utilizam um receptor com ampla capacidade de reconhecimento. Esses organismos produzem e transportam um total de 10 tipos diferentes de ferrioxaminas e possuem estruturas lineares e cíclicas que podem ter coordenação L e D (Muller et al., 1984).

Experimentos de transporte para examinar duas estruturas lineares e duas ferrioxaminas cíclicas demonstraram que todas foram transportadas pelo mesmo sistema e que não houve discriminação da ferrioxamina B (FOB). Contudo,

as características da carga influenciaram ambas ligações e a subsequente taxa de transporte; a FOB catiônica é utilizada quase duas vezes em relação à taxa de ferroxiamina D1 neutra, a qual difere a partir da FOB somente na acetilação do lado do grupo amino carregado (Muller & Raimond, 1984).

Três diferentes mecanismos podem ser utilizados no microrganismo para mediar o transporte de Fe, via sideróforo, através da membrana (Figura 4). De acordo com o modelo mais geral, presume-se que as proteínas transportadoras da membrana estão envolvidas, se ligam ao substrato e proporcionam uma mudança conformacional resultando no transporte para dentro da célula, contudo cada um desses mecanismos difere em relação à localização do Fe liberado. Por exemplo, um dos mecanismos (Figura 4A) envolve um transportador ou uma permease para o complexo intacto sideróforo-férrico; depois do transporte, o ferro pode ser clivado a partir do sideróforo pela redutase citoplasmática, que reduz o quelado Fe III e causa dissociação subsequente do FeII a partir do complexo férrico instável (Payne, 1988).

O segundo mecanismo (Figura 4B), chamado de *shuttle* direto ou de *taxi*, envolve a ligação do sideróforo-férrico no receptor da superfície da célula na qual o ferro é clivado e simultaneamente transportado sem que ocorra o transporte concomitante do desferrissideróforo. Isso pode envolver o processo redutivo que transfere o Fe III para o carreador (Carrano & Raymond, 1978).

No terceiro mecanismo (Figura 4C), o Fe é adquirido por um *shuttle* indireto (dissociação extracelular), no qual sua remoção redutiva ocorre em um sítio a alguma distância da proteína carreadora. Acredita-se que isso aconteça pelo mesmo mecanismo, já que a liberação de FeII não está diretamente ligada ao transporte de ferro. Depois da redução, o FeII dissociado pode reoxidar e precipitar na superfície da célula, ou pode difundir-se pelos canais de íons/proteínas carreadoras para ferro inorgânico (Muller & Reymond, 1984).

Um sistema multicomponente foi também proposto para o fungo *Neurospora crassa*, que parece possuir dois receptores separados e um transportador comum para o ferricromo férrico e o coprogem-férrico (Huschka et al., 1985).

O *shuttle* direto com alta especificidade pode funcionar como um primeiro mecanismo de transporte para o uso de um sideróforo produzido e transportado pelo microrganismo, como o ferricromo A e o fungo *Ustilago spherogena* (Ecker & Emery, 1983) e o ácido rodotorulico e *R. pilmanae* (Carrano & Raymond, 1978).

## Nutrição de plantas

O elemento ferro é um nutriente essencial para todo tipo de organismo vivo, porque participa como componente de muitas enzimas vitais, incluindo os citocromos da cadeia de transporte de elétrons e é necessário em um grande número de funções biológicas (Schmidt, 1999).

Nas plantas, o Fe encontra-se envolvido na síntese da clorofila e é essencial para a manutenção da estrutura e função dos cloroplastos (Abadia, 1992). Embora sendo o quarto elemento mais abundante na litosfera, encontrando-se geralmente presente em altas quantidades no solo, sua disponibilidade nos ambientes aeróbios e com pH neutro é limitada (Chen et al., 1998).

Em solos aeróbios, o Fe encontra-se predominantemente na forma de FeIII, principalmente como um constituinte dos polímeros oxi-hidróxido com solubilidade extremamente baixa, portanto, na maioria dos casos, insuficiente para suprir a necessidade das plantas (Lindsay, 1991).

O mais solúvel dos óxidos de Fe em ambientes aeróbios com pH neutro, o hidróxido férrico, fica limitado a concentrações entre  $10^{-10}$  e  $10^{-18}$ M do íon livre, sendo que o nível crítico de Fe solúvel para o adequado crescimento da maioria das plantas é de  $10^{-8}$ M ou acima (Raymond & Carrano, 1979; Lindsay, 1984; Guerinot & Yi, 1993). Desta forma, em solos calcáreos, a absorção e a utilização de Fe pelas plantas são geralmente limitadas (Lindsay & Schwab, 1982). Como uma conseqüência, muitas culturas, como por exemplo, soja e aveia, são afetadas pela deficiência de Fe (Chen et al., 1998).

Os sintomas visuais da nutrição inadequada de Fe em plantas superiores são as cloroses intervenais de folhas jovens e o reduzido crescimento da raiz. Em solos alagados, a concentração de Fe solúvel pode aumentar em muitas ordens

de magnitude, devido ao baixo potencial redox (Ponnamperuma, 1972). Sob tais condições, o ferro pode ser absorvido em quantidades excessivas e é potencialmente tóxico, promovendo a formação de radicais reativos de oxigênio, capazes de danificar os constituintes celulares vitais, principalmente membranas, pela peroxidação lipídica. O bronzeamento (necrose coalescente de tecidos), a flacidez e/ou o escurecimento das raízes são os sintomas das plantas expostas em níveis acima do ótimo do elemento (Laan et al., 1991).

Para manter o nível adequado de Fe em diferentes faixas de concentrações externas do íon, plantas devem adaptar seus mecanismos às condições reinantes. Não existe nenhuma evidência de uma possível rota de secreção do Fe, sendo o principal mecanismo para se chegar à homeostase a regulação para a absorção do elemento. Como um meio de restringir a absorção excessiva, espécies têm desenvolvido mecanismos para oxidar Fe ferrosos na rizosfera, tais como formação de aerênquima e liberação de oxigênio (Schmidt, 1999).

Em solos aeróbios, organismos têm utilizado duas formas para aumentar a disponibilidade de compostos de Fe solúveis: a excreção de fitossideróforos com alta afinidade pelo elemento, com a posterior absorção desses pela célula via receptores específicos, e o desligamento redutivo de Fe e transporte subsequente de íons ferrosos através da membrana plasmática (Römheld & Marschner, 1986).

A primeira estratégia encontrada em dicotiledôneas e monocotiledôneas não-gramineáceas é caracterizada pela indução de redutases ligadas à membrana plasmática que reduzem quelados férricos extracelulares de forma concomitante com a liberação de prótons via ATPase na célula rizodermal de transferência. A especificidade do substrato no sistema redutase é baixa, embora nem todos os quelados férricos sejam reduzidos. A absorção de ferro é aumentada pela secreção de agentes quelantes, extrusão de prótons, redução férrica e aumento da atividade de um transportador ferroso na membrana plasmática da raiz. A extrusão de prótons aumenta a solubilidade de íons férricos inorgânicos, facilita a redução de quelados férricos protonados e a subsequente liberação de íons ferrosos (Römheld,

1987; Bienfait, 1989).

Ocorrem mudanças morfológicas e citológicas, como por exemplo, a formação de raízes em cabeleira e de células de transferência na epiderme das raízes. Essas respostas são induzidas de forma concomitante ou antes da expressão das respostas fisiológicas; isso tem levado a se assumir que as alterações estruturais e ultra-estruturais são pré-requisitos para o funcionamento do aparato de eficiência de Fe (Landsberg, 1986; Marschner et al., 1989).

A assimilação baseada na redução de Fe não é restrita às plantas superiores. A expressão de proteínas específicas com o objetivo de aliviar o estresse da deficiência de Fe - redutases orientadas vectorialmente - foram descritas em diversos organismos, incluindo bactérias, leveduras, algas e animais (Guerinot, 1994; de Silva et al., 1996; Lynnes et al., 1998).

A segunda estratégia em plantas, encontrada somente em monocotiledôneas gramineáceas, envolve a secreção de fitossideróforos, tais como os ácidos mugineico da cevada, avênico da aveia e 2'-deoximugineico do trigo e a sua posterior absorção. Plantas que respondem ao estresse de Fe por esse mecanismo são classificadas como plantas Fe-eficientes. Aquelas que não respondem ao estresse do elemento são denominadas Fe-ineficientes (Brown & Jolley, 1989).

Em plantas, a necessidade de controlar a absorção de Fe em limites estreitos torna-se aparente quando o controle homeostático é perturbado pelas desordens genéticas do metabolismo de Fe. O acúmulo excessivo de Fe, causando sintomas de toxicidade, foi relatado em plantas mutantes que eram incapazes de regular as reações adaptativas sob um suprimento adequado de Fe (Welch & Larue, 1990). Contudo, a deficiência severa de Fe em níveis normais do elemento foi observada em mutantes defectivos para a indução dessas respostas (Brown et al., 1971).

A compreensão dos mecanismos que controlam a expressão das respostas à deficiência de Fe em plantas pode ajudar nos esforços empregados para aumentar a adaptação de plantas economicamente importantes a um dado ambiente e às condições químicas do solo.

## Absorção de ferro pelas plantas a partir de sideróforos

A maioria dos solos contém abundante suprimento de ferro na forma de óxidos e outros tipos de minerais. A dissolução desses minerais libera formas solúveis de Fe que podem ser usadas por plantas e microrganismos (Emery, 1982; Darrah, 1993; Guerrinot, 1994).

Sob condições de aerobiose, com pH neutro a alcalino, o Fe está presente primariamente na forma de Fe III mineral,  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , encontrando-se insolúvel (Lindsay & Schwab, 1982). Nessas condições, organismos que dependem do solo como única fonte do nutriente são suscetíveis à deficiência de Fe. Para contornar os problemas de deficiência de ferro, plantas e microrganismos possuem vários mecanismos para a captação do elemento (Crowley et al., 1991; Schmidt, 1999).

Em comparação com outros quelatos naturais, os sideróforos microbianos são estáveis sob uma ampla faixa de pHs, encontrados em uma grande variedade de solos e caracterizados por uma grande afinidade por Fe III (Cline et al., 1983; Dowling & O'Gara, 1994).

Ao contrário dos fitopatógenos, como mencionado, as plantas não são geralmente prejudicadas pela depleção localizada de Fe, causada por microrganismos produtores de sideróforos, pois a maioria pode crescer em concentrações muito menores do que as concentrações requeridas pelos microrganismos e, além disso, possui mecanismos que permitem a utilização desses sideróforos (O'Sullivan & O'Gara, 1992).

Trabalhos relatam que a presença de bactérias capazes de produzir sideróforos pode estimular o crescimento de plantas, devido ao aumento no suprimento de Fe para elas (Becker et al., 1985; Weller, 1988; Crowley et al., 1988). Plantas como o pepino, a aveia, o girassol e o sorgo são capazes de utilizar Fe a partir de agentes quelantes produzidos por microrganismos (Powell et al., 1982; Cline et al., 1984; Crowley et al., 1988; Wang et al., 1993).

Existem diferenças quanto à habilidade das plantas em adquirir Fe a partir de sideróforos que dependem das espécies das plantas em questão e das concentrações relativas entre Fe e sideróforos em solução (Cline et al., 1983).

Estudos têm demonstrado a capacidade de absorção por plantas de diferentes sideróforos, tais como os hidroxamatos, o ácido rodotorúlico, o catecol e o pseudobactim (Cline et al., 1984; Becker et al., 1985; Miller et al., 1985; Jurkevitch et al., 1986; Bar Ness et al., 1991; Wang et al., 1993).

O sideróforo pseudobactim, produzido por *Pseudomonas putida*, foi utilizado por monocotiledôneas e dicotiledôneas; o ácido rodotorúlico, produzido por *Rhodotorula pilimanaea*, utilizado por plantas de tomate e o rizoferrim, produzido por *Rhizopus arrhizus*, utilizado por plantas de tomate, cevada e milho, todos proporcionando níveis suficientes de Fe para as diferentes culturas (Miller et al., 1985; Jukevitch et al., 1988; Miller et al., 1985; Bar-Ness et al., 1991; Duijff et al. 1994; Shenker et al., 1995; Yehuda et al., 1996).

Estudos demonstraram que o sideróforo desferrioxamina B pode fornecer Fe para plantas como o pepino, o girassol, o sorgo e a aveia (Cline et al., 1984; Crowley et al., 1988; Wang et al., 1993). Foi demonstrado, também, que em determinadas plantas Fe-ineficientes, como sorgo, a aquisição de ferro a partir do sideróforo somente ocorre quando o elemento é suprido em grandes concentrações do agente quelante. Por outro lado, foi observado que para espécies Fe-eficientes, como girassol, o Fe pode ser obtido mesmo quando a desferrioferrioxamina B encontra-se em presença de excesso de Fe.

Tais diferenças de respostas de plantas ao mesmo sideróforo podem indicar que a liberação de redutores, bem como os sistemas de ligação da membrana para remoção redutiva de ferro, são importantes na aquisição do elemento pelas plantas a partir de quelados.

Por outro lado, é possível que microrganismos possam competir por Fe com plantas em condições limitadas do elemento. Becker et al. (1985) observaram que pseudobactim produzido por uma linhagem de *Pseudomonas* sp. diminuiu a absorção de Fe por plantas de milho e ervilha em condições gnotobióticas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIA, J. Leaf responses to Fe deficiency: a review. *Journal of Plant Nutrition*, v. 15, p.699-1713, 1992.
- AHL, P.L.; VOISARD, C.; DÉFAGO, G. Iron-bound siderophores, cyanic acid and antibiotics involved in suppression of *Thielaviopsis basicola* by *Pseudomonas fluorescens* strain. *Journal of Phytopathology*, v. 116, p.21-134, 1986.
- BAGG, A.; NEILANDS, J.B. Mapping of a mutation affecting regulation of iron uptake systems in *Escheria coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, v.161, p.50-53, 1987
- BAR-NESS E.; CHEN, Y.; HADAR, Y.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Siderophores of *Pseudomonas putida* as na iron source for dicot and monocot plantas. *Plant and Soil*, v.130, p.231-241, 1991.
- BECKER, J.O.; HEDGES, R.W.L.; MESSENS, E. Inhibitory effect of pseudobactin on the uptake of Fe by higher plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v.49, p.90-93, 1985.
- BIENFAIT, H.F. Prevention of stress in iron metabolism of plants. *Acta Botanica Neerlandica*, v.38, p.105-129, 1989
- BROWN, J.C.; JOLLEY, V.D. Plant metabolic responses to iron-deficiency stress. A variety of mechanisms, grouped into two major strategies, make iron available from the soil. *BioScience*, v.39, p.546-551, 1989.
- BROWN, J.C.; CHANEY, R.L.; AMBLER, J.E. A new tomato mutant inefficient in the transport of iron. *Plant Physiology*, v.25, p.48-53, 1971
- BUYSENS, S.; HEUNGENS, K.; POPPE, J.; HÖFTE, M. Involment of pyochelin and pyoverdin in suppression of *Pythium* induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* &MSK2. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.865-71, 1996.
- BUYER, J.S.; LEONG, J. Iron transport-mediated antagonism between plant growth-promoting and plant-deleterious *Pseudomonas* strains. *Journal of Biological Chemistry*, v.261, p.791-794, 1986.
- BUYER, J.S.; SIKORA, L.J.; CHANEY, R.L. A new growth medium for the study of siderophore-mediated interactions. *Biology and Fertility of Soils*, v. 8, p.97-101, 1989.
- CARRANO, C.J.; RAYMOND, K.N. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds:rhodotorulic acid and iron uptake in *Rhodotorula pilmanae*. *Journal of Bacteriology*, v.136, p.69-74, 1978.
- CHEN, L.; DICK, W.A.; STREETER, J.G.; HOITINK, H.AT. Fe chelates from compost microorganisms improve Fe nutrition of soybean and oat. *Plant and Soil*, v. 200, p.139-147, 1998.
- CLINE, G.R.; POWELL, P.E.; SZANISZLO, P.J.; REID, C.P.P. Comparison of the abilities of hydroxamic and other natural organic acids to chelate iron and other ions in soil. *Soil Science*, v.136, p.145-157, 1983.
- CLINE, G.R.; REID, C.P.P.; POWELL, P.E.; SZANISZLO, P.J. Effects of a hydroxamato siderophore on iron absorption by sunflower and sorghum. *Plant Physiology*, v.76, p.36-39, 1984.
- CROSA, J.H. The relationship of plasmid mediated iron transport and bacterial virulence. *Ann. Ver. Microb.*, v.38, p.69-89, 1984.
- CROWLEY, D.E.; REID, C.P.P.L.; SZANISLO, P.J. Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. *Plant Physiology*, v. 87, p.680-685, 1988.
- CROWLEY, D.E.; WANG, Y.C.; REID, C.P.P.; SZANISZLO, P.J. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant and Soil*, v.130, p.179-198, 1991.
- DARRAH, P.R. The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil*, v.155/156, p.1-20, 1993.
- DE SILVA, D.M.; ASKWITH, C.C.; KAPLAN, J. Molecular machanisms of iron uptake in eukaryotes. *Physiological Reviews*, v.76, p.31-47, 1996.
- DOWLING, D.N.; O'GARA, F. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Tibtech*, v.12, p.133-141, 1994.
- DUIJFF, B.J.; KOGEL, W.J.; BAKKER, P.A.H.M.; SCHIPPERS, B. Influence of pseudobactin 358 on the iron nutrition of barley. *Soil Biology and Biochemistry*, v.26, p.1681-1688, 1994.

- DUIJFF, B.J.; MEIJER, J.W.; BAKKER, P.A.H.M.; SCHIPPERS, B. Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.99, p.266-279, 1993.
- ECKER, D.J.; EMERY, T. Iron uptake from ferrichrome A and iron citrate in *Ustilago sphaerogena*. **Journal of Bacteriology**, v.155, p.616-622, 1983.
- ELAD, Y.; BAKER, R. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydo-spore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, v. 75, p.1053-1059, 1985.
- EMERY, T. Iron metabolism in humans and plants. **American Scientist**, v. 70, p.626-632, 1982.
- ERNST, J.F.; BENNET, R.L.; ROTHFIELD, J. Constitutive expression of the iron enterochelin and ferrichrome uptake systems in a mutant strain of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 135, p.928-934, 1978.
- FISCHER E.; GUNTER, K.; BRAUN, V. Involved of ExbB and TonB by ExbB. **Journal of Bacteriology**, v.171, p.5127-34, 1989.
- FROST, G.E.; ROSENBERG, H. The inducible citrate dependent iron transport system in *Escherichia coli* K-12. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.330, p.90-101, 1973
- GLICK, B.R. The enhanced of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.109-117, 1995.
- GUERINOT, M.L.; YI, Y. Iron:nutritious, noxious, and not readily available. **Plant Physiology**, v.104, p.815-820, 1993.
- GUERINOT, M.L. Microbial iron transport. **Annual Review Guerinot**, 1994.
- HUSCHKA, H.; NAEGELI, H.U.; LEUENBERGER-RYL, H.; KELLER-SCHIERLEIN, W.; WINKELMANN, G. Evidence for a common siderophore transport system but different siderophore receptors in *Neurospora crassa*. **Journal of Bacteriology**, v.162, p.715-721, 1985.
- JURKEVITCH, E.; HADAR, Y.; CHEN, Y. Involvement of bacterial siderophores in the remedy of lime-induced chlorosis, **Soil Science Society of America Journal**, v.52, p. 1032-1037, 1988.
- KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, v.286, p.885-886, 1980a.
- KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M.N. Pseudomonads siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. **Current Microbiology**, v.4, p.317-320, 1980b.
- KRAUS, J.; LOPER, J.E. Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. **Phytopathology**, v.82, p.264-271, 1992.
- LANN, P.; SMOLDERS, A.; BLOM, C.W.P.M. The relative importance of anaerobiosis and high iron levels in the flood tolerance of *Rumex* species. **Plant and Soil**, v.136, p.153-161, 1991.
- LANDSBERG, E.C. Function of rhizodermal transfer cells in the Fe stress response mechanism of *Capsicum annum* L. **Plant Physiology**, v.2, p.511-517, 1986.
- LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.187-209, 1986.
- LINDSAY, W.L.; SCHWAB, A.P. The chemistry of iron and its availability to plants. **Journal of Plant Nutrition**, v.5, p.821-40, 1982.
- LINDSAY, W.L. Soil and plant relationships associated with iron deficiency with emphasis on nutrient interactions. **Journal of Plant Nutrition**, v.7, p.489-500, 1984.
- LINDSAY, W.L. Iron oxide solubilization by organic matter and its effect on iron availability. **Plant and Soil**, v.130, p.2734, 1991.
- LYNNES, J.A.; DERZAPH, T.L.M.; WEGER, H.G. Iron limitation results in induction of ferricyanide reductase and ferric chelate reductase activities in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Planta**, v.204, p.360-365, 1998.

- MAGAZIN, M.; MOORES, J.C.; LEONG, J. Cloning of the gene coding for the outer membrane receptor protein for ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth-promoting *Pseudomonas* strain. *Journal of Biological Chemistry*, v.261, p.795-799, 1986.
- MARSCHNER, H.; TREEBY, M.; RÖMHELD, V. Role of root-induced changes in the rhizosphere for iron acquisition in higher plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, v.152, p.197-204, 1989.
- MARUGG, J.D.; de WEGER, L.A.; NIELANDER, H.B.; OORTHUIZEN, N.; RE COURT, K.; WEISBEEK, P.J. Cloning and characterization of a gene encoding an outer membrane protein required for siderophore-mediated Fe<sup>3+</sup> assimilation in *Pseudomonas putida* WCS358. *Journal of Bacteriology*, v.170, p.1812-1819, 1989.
- MATZANKE, B.F.; MULLER, G.I.; RAYMOND, K.N. Hydroxamate siderophore mediated iron uptake in *E. coli*: Stereospecific recognition of ferric rhodotorulic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.121, p.922-930, 1984.
- MORRIS, J.; O'SULLIVAN, D.J.; KOSTER, M.; LEONG, J.; WEISBEEK, P.; O'GARA, F. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, p.630-635, 1992.
- MILLER, G.W.; PUSHNIK J.C.; BROWN, J.C.; EMERY, T.E.; JOLLEY, V.D.; WARNICK, K.Y. Uptake and translocation of iron from ferrated rhodotorulic acid in tomato. *Journal of Plant Nutrition*, v.8, p.249-264, 1985.
- MULLER, G.; RAYMOND, K.N. Specificity and mechanism of ferrioxamine-mediated iron transport in *Streptomyces pilosus*. *Journal of Bacteriology*, v.160, p.304-312, 1984.
- MULLER, G.; ISOWA, Y.; RAYMOND, K.N. Stereospecificity of siderophore-mediated iron uptake in *Rhodotorula pilmanae* as probed by enantiomerhodotorulic acid and isomers of chromic rhodotorulate. *Journal of Biological Chemistry*, v.260, p.13921-13926, 1985.
- MULLER, G.; MATZANKE, B.F.; RAYMOND, K.N. Iron transport in *Streptomyces pilosus* mediated by ferrichrome siderophores rhodotorulic acid, and enantio-rhodotorulic acid. *Journal of Bacteriology*, v.160, p.313-318, 1984.
- NEILANDS, J.B. Iron absorption and transport in microorganisms. *Annual Review of Nutrition*, v.1, p.27-46, 1981.
- NELSON, M.N.; COOPER, C.R.; CROWLEY, D.E.; REID, C.P.P.; SZANIZLO, P.J. An *Escherichia coli* bioassay of individual siderophores in soil. *Journal of Plant Nutrition*, v.11, p.915-924, 1988.
- O'SULLIVAN, D.J.; O'GARA, F. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microb. Ver.*, v.56, p.662-676, 1992.
- PAULISTZ, T.C.; LOPER, J.E. Lack of role for fluorescent siderophore production in the biological control of *Pythium* damping-off of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathology*, v.81, p.930-935, 1991.
- PAYNE, S.M. Iron and virulence in the family Enterobacteriaceae. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, v.16, p.81-111, 1988.
- PONNAMPERUMA, F.N. The chemistry of submerged soils. *Advances in Agronomy*, v.24, p.29-96, 1972.
- POSTLE, K.; SKARE, J.T. *Escherichia coli* TonB protein is exported from the cytoplasm without proteolytic cleavage of its amino terminus. *Journal of Biological Chemistry*, v.263, p.11000-11007, 1988.
- POWELL, P.E.; SZANISZLO, P.J.; CLINE, G.R.; REID, C.P.P. Hydroxamate siderophores in the iron nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition*, v.5, p.653-673, 1982.
- RAYMOND, K.N.; CARRANO, C.J. Coordination chemistry and microbial iron transport. *Annals of Chemical Research*, v.12, p.183-190, 1979.
- RÖMHELD, V.; MARSCHNER, H. Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiology*, v.80, p.175-180, 1986.
- RÖMHELD, V. Different strategies for iron acquisition by higher plants. *Physiologia Plantarum*, v.70, p.231-34, 1987.
- SCHER, F.M.; BAKER, R. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogens. *Phytopathology*, v.72, p.1567-1573, 1982.
- SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.W.; BAKKER, P.A.H.M. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms

- and the effect of cropping practices. **Ann. Ver. Phytopathol.**, v.25, p.339-358, 1987.
- SCHMIDT, W. Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. **New Phytologist**, v.141, p.1-26, 1999.
- SCHROTH, M.N. ; HANCOCK, J.G. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. **Science**, v.216, p.1376-1381, 1982
- SHENKER, M.; GHIRLANDO, R.; OLIVER, I.; HELMANN, M.; HADAR, Y.; CHEN, Y. Chemical structure and biological activity of rhizoferrin – a siderophore produced by *Rhizopus arrhizus*. **Soil Science Society of America Journal**, v. 59, p.837-843, 1995.
- VAN PEER, R.; VAN KUIK, A.J.L.; RATTINK, H.; SCHIPPERS, B. Control of *Fusarium* wilt of carnation grown on rock wool by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r and by FeEDDHA. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.96, p.119-132, 1990.
- WANG, Y.; BROWN, H.N.; CROWLEY, D.E.; SZAMOSZLO, P.J. Evidence for direct utilization of siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. **Plant Cell and Environment**, v. 16, p.579-585, 1993.
- WELCH, R.M.; LARUE T.A. Physiological characteristics of Fe accumulation in the 'bronze' mutant of *Pisum sativum* L., cv. Sparkle E107 (brz brz). **Plant Physiology**, v.93, p.723-729, 1990.
- WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, p.379-407, 1988.
- 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.
- WINKLEMANN, G. ; BRAUN, V. Stereoselective recognition of ferrichrome by fungi and bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.11, p.237-241, 1981
- XU, G.W. ; GROSS, D.C. Selection of fluorescent pseudomonads antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive of potato seed piece decay. **Phytopathology**, v.76, p.414-422, 1986.
- YEHUDA, Z.; SHENKER, M.; RÖMHELD, V.L.; MARSCHNER, H.; HADAR, Y.; CHEN, Y. The role of ligand exchange in the uptake of iron from microbial siderophores by graminaceous plants. **Plant Physiology**, v.112, p.1273-1280, 1996.
- YUEN, G.Y. ; SCHROTH, M.N. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* by iron competition with na Alcaligenes sp. **Phytopathology**, v.75, p.171-176, 1986.



# 7

## PROTEÍNAS BIOINSETICIDAS PRODUZIDAS PELA BACTÉRIA *BACILLUS THURINGIENSIS*: MODO DE AÇÃO E RESISTÊNCIA

Rose Monnerat  
Alejandra Bravo

### INTRODUÇÃO

O controle de insetos-praga é um aspecto fundamental na produção agrícola, tanto para grandes como para pequenos produtores. O mercado mundial de agroquímicos está estimado em 20 bilhões de dólares, dos quais 25% correspondem ao controle de insetos. Nos dias de hoje apenas uma pequena proporção desse mercado (1,6%) está baseado na utilização de inseticidas biológicos, dos quais o *Bacillus thuringiensis* representa 90-95%. O uso de biopesticidas na América Latina é muito limitado, correspondendo a 8% do mercado mundial. Prevê-se que esta utilização vá aumentar à medida que legislações voltadas à proteção ambiental mais rigorosas forem adotadas e produtos mais eficientes e baratos forem lançados (Dias, 1992).

O *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é uma bactéria aeróbia, gram positiva, da família *Bacillaceae* que se caracteriza pela produção, no momento de sua esporulação, de inclusões protéicas cristalinas. Estas inclusões se distinguem como cristais de formas definidas por microscopia de contraste de fases (Figura 1).

Algumas das vantagens da utilização de *Bt* são: sua especificidade aos insetos sensíveis, seu efeito não poluente ao meio ambiente, sua inocuidade aos mamíferos e vertebrados e a ausência de toxicidade às plantas (Whiteley & Schnepf, 1986).

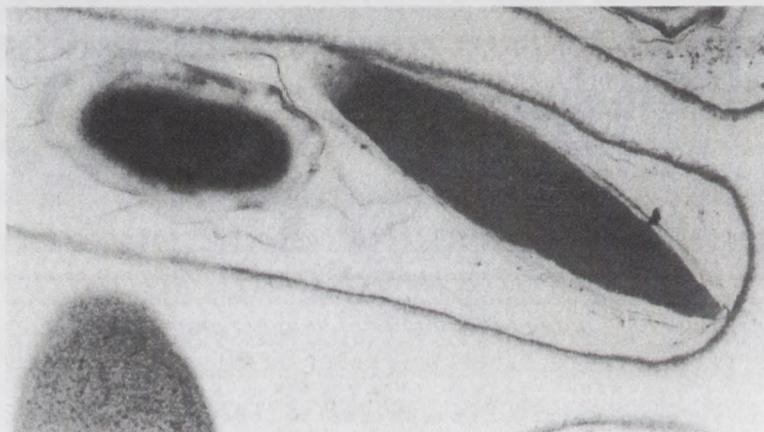


FIGURA 1. Aspecto do cristal protéico de *Bacillus thuringiensis*.

## Toxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis*

### $\alpha$ -exotoxina

A  $\alpha$ -exotoxina, conhecida também como fosfolipase C, lecitinase ou fosfatidilcolina fosfohidrolase, é uma enzima que possui atividade citolítica ao atuar sobre os fosfolípídeos que formam as membranas de diversos tipos celulares (Faust & Bulla Jr., 1982). Esta toxina é encontrada no sobrenadante de culturas e é altamente tóxica para certos insetos através de administração oral ou intra-hemocélica, causando degeneração e lise de hemócitos (Krieg, 1971; Silva-Werneck, 1997). O gene correspondente a esta exotoxina já foi clonado e seqüenciado (Lechner et al., 1989).

### $\beta$ -exotoxina

A  $\beta$ -exotoxina ou thuringiensina é uma toxina termoestável produzida por certas estirpes de *Bt* durante a fase vegetativa e secretada no meio de cultura. Ela é produzida, em grande quantidade, por estirpes do sorotipo H1 e, em menores

quantidades, por algumas estirpes dos sorotipos H4a4b, H4a4c, H5, H9, H10, H11, H12 (Sebesta et al., 1981). A toxina do tipo I é um análogo do ATP composta de adenina, ribose, glicose e ácido fosfoalárico, com massa molecular de 701 daltons (Farkas et al., 1969). Essa toxina atua inibindo a ação da RNA polimerase, através da competição pelo ATP e é altamente tóxica para várias ordens de insetos, ácaros, nematóides e também vertebrados, com efeitos teratogênicos e mutagênicos (Sebesta et al., 1981). Assim, a partir de 1970, os produtos comerciais de *Bt* à base de linhagens do sorotipo H1 foram substituídos por outros à base de linhagens não produtoras de  $\beta$ -exotoxina (Sebesta et al., 1981; Silva-Werneck, 1997).

A  $\beta$ -exotoxina do tipo II, produzida por estirpes pertencentes ao sorotipo H8a8b (*morrisoni*), é um análogo do UTP e apresenta toxicidade superior à toxina do tipo I, principalmente para coleópteros (Levinson et al., 1990). Estes autores demonstraram que os genes responsáveis pela síntese de  $\beta$ -exotoxina estão localizados em plasmídeos de 75 ou 110 MDa.

### Vip3A

Uma nova classe de proteínas inseticidas, Vip3A, com atividade contra larvas de lepidópteros foi descrita por Estruch et al. (1996). Essas proteínas são produzidas e secretadas por algumas estirpes durante as fases vegetativa e de esporulação, têm uma massa molecular predita de 88,5kDa, não têm homologia com proteínas conhecidas e apresentam atividade contra insetos pouco sensíveis à maioria das  $\delta$ -endotoxinas, como *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda* e *Spodoptera exigua*. A clonagem e caracterização de dois genes homólogos, *vip3A(a)* e *vip3A(b)*, de diferentes estirpes foram descritas (Estruch et al., 1996). Esta foi uma descoberta importante, pois, atualmente, não só se aproveitam a mistura de esporos e cristais obtidos após o cultivo de *Bt*, como também é possível utilizar o seu sobrenadante.

### $\delta$ -endotoxinas

Esse grupo de toxinas, também chamado de proteínas Cry, apresenta

peso molecular variando de 65 a 138kDa e é um dos formadores do cristal protéico. O processo de formação desse cristal está ligado à esporulação. Os estudos efetuados sobre as cristalogêneses mostraram que o cristal é formado a partir do segundo estágio da esporulação e é liberado quando as células são lisadas.

A classificação das proteínas Cry se baseia na similaridade das seqüências de aminoácidos (Crickmore et al., 1998). Existem mais de 120 diferentes genes *cry* e as proteínas Cry estão agrupadas em 22 classes (Figura 2).

A atualização constante desta nova classificação se encontra disponível no site: [www: http://epunix.biols.susx.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://epunix.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html).

O grupo de proteínas tipo Cry1 tem 26 holotipos representados como (Cry1Aa,...,Cry1Ka). A maior parte destas proteínas é tóxica para lepidópteros, ainda que algumas tenham atividade dupla (ex.: Cry1Ca é ativa contra lepidópteros e dípteros e Cry1Ba é ativa contra lepidópteros e coleópteros). Essas proteínas (protoxinas) são solubilizadas e convertidas por proteases a fragmentos tóxicos de 60 a 70kDa, no intestino médio das larvas dos insetos-alvo.

A classe Cry2 está formada por três membros: Cry2Aa, que tem atividade dupla (lepidópteros e dípteros) e Cry2Ab e Cry2Ac, que são ativas contra lepidópteros. Essas proteínas apresentam peso molecular de 65kDa, formam cristais cubóides e estão presentes em algumas estirpes de várias subespécies, incluindo *kurstaki* HD-1, *thuringiensis*, *tolworthi* e *kenyae* (Höfte & Whiteley, 1989; Lereclus et al., 1989). Esses cristais, anteriormente designados proteínas P2 (Yamamoto & McLaughlin, 1981), são facilmente distinguidos dos cristais bipiramidais. (Lereclus et al., 1989). Dois genes *cry2* relacionados, *cry2Aa* e *cry2Ab* da estirpe HD-1, clonados por Widner & Whiteley (1989) e expressos em *E. coli*, codificaram proteínas de 71kDa que, apesar do alto grau de homologia, mostraram atividade inseticida diferente. As proteínas Cry2 compartilham 80-90% de identidade.

São conhecidas quatro proteínas do tipo Cry3 que codificam

proteínas de 72-73kDa e formam cristais rombóides, todas elas tóxicas contra o coleóptero *Leptinotarsa decemlineata*. A proteína Cry3Bb mostra atividade contra *Diabrotica undecimpunctata* e a proteína Cry3A contra o afídeo da batata (*Macrosiphum euphorbiae*) (Walters & English, 1995). As primeiras estirpes descritas foram *Bt* subsp. *tenebrionis* (Krieg et al., 1983), *Bt* subsp. *san diego* (Herrnstadt et al., 1983) e EG2158 (Donovan et al., 1988), que possuem genes *cry3* semelhantes.

As proteínas Cry4Aa e Cry4Ba são ativas contra dípteros (culicídeos e simulídeos). Os genes *cry4A* e *cry4B* foram isolados de estirpes de *Bt* subsp. *israelensis* (Höfte & Whiteley, 1989) e codificaram proteínas de 135 e 128kDa, respectivamente, que se agregaram com o produto de 27kDa de *cyt1A*, e formando cristais complexos de forma ovóide (Höfte & Whiteley, 1989) ou composta (esférica ou retangular) (Lereclus et al., 1989). As proteínas Cry4A e Cry4B apresentam similaridade de 40% entre suas porções N-terminal e são proteoliticamente convertidas a fragmentos tóxicos entre 53 e 78kDa (Lereclus et al., 1993; Bravo & Quintero, 1993).

A classe Cry5 está formada por quatro integrantes: as proteínas Cry5Aa e Cry5Ab, eficazes contra nematóides e ácaros, e Cry5Ac e Cry5Ba, que mostram atividade contra formigas (himenópteros) e coleópteros, respectivamente. As proteínas Cry6Aa e Cry6Ba integram a classe 6 e são tóxicas contra nematóides e ácaros.

A classe Cry7 está representada por dois holotipos, Cry7Aa e Cry7Ab, que são ativos contra coleópteros. São três as proteínas do grupo 8: Cry8Aa, uma proteína com atividade dupla (coleópteros e afídeos), Cry8Ba e Cry8Ca, tóxicas para coleópteros e Cry9Ba, cujo alvo ainda não foi determinado, embora se saiba que ela é codificada por um gene críptico.

Apenas uma proteína da classe Cry10 (Cry10Aa) que tem atividade contra dípteros é conhecida. Esse gene foi isolado de estirpe de *Bt* subsp. *israelensis* (Höfte & Whiteley, 1989) e codificou uma proteína de 78kDa. Semelhante a Cry 10, os genes codificantes das proteínas Cry11Aa e Cry11Ba também foram isolados a partir de *Bt* subsp. *israelensis* (Höfte & Whiteley, 1989)

e codificaram proteínas de 72kDa que são ativas contra dípteros .

Cry12Aa é uma toxina com atividade dupla contra nematóides e ácaros, enquanto que Cry13 é tóxica apenas para nematóides. Cry14Aa é ativa contra dípteros e coleópteros e Cry15 é específica contra lepidópteros. As proteínas Cry19Aa e Cry20Aa mostraram toxicidade contra dípteros e Cry21Aa e Cry22Aa são eficazes, respectivamente, contra nematóides e himenópteros.

Existem proteínas Cry que são oriundas de bactérias diferentes de *Bt* (Barloy et al., 1996; Zhang et al., 1997), como Cry16, Cry17, Cry18. Os genes *cry16Aa* e *cry17Aa* foram isolados a partir da cepa CH18 da bactéria anaeróbia *Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia*. Seus produtos mostraram atividade tóxica contra três espécies de mosquitos: *Aedes aegypti*, *Culex pipiens* e *Anopheles stephensi* (Barloy et al., 1996). O gene *cry18Aa* que foi isolado do cromossomo do patógeno obrigatório *Bacillus popilliae*, codificou para uma proteína com atividade contra o coleóptero *Melolontha melolontha* (Zhang et al., 1997).

Embora o grau de identidade de alguns membros da família Cry seja muito baixo (Figura 2), o alinhamento da estrutura primária das toxinas Cry, revelou a existência de cinco blocos ou regiões de aminoácidos altamente conservados entre quase todas as toxinas Cry que estão separadas por regiões hipervariáveis de diferentes longitudes (Höfte & Whiteley, 1989; Crickmore et al., 1998). Esta análise tem permitido distinguir três subgrupos de proteínas Cry (Figura 3).

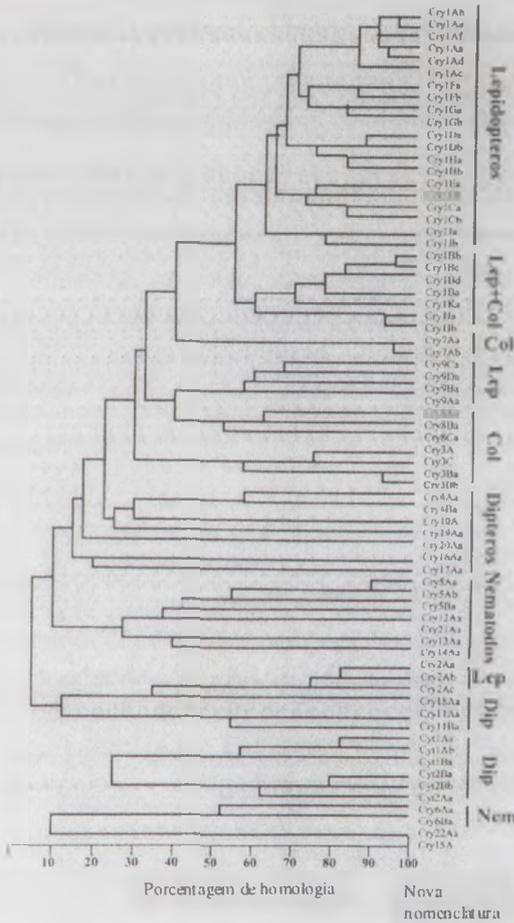


FIGURA 2. Dendrograma mostrando os membros da família Cry e sua porcentagem de homologia.

Um primeiro subgrupo está formado pelas classes Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9 e Cry10. Estas proteínas se caracterizam por terem cinco blocos. Um segundo grupo está formado pelas classes Cry5, Cry12, Cry13 e Cry14, proteínas que possuem regiões homólogas aos blocos 1, 2, 4 e 5 clássicos, mas carecem do bloco conservado 3. Um terceiro subgrupo é formado pelas classes Cry2 e Cry11, que possuem o bloco conservado 1 e apresentam uma variante do 2, mas não possuem os blocos 3, 4 e 5 típicos. A alta conservação desses cinco blocos, em particular do primeiro deles, sugere que eles sejam

importantes para a função biológica destas proteínas. Como se verá mais adiante, esses blocos conservados se localizam em regiões estruturais muito importantes da proteína, especificamente nas regiões internas da proteína e nas regiões de contato entre domínios. Esta localização permite dizer que as proteínas Cry formam uma família com pregueamentos similares e mecanismos de ação muito semelhantes.

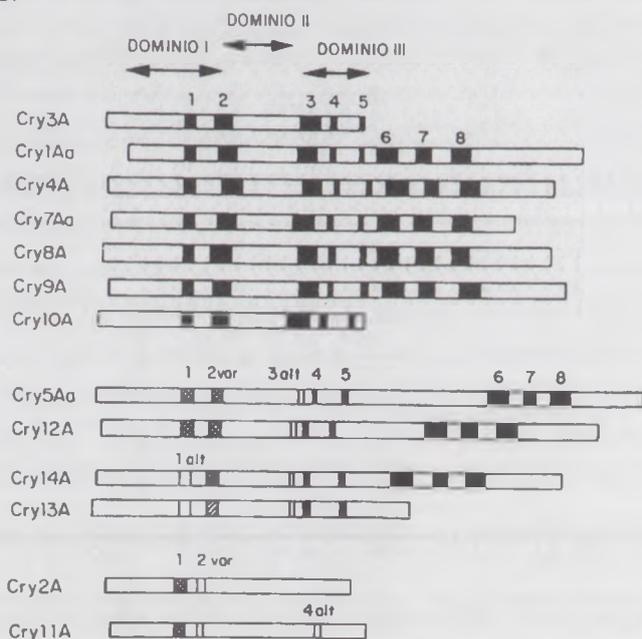


FIGURA 3. Posições dos blocos conservados entre as proteínas Cry.

A clonagem dos genes e o uso de sondas específicas demonstraram que várias subespécies de *Bt* continham um, dois ou mais genes intimamente relacionados (Sanchis et al., 1988; Höfte & Whiteley, 1989; Du & Nickerson, 1996). Dois ou três genes *cry1A* são encontrados em várias subespécies ou estirpes, como, por exemplo, *Bt* subsp. *kurstaki* HD-1, que contém *cry1Aa*, *cry1Ab* e *cry1Ac*, e *Bt* subsp. *Thuringiensis*, que contém apenas *cry1Ab* e *cry1Ac*. Höfte et al. (1986), em estudo para distinguir as proteínas Cry1A, Cry1B e Cry1C em preparações de cristais, demonstraram que Cry1A é a proteína-cristal mais comum, estando presente em 28 das 29 estirpes de 11 sorotiposteados.

Cry1B e Cry1C são muito menos comuns, estando Cry1B presente em 5 subespécies e Cry1C presente apenas em *Bt* subsp. *aizawai* e subsp. *entomocidus* (Silva-Werneck, 1997).

### Estrutura tridimensional das toxinas Cry

A estrutura tridimensional determinada por difração de raios X da porção tóxica das proteínas Cry3A (Li et al., 1991) e Cry1Aa (Grochulski et al., 1995) revelou que estas moléculas estão organizadas em três domínios (Figura 4). O domínio I (Cry3A, resíduos 58 a 290 e Cry1Aa, resíduos 33 a 253) está constituído por um ramo de seis  $\alpha$ -hélices anfipáticas que rodeiam outra mais hidrofóbica, a  $\alpha$ -hélice 5. O domínio II (Cry3A, resíduos 291 a 500 e Cry1Aa, resíduos 265 a 461) está formado por duas  $\alpha$ -hélices curtas e três laminas b-antiparalelas que terminam em asas ("loops 1, 2 e 3") no vértice da molécula, formando um prisma. O domínio III (Cry3A, resíduos 501 a 644 e Cry1Aa, resíduos 463 a 609) está composto por duas folhas b-pregueadas, arranjadas uma sobre a outra.

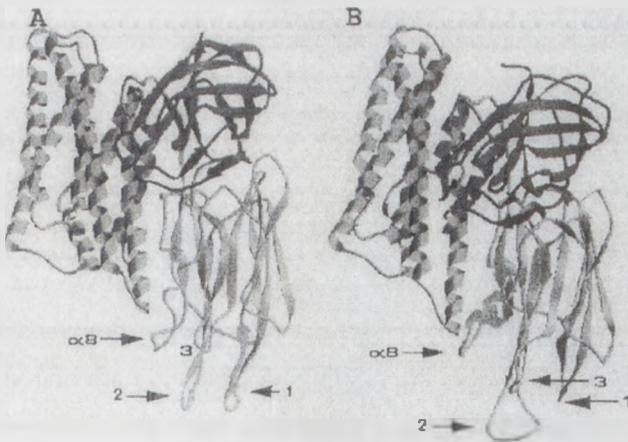


FIGURA 4. Estrutura tridimensional das toxinas Cry 3A (A) e Cry1Aa (B).

Os cinco blocos conservados na estrutura primária das toxinas Cry estão localizados nas regiões central e de comunicação entre domínios, como se descreverá a seguir. O bloco 1 está constituído pela  $\alpha$ -hélice central do domínio I (hélice  $\alpha$ -5). O contato entre os domínios I e II constitui o bloco conservado 2.

O bloco 3 engloba a última b do domínio II e a primeira do domínio III. Os blocos 4 e 5 correspondem a duas folhas centrais do domínio III (b17 e b23) (Li et al., 1991; Grochulski et al., 1995). A localização estratégica destas regiões sugere que pelo menos os membros da família Cry que as contêm podem ter um pregueamento similar e portanto um mecanismo de ação semelhante.

O domínio I participa na formação do poro. As hélices que o formam são anfipáticas e têm uma largura necessária para atravessar a membrana. Estudos de mutagênese dirigida na hélice central a-5 sugerem que esta tem um papel importante na formação do poro (Ahmad & Ellar, 1990; Wu & Aronson, 1992). Estas análises consistiram em substituir resíduos hidrofóbicos da  $\alpha$ -hélice 5 das toxinas Cry1Ab (Ahmad & Ellar, 1990) e Cry1Ac (Wu & Aronson, 1992) por resíduos carregados ou por prolina. Destas trocas resultaram proteínas que perderam sua atividade contra insetos (*Pieris brassicae* para Cry1Ab e *Manduca sexta*, *Heliothis virescens* e *Tricoplusia ni* para Cry1Ac), mas cuja capacidade de união ao receptor permaneceu inalterada. Além disso, outros autores isolaram o domínio I das toxinas Cry1Ac (Walters et al., 1993) e Cry3Bb (Von Tersch et al., 1994) e este fragmento da proteína foi capaz de formar poros por si mesmo em bicamadas lipídicas sintéticas.

O domínio II participa no reconhecimento do receptor e o domínio III é o responsável pela resistência a protease. Foi proposto que o domínio III também está relacionado com a especificidade, pois o intercâmbio do domínio III com diferentes toxinas causou mudança de especificidade. Estudos nos quais se expressou apenas o fragmento que compreende os domínios II e III da toxina Cry1Ab mostraram que ele não perdeu a capacidade para unir-se ao receptor em cortes de tecido de *M. sexta* e *T. ni* nem a duas proteínas (~ 120 e 210kDa) provenientes das micro vesículas da bordadura escovada do epitélio intestinal (BBMV) de *M. sexta* numa análise tipo *ligand blotting* (Flores et al., 1997). Esta evidência respalda a idéia de que a região domínio II-domínio III é a responsável pela determinação da união e especificidade das  $\delta$ -endotoxinas.

Os resultados de uma análise filogenética da estrutura primária das  $\delta$ -endotoxinas indicam que a diversidade destas proteínas surgiu basicamente de

dois processos, a evolução independente de cada domínio e o intercâmbio de domínios III com diferentes toxinas (Bravo, 1997), dando como resultado uma família multigênica de proteínas que têm atividade bioinseticida com especificidades diferentes, mas que conservam o mesmo mecanismo de ação.

### Mecanismo de ação das proteínas Cry

Os sintomas que são observados a partir do momento em que as larvas dos insetos suscetíveis ingerem os cristais e esporos são: parada alimentar, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e finalmente a morte (Gupta et al., 1985; Aronson et al., 1986). Estudos histopatológicos mostraram que as células colunares do intestino médio são afetadas inicialmente em sua microvilosidade apical, que é totalmente destruída (Ebersold et al., 1978; Percy & Fast, 1983). Embora os efeitos nas células caliciformes (Cioffi, 1984) sejam mais lentos, a citólise também é observada (Gupta et al., 1985; Bravo et al., 1992). O mecanismo de ação das proteínas Cry é um processo de vários passos, como pode ser observado na Tabela 1.

TABELA 1. Mecanismos de ação das proteínas Cry

Etapa	Características
1- Solubilização do cristal	O pH alcalino e as condições redutoras do intestino médio são indispensáveis para esse processo
2- Processamento das toxinas	Participação das proteases predominantes no intestino médio (tripsina, quimoitripsina, termosilina e cartepsinas)
3- União ao receptor	União reversível União irreversível · interação carboidrato-proteína · interação proteína-proteína · interação com outros componentes da membrana (glicolipídeos)
4- Inserção na membrana	Mudança conformacional drástica que conduz a um estado propício para a inserção
5- Agregação	O modelo propõe que o poro é formado por 4 - 6 moléculas
6- Formação do poro	Tamanho estimado do poro 1 - 2nm Condutância: 25 - 4000pS Múltiplos estados condutores Baixa seletividade aos cátions
7- Citólise	Efeito sinérgico dos cristais e esporos

### a) Solubilização

Os cristais produzidos por *Bt* se solubilizam em pH alcalino (Gringorten et al., 1992). É necessário ainda que haja um meio ambiente redutor, já que as pontes dissulfeto são abundantes na metade C-terminal das proteínas de 130kDa (Knowles, 1994). O intestino médio da maior parte das larvas de insetos suscetíveis (lepidópteros, dípteros e alguns coleópteros) se caracteriza por seu alto pH e condições redutoras (Knowles, 1994).

Nas proteínas tipo Cry1, todos os aminoácidos de caráter básico da parte ativa das proteínas Cry1 são argininas, com exceção de apenas dois resíduos (Grochulski et al., 1995). Foi proposto que esta é uma adaptação evolutiva das toxinas que atuam no intestino médio dos lepidópteros. O alto pKa da arginina (12,5) assegura que a maior parte das cadeias laterais estejam carregadas, mesmo nas condições mais alcalinas, o que não acontece no caso dos resíduos de lisina cujo pKa é 10,8 (Grochulski et al., 1995).

Na proteína Cry3A existem quatro pontes salinas interquaternárias que estabilizam o cristal (Li et al., 1991). Isto poderia explicar as propriedades de solubilidade desta toxina, que se dissolve tanto em pH ácido (3,9 a 4,2) como em pH alcalino (9,5 a 11,3) mas permanece insolúvel em pH neutro (Koller et al., 1992). Cry3A é ativo contra larvas de crisomelídeos cujo pH intestinal é ligeiramente ácido (Weltens et al., 1992). Nesse caso, supõe-se que devam existir outros fatores no conteúdo intestinal que promovam a solubilização desta toxina.

### b) Processamento

A maior parte das proteínas Cry são produzidas como protoxinas que, para serem ativadas, devem ser processadas pelas proteases do intestino médio dos insetos, liberando o fragmento tóxico. Pode se generalizar que o processamento típico das toxinas Cry1 (de 130 - 140kDa) se dá pelo corte dos primeiros vinte e oito resíduos da extremidade N-terminal em um sítio conservado R27/28 (Bietlot et al., 1989) e dos últimos quinhentos da extremidade C-terminal, restando, desta forma, um fragmento resistente a proteases de entre 55 e 65kDa.

A posição do sítio de processamento no extremo C-terminal não é constante e se localiza na região 609 a 630 (Höfte et al., 1986; Wabiko et al., 1986; Haider & Ellar, 1989; Martens et al., 1995; Strizhov et al., 1996). Os resíduos que formam a b-prega 23 (bloco conservado 5) do domínio III são importantes na manutenção e estabilidade da estrutura, dado que proteínas mutantes nesta região são suscetíveis à ação da tripsina (Martens et al., 1995; Wabiko & Yasuda, 1995; Nishimoto et al., 1994). Esses dados confirmaram a hipótese da importância do domínio III para manter uma estrutura globular estável e resistente à ação de proteases (Li et al., 1991).

O alinhamento das seqüências de aminoácidos dos membros da família Cry mostrou que as toxinas de 70kDa (Cry2, Cry3 e Cry 11) podem ser consideradas como formas naturais truncadas das proteínas de alto peso molecular (Höfte & Whiteley, 1989).

O processamento é um fator que pode contribuir na determinação da especificidade. Um exemplo ilustrativo é o caso da toxina Cry1Ab da linhagem IC1 de *Bt* var. *aizawai*, a qual é tóxica para lepidópteros (*Pieris brassicae*) quando se processa com tripsina, e ativa para os dípteros (*Aedes aegypti*) quando é tratada com suco gástrico desses mosquitos (Haider & Ellar, 1989).

Apesar de se conhecer com certo detalhe como ocorre o processamento das toxinas de *Bt*, não existem informações suficientes sobre as enzimas que estão envolvidas nesse processo. O seqüenciamento da extremidade N-terminal dos fragmentos tóxicos das toxinas Cry1, Cry2 e Cry4 sugere que as principais proteases envolvidas são enzimas do tipo da tripsina, quimiotripsina e termolisina (Dai & Gill, 1993). No caso dos coleópteros as enzimas digestivas predominantes no intestino médio são do tipo cisteíno-proteases (Thie & Houseman, 1990) e é provável que estas sejam as proteínas envolvidas no processamento das toxinas do tipo Cry3.

### c) União ao receptor

Após serem ativadas, as proteínas Cry se unem a sítios específicos localizados nas microvilosidades das células colunares do intestino médio das

larvas de insetos suscetíveis: lepidópteros (Hofman et al., 1988), coleópteros (Bravo et al., 1992) e dípteros (Ravoahangimalala et al., 1993).

Por ser a união a esses sítios a etapa determinante da alta especificidade das  $\delta$ -endotoxinas (Van Rie et al., 1989), diversos grupos de pesquisa têm dedicado um grande esforço para entender como ocorre esse processo. A metodologia mais empregada são os estudos cinéticos de união utilizando proteínas marcadas radioativamente e vesículas de membrana da microvilosidade apical (VMMA). Com a finalidade de estimar os parâmetros de união, podem-se calcular a constante de dissociação ( $K_d$ ) e a concentração de sítios de união ( $B_{max}$ ). A toxina marcada é colocada para competir com a toxina fria (competição homóloga) e, para verificar se duas toxinas Cry compartilham o mesmo sítio de união, podem ser efetuados experimentos de competição heteróloga. A maior parte das análises tem sido feita com larvas de lepidópteros e toxinas do tipo Cry1 (Pietrantonio & Gill, 1996), exceto em um trabalho no qual se estudou a interação entre a toxina Cry3A e seus sítios de união nas VMMA do coleóptero *Tenebrio molitor* (Belfiore et al., 1994). Acredita-se que nos dípteros e demais organismos suscetíveis a *Bt* também deve haver uma interação entre as  $\delta$ -endotoxinas e um receptor específico, embora se desconheça como ocorre esse processo.

Dos resultados obtidos em estudos de competição homóloga pode-se generalizar que a constante de dissociação ( $K_d$ ) entre as toxinas e seus sítios de união para o caso dos lepidópteros é da ordem de 0,2 a 50nm e que a concentração de sítios de união ( $B_{max}$ ) varia entre 0,4 a 62pmoles/mg de proteína das vesículas (Pietrantonio & Gill, 1996). Para o caso da toxina Cry3A e as VMMA de *Tenebrio molitor* foi determinado que a  $K_d$  e a  $B_{max}$  são de 17,5nm e 304 pmoles/mg de proteína das vesículas, respectivamente (Belfiore et al., 1994). A maior parte das análises demonstraram que existe uma correlação positiva entre os parâmetros de união e a toxicidade, embora tenham sido reportados vários casos em que os parâmetros de união não estão correlacionados com a toxicidade (Wofsberger, 1990; Gould et al., 1992; Ihara et al., 1993; Estada & Ferré, 1994; Escriché et al., 1994; Lee et al., 1995a; Wright et al., 1997).

## 1. União reversível e irreversível

Os estudos de competição homóloga mostraram que a cinética de união das  $\delta$ -endotoxinas às VMMA dos insetos suscetíveis é bifásica, composta de um passo reversível e outro irreversível (Hofmann et al., 1988; Van Rie et al., 1989). A interação inicial entre a toxina e seu sítio de união (união reversível) é um requisito para a toxicidade, mas não é suficiente. Os eventos posteriores tais como a união irreversível e a inserção na membrana parecem estar mais correlacionados com a toxicidade. Um exemplo é o caso das toxinas Cry1Ab e Cry1Ac e o lepidóptero *Lymantria dispar*. Ambas as proteínas compartilham o mesmo sítio de união, sendo Cry1Ab 400 vezes mais potente que Cry1Ac. Entretanto Cry1Ac se une com maior afinidade ao receptor (Wolfersberger, 1990). Esse paradigma foi solucionado ao descobrir-se que Cry1Ab se une com menor afinidade, mas de maneira irreversível, diferentemente da toxina Cry1Ac (Liang et al., 1995).

Uma metodologia alternativa para estudar a interação da toxina e seus sítios de união é a ressonância de superfície (*surface plasmon resonance*). Nesse sistema, um dos reagentes (toxina ou vesículas) é imobilizado em uma capa hidrofílica de dextrano sobre a superfície de um sensor de ouro colocado dentro de uma micro cavidade. Quando se faz passar um fluxo do outro componente e ocorre a união, o aumento da massa total que está unida ao sensor muda o ângulo da luz polarizada que se reflete na sua superfície. Esta mudança é detectada por meio de um arranjo de diodos. Desta maneira é possível medir a associação e dissociação do complexo toxina-receptor em tempo real e não em condições de equilíbrio como é o caso dos experimentos nos quais se utiliza a toxina marcada (Szabo et al., 1995). Usando esta técnica, tem-se estudado a cinética de união entre as toxinas Cry1Ab e Cry1Ac e seus sítios de união nas VMMA de *Choristoneura fumiferana* e *Plutella xylostella* (Masson et al., 1994; Masson et al., 1995a). Em ambos os estudos foi demonstrado que a alta afinidade de união entre as toxinas e seus sítios de união se devem principalmente à baixíssima taxa de dissociação do complexo formado que, em ambos os casos, foi inferior a  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . A informação que se obtém utilizando esse sistema pode

ser muito valiosa já que, ao analisar separadamente as velocidades de associação e de dissociação do complexo toxina-receptor, podem-se encontrar alterações que nem sempre são encontradas no equilíbrio (Masson et al., 1995a). Esse aspecto poderia ter relevância particular para a análise de proteínas mutantes que estejam afetadas na interação irreversível com o receptor.

## 2. Regiões da toxina que interagem com o receptor

As regiões do domínio II que participam da interação com o receptor foram identificadas por meio de análises de mutantes sítio-dirigidas. Foi determinado que as quatro regiões proeminentes nesta interação são: a asa da a-hélice 8 e as asas 1 (entre b2 e b3), 2 (entre b6 e b7) e 3 (entre b10 e b11). A função de cada uma destas regiões pode ser diferente nos distintos insetos suscetíveis. Por exemplo, os resíduos que formam a asa da a-hélice 8 de Cry1Ab são importantes para a interação inicial com o receptor em *Lymantria dispar* (Lee et al., 1996b), embora este mesmo mutante, em outras espécies de insetos sensíveis (*M. sexta* e *H. virescens*), não apresente nenhuma alteração na união.

Algumas mutações afetam a etapa inicial da interação com o receptor (união reversível) produzindo proteínas com uma afinidade menor pelo receptor e com menor toxicidade. Esse é o caso das mutações na asa 1 da toxina Cry3A, que perdem sua habilidade para unir-se ao receptor e sua toxicidade a *Tenebrio molitor* (Wu & Dean, 1996). A asa 3 da toxina Cry1Ab também é importante na interação inicial com o receptor. Os mutantes nesta região são 13-100 vezes menos tóxicas (Dean et al., 1996). Também a deleção de uma grande parte da asa 2 em Cry1Aa (<sup>365</sup>LYRRIL<sup>371</sup>) ou sua substituição por alaninas provocou uma perda substancial da união inicial com o receptor e toxicidade contra *Bombix mori* (Lu et al., 1994). Resultados similares foram obtidos ao realizar-se esse mesmo tipo de substituição nos resíduos <sup>368</sup>RRP<sup>370</sup> da toxina Cry1Ab em *M. sexta*, *H. virescens* (Rajamohan et al., 1996a) e *L. dispar* (Dean et al., 1996). Mutações pontuais nos resíduos <sup>367</sup>YRR<sup>369</sup> da toxina Cry1Ac também afetaram a interação inicial com o receptor em *M. sexta* (Von Tersch et al., 1994).

Outras mutações causam mudanças na união irreversível conduzindo

a uma baixa toxicidade. Esse é o caso das mutações na asa 1 da toxina Cry1Ac, em que o aminoácido G312 participa na interação irreversível com o receptor em *M. sexta* (Von Tersch et al., 1994). Outro exemplo são as mutantes nos quais foram feitas modificações pontuais (F371A e G374A) e se eliminou a região <sup>371</sup>FNIGI<sup>375</sup> da asa 2. Esses mutantes perderam cerca de 400 vezes sua potência contra *M. sexta*, mas não apresentaram mudanças significativas nos parâmetros de união e sim na união irreversível com o receptor (Rajamohan et al., 1995). Experimentos posteriores em que o resíduo F371 foi substituído por C, V, S, L, Y e W mostraram que a toxicidade de Cry1Ab contra *M. sexta* está correlacionada com o tamanho e hidrofobicidade do aminoácido desta posição.

A mutagênese do domínio II tem gerado melhores toxinas. Um exemplo que ilustra isto é o caso de uma substituição tripla da toxina Cry1Ab (N372A-A282G-L283S), gerando um mutante que passou a ser 36 vezes mais tóxico que a toxina silvestre contra *L. dispar*. Esse mutante aumentou a constante de afinidade em 18 vezes (Rajamohan et al., 1996b). Mutações na asa 3 da toxina Cry3A resultou em uma proteína mais tóxica contra *T. molitor*. Esse mutante apresentou uma melhor união irreversível, o que explica sua maior potência (Wu & Dean, 1996).

O domínio III participa na determinação da especificidade (Ge et al., 1991; Caramori et al., 1991). A construção de proteínas quiméricas entre Cry1C e Cry1Ea mostrou que o domínio III da primeira é determinante para a especificidade a *Spodoptera exigua* e *Mamestra brassicae* (Bosch et al., 1994). A troca entre as proteínas Cry1Ab e Cry1C resultou numa proteína 10 vezes mais tóxica para *S. exigua* (De Maagd et al., 1996a; De Maagd et al., 1996b). Também foi demonstrado que o intercâmbio do domínio III entre as toxinas Cry1Aa e Cry1Ac determina a união a diferentes receptores no intestino de *L. dispar*, já que a quimera com o domínio III de Cry1Ac se une a aminopeptidase N de 120kDa e a do domínio III de Cry1Aa se une a uma proteína de 210kDa (Lee et al., 1995a).

Não se tem conhecimento de que resíduos específicos dentro do domínio III participem na união com o receptor. A única informação que se tem

nesse sentido é que a mutação nos resíduos S301 e S304 da toxina Cry1Ac causou a perda da capacidade de união e toxicidade contra *M. sexta* (Aronson et al., 1995).

### 3. Natureza bioquímica do receptor

Importantes esforços têm sido dirigidos na identificação, purificação e caracterização do receptor das proteínas Cry na microvilosidade apical das células colunares do intestino médio. A metodologia mais empregada tem sido separar as proteínas das VMMA por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e posteriormente transferi-las para papel de nitrocelulose. A união específica da toxina a algumas das bandas se revela com anticorpo anti-toxina e logo com um segundo anticorpo, ou então pela utilização da toxina marcada (biotina-estreptavidina ou  $^{125}\text{I}$ ). Esta evidência sugere que o sítio que reconhece a toxina na proteína de união é um epítope muito pequeno ou então um carboidrato (Cioffi, 1984). Nesse tipo de experimento foi demonstrado que, para a maioria das toxinas Cry1 estudadas, as moléculas que se unem com maior afinidade são glicoproteínas de entre 63 e 220kDa (Haider & Ellar, 1987; Oddou et al., 1991, 1993; Garczynski et al., 1991; Indrasith & Hori, 1992). Foi proposto que a interação inicial é a existente entre a toxina e o carboidrato do receptor, enquanto que a irreversível está associada com uma interação proteína-proteína (Liang et al., 1995).

Esse tipo de estudo é ainda insipiente para o caso dos coleópteros e dípteros. Foi determinado que, no coleóptero *Tenebrio molitor*, a molécula de união é uma proteína de 144kDa (Belfiore et al., 1994). Uma banda de 148kDa e outra de 78kDa foram identificadas como as proteínas de união para a toxina Cry11Aa nas vesículas dos mosquitos *Anopheles stephensi* e *Tipula oleraca*, respectivamente (Feldmann et al., 1995).

Os maiores avanços no esclarecimento da natureza bioquímica dos possíveis receptores para as proteínas Cry1 foram obtidos durante os três últimos anos. Na Tabela 2 estão listados os resultados que se tem até o momento nesse sentido. As proteínas de união para as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1C

em *Manduca sexta* (Knight et al., 1994; Sangadala et al., 1994; Luo et al., 1996), *Heliothis virescens* (Gill et al., 1995), *L. dispar* (Valaitis et al., 1995; Lee et al., 1996a), *P. xylostella* (Denolf et al., 1996; Luo et al., 1997) e *Bombix mori* (Yaoi et al., 1997) são membros da família das aminopeptidases do tipo N com peso molecular em torno de 120kDa. A toxina Cry1Ab em *M. Sexta*, além de unir-se a uma aminopeptidase N (Denolf et al., 1997), une-se também a um membro da família das caderinas (Vadlamudi et al., 1995).

TABELA 2. Receptores das  $\delta$ -endotoxinas

Toxina	Inseto	Tamanho (kDa)	Identidade	Referência
Cry1Aa	<i>Bombix mori</i>	120	Aminopeptidase N	Yaoi et al., 1997
Cry1Ab	<i>Manduca Sexta</i>	210	Caderina	Vadlamudi et al., 1995
Cry1Ab	<i>Manduca Sexta</i>	120	Aminopeptidase N	Denolf et al., 1996
Cry1Ab	<i>Plutella xylostella</i>	120	Aminopeptidase N	Denolf et al., 1996
Cry1Ac	<i>Manduca Sexta</i>	120	Aminopeptidase N	Knight et al., 1994 Sandala et al., 1994
Cry1Ac	<i>Heliothis virescens</i>	120	Aminopeptidase N	Gill et al., 1995
Cry1Ac	<i>Lymantria dispar</i>	120	Aminopeptidase N	Valaitis et al., 1995
Cry1Ac	<i>Plutella xylostella</i>	120	Aminopeptidase N	Luo et al., 1997
Cry1C	<i>Manduca Sexta</i>	106	Aminopeptidase N	Luo et al., 1996

A aminopeptidase N (APN) está unida à membrana mediante uma ancora de glicosilfosfatidilinositol (GFI) (Garczynski & Adang, 1995). A análise da seqüência de duas das proteínas de união para Cry1Ac em *M. sexta* (Knight et al., 1995) e *H. virescens* (Gill et al., 1995) que foram clonadas, indica que o GFI está unido à proteína em sua extremidade C-terminal. A ancora GFI é suscetível à ação de uma fosfolipase C específica endógena do inseto que a converte em uma forma solúvel de 115kDa (Lu & Adang, 1996), forma esta que retém sua capacidade de se unir à toxina de maneira específica. Foi demonstrado que o açúcar N-acetil-D-galactosamina (NAGal) inibe de forma específica a união entre a APN e a toxina Cry1Ac em *M. sexta* (Knight et al., 1994; Masson et al., 1995b), *H. virescens* (Gill et al., 1995), *L. dispar* (Valaitis et al., 1995) e *P. xylostella* (Luo et al., 1997). Isto sugere que a proteína de união de Cry1Ac é um glico-conjugado que contém NAGal e que este açúcar participa diretamente da interação com a toxina.

#### d) Inserção na membrana

A fase irreversível da união das  $\delta$ -endotoxinas na membrana é uma evidência de que as proteínas Cry se inserem nela, para em seguida causar a destruição do tecido intestinal das larvas de insetos suscetíveis (Van Rie et al., 1989; Ihara et al., 1993; Liang et al., 1995).

Alguns mutantes no domínio I afetados na união irreversível têm sido isolados. Propõe-se que esses mutantes são incapazes de se inserir na membrana, já que eles ganharam uma carga negativa (A92D) (Wu & Aronson, 1992) ou eliminaram uma carga positiva (R93) (Hussain et al., 1996). Ambos os mutantes se localizam na face do domínio I que está exposta à membrana. Foi proposto que estas mudanças impediriam a interação com a membrana que tem carga negativa. Os mutantes de um resíduo situado no laço entre as hélices a-4 e a-5 (Y153A, Y153R e Y153D) mostraram que uma carga negativa nesta posição é desfavorável para a união irreversível (Chen et al., 1995).

Doses micromolares das proteínas Cry são capazes de interagir com membranas lipídicas artificiais e de inserir-se nelas, formando canais permeáveis a cátions (English et al., 1991) e solutos neutros relativamente pequenos (Yunovitz & Yawetz, 1988; Haider & Ellar, 1989a). Foi demonstrado que a capacidade da toxina Cry1C para interagir com uma membrana modelo e dissipar o potencial trans-membranal, aumenta de forma substancial ao diminuir o pH ( $\text{pH} < 5$ ) e que isto está correlacionado com o aumento na hidrofobicidade da superfície da molécula (Butko et al., 1994). Esses dados sugerem que nestas condições *in vitro*, a proteína sofre uma mudança conformacional que a leva a um estado competente para a inserção. É possível que, *in vivo*, haja uma transição a um estado conformacional similar, por exemplo, para a união ao receptor. É importante assinalar que em concentrações fisiologicamente relevantes (pM-nM), as  $\delta$ -endotoxinas não se inserem de maneira espontânea nas membranas biológicas que carecem de receptores específicos (Knowles, 1994).

Com base no conhecimento que se tem sobre a inserção de outras toxinas bacterianas formadoras de poro (Li, 1992; Parker & Pattus, 1993) foram propostos dois modelos possíveis da inserção de toxinas Cry na membrana. Um

primeiro, "modelo de abre cartas", propõe que as  $\alpha$ -hélices 5 e 6 se inserem na membrana como consequência de uma mudança conformacional causada pelo receptor sem maior participação das hélices e domínios restantes. O outro, "modelo de guarda-chuva", sugere que, após a união com o receptor, a região a4-a5 se insere, enquanto que o resto das hélices se arranjam sobre a superfície da bicamada lipídica expondo para ela sua face hidrofóbica, ficando a molécula desta com forma semelhante a de um guarda-chuva (Knowles, 1994). Existem evidências que respaldam esse último modelo. Resíduos de cisteína foram introduzidos para formar pontes dissulfeto entre algumas hélices do domínio I da toxina Cry1Aa e assim restringir o movimento da a-5. Posteriormente se analisou a capacidade destas proteínas para formar canais iônicos em bicamadas lipídicas. Encontrou-se que, ao contrário da original, as mutantes foram capazes de formar poros somente na presença de um agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol), o que evidenciou a necessidade de que as hélices a4 e a5 conservem flexibilidade em sua estrutura para uma inserção e formação de poro eficiente. Um pré-requisito para a formação do canal é a separação do domínio I do resto da molécula, já que a mutante com uma ponte dissulfeto na interfase domínio I - domínio II foi incapaz de formar canais em seu estado oxidado (Schwartz et al., 1997).

#### **e) Agregação**

Experimentos de proteção osmótica demonstram que após unirem-se ao receptor e inserirem-se na membrana, as proteínas Cry formam poros com um diâmetro de 1 a 2nm (Knowles & Ellar, 1987). O tamanho desses poros e a aparição freqüente de múltiplos estados de condutância nos estudos da atividade das proteínas Cry em bicamadas lipídicas planas (Slatin et al., 1990; Schwartz et al., 1993; Grochulski et al., 1995; Schwartz et al., 1997) têm sido considerados como evidências da formação de diversos estados de agregação das  $\delta$ -endotoxinas.

#### **f) Formação do poro**

A formação do poro tem sido estudada em diferentes sistemas. Um

deles é o monitoramento das trocas na corrente de curto circuito (lcc) nos intestinos médios isolados. A lcc é uma medida indireta do transporte ativo de íons da hemolinfa para o lúmen (Chen et al., 1993). Ao agregar toxinas do lado luminal do intestino médio observa-se que, depois de 5 a 60 minutos, a lcc cai total ou parcialmente como resposta à formação de uma via de permeabilidade (Griego et al., 1979; Liebig et al., 1995). Foi demonstrado que o  $Ba^{2+}$ , um agente que bloqueia canais de potássio, é capaz de proteger e inclusive reverter o efeito das toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac no intestino de *Manduca sexta* (Crawford & Harvey, 1988).

Outro tipo de estudos tem sido a análise do co-transportador  $K^+$ /aminoácidos (aa) dependente do gradiente de  $K^+$ . Ao dissipar o gradiente  $K^+$ , as proteínas Cry1 inibem o co-transporte  $K^+$ /aa nas VMMA de lepidópteros (Sacchi et al., 1986).

Um enfoque que permite analisar a formação do poro das toxinas Cry é o estudo com uma sonda fluorescente das trocas que produzem as toxinas Cry1Aa, cry1Ac, Cry1C e Cry1D no potencial de membrana das vesículas da membrana das microvilosidades apicais (VMMA) purificadas de larvas de *B. mori*, *T. ni* e *S. frugiperda*. Com estas análises foi demonstrado que as toxinas Cry aumentavam a permeabilidade da membrana tanto para cátions monovalentes como para divalentes (Uemura et al., 1992; Lorence et al., 1995, 1997).

O efeito de Cry1Ac em VMMA de *M. sexta* foi descrito monitorando-se as mudanças na dispersão da luz devido a alterações no volume das vesículas. Nesse caso se observou que Cry1Ac aumentou a permeabilidade tanto para ânions ( $Cl^-$ ,  $SCN^-$ , gluconato) como para cátions ( $K^+$ ,  $Na^+$ , tetraetilamonio $^+$ ) (Carroll & Ellar, 1993). As diferenças no índice de refração dos solutos, as trocas na dispersão da luz independentemente do volume das vesículas e os artefatos associados com o movimento e a sua agregação são algumas das razões que limitam esse tipo de ensaio. Por isso, os autores propuseram uma alternativa baseada no monitoramento do volume intravesicular medido pelo apazamento da fluorescência da carboxifluoresceína em VMMA de *M. sexta* (Carroll & Ellar, 1997). Usando esse sistema, observou-se que Cry1Ac forma poros que permitem

o fluxo livre de rafinose, molécula com um diâmetro de 1,4nm. Utilizando eletrólitos de tamanho crescente, foi proposto que o diâmetro limitante do poro em condições alcalinas (pH 9,0) está entre 2,4 e 2,6nm.

Outro tipo de enfoque consistiu em estudar a capacidade de formação do poro das toxinas Cry em culturas de células de inseto. Foi relatado que a rafinose e a sacarose foram capazes de proteger osmoticamente as células da linha CF-1 de *Choristoneura fumiferana* da ação das toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac e assim evitar a citólise (Knowles & Ellar, 1987). Os resultados de um estudo de *patch clamp* dos canais iônicos formados pela toxina Cry1C nas células Sf-9 provenientes do ovário de *S. frugiperda* revelaram que esta toxina forma canais aniônicos de 26pS em ambos os lados da membrana e através da utilização do corante fura-2 verificou-se que ela causa um aumento imediato da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular. Com esta evidência em mente, os autores propuseram um modelo de ação baseado na internalização da molécula (Schwartz et al., 1991). Usando esta mesma linha celular e duas sondas fluorescentes, foi demonstrado que Cry1C aumenta a permeabilidade da membrana das células ao menos para o  $H^+$ , o  $K^+$  e o  $Na^+$  (Vachon et al., 1995). A principal crítica que se tem feito a esse tipo de ensaio é que a origem das células utilizadas e das células colunares do intestino médio são muito diferentes. É questionável nesse mesmo sentido que os receptores para as toxinas Cry se expressem nestas células e, portanto, que o efeito observado corresponda ao que sucede *in vivo*. Por essas razões, deve-se ter cuidado com as conclusões a que se chegou com a utilização desse material biológico.

Finalmente, tem sido relatado que as toxinas Cry (Cry1Aa, Cry3A, Cry1C) (Slatin et al., 1990; Walters et al., 1993; Lorence et al., 1995) ou seus fragmentos (domínio I das toxinas Cry1Ac e Cry3Bb; Walters et al., 1993; Von Tersch et al., 1994) são capazes de formar canais em bicamadas lipídicas planas em ausência de receptores. O fragmento correspondente à hélice a-5 das toxinas Cry3A (Gazit et al., 1994) e Cry1Ac (Cummings et al., 1994) se estrutura em forma de  $\alpha$ -hélice em um meio hidrofóbico (metanol) e tem a capacidade de formar poro em bicamadas lipídicas. Quando toxinas Cry são incorporadas na

bicamada sintética formam-se canais pouco seletivos. A condutância dos canais varia de 25 a 4000pS e, em todos os casos, vários estados ou níveis de condutância têm sido observados. Entretanto, para que haja incorporação destas toxinas na membrana, é necessário que se utilizem altas concentrações de toxina (mM), dose esta 1000 vezes maior que a dose letal *in vivo* (nM ou pM).

Algumas tentativas de incorporar o receptor nas bicamadas lipídicas de plantas têm sido feitas, primeiramente com a fusão de VMMA de *M. sexta* e *S. frugiperda* (Lorence et al., 1995; Martin & Wolfersberger, 1995) e, posteriormente, mediante a fusão da aminopeptidase N purificada de *M. sexta* (Schwartz et al., 1996). Esses estudos indicam que os poros formados pela toxina na presença do receptor têm características cinéticas diferentes. Esta evidência sugere que é plausível a participação direta do receptor na formação do poro.

O receptor poderia também catalizar a associação ou inserção da toxina na membrana, sem participar na formação do poro. Esta catálise aumentaria a concentração efetiva da toxina na superfície da membrana, ou induziria a uma troca conformacional que conduziria a um estado competente para a inserção.

#### g) Citólise

As proteínas Cry causam a morte das células epiteliais por inativação do sistema que mantém o gradiente de pH (Wolfersberger, 1992) e por citólise osmótica (Knowles & Ellar, 1987). As toxinas Cry aumentam a permeabilidade das microvilosidades apicais a cátions, ânions, água e moléculas de maior tamanho. Isto causa um colapso na diferença de potencial e, portanto, perda da força motriz que dirige a entrada de aminoácidos ao interior celular, assim como a redistribuição dos cátions entre o lúmen e o citoplasma. O efeito mais devastador desse processo é a alcalinização do citoplasma que interfere no metabolismo celular normal e tem como consequência final a destruição do epitélio intestinal (Harvey, 1992; Wolfersberger, 1992). Uma vez destruídas as células colunares e caliciformes, os esporos de *Bt* têm acesso a hemolinfa, na qual se proliferam.

Foi demonstrado que, em alguns casos, o efeito das proteínas Cry e dos esporos é sinérgico (Johnson & McGaughey, 1996) e que alguns desses esporos contêm toxina na superfície, o que assegura seu acesso à hemolinfa (Du & Nickerson, 1996). A consequência final da destruição do intestino médio e da proliferação de bactérias na hemolinfa é a morte das larvas por inanição e septicemia.

## Resistência

A utilização de produtos à base de *B. thuringiensis* por várias décadas, sem que fosse notificada a presença de insetos resistentes, criou a idéia de que esse fato seria difícil de ocorrer. Teoricamente os insetos teriam pouca chance de desenvolver resistência às toxinas de *Bt*, pois elas não persistem por muito tempo no ambiente e poderiam coevoluir com os insetos-alvo. Entretanto, a partir de meados dos anos 80, diversos estudos mostraram que os insetos têm capacidade de desenvolver diferentes níveis de resistência às  $\delta$ -endotoxinas.

O primeiro caso, obtido a partir de testes de seleção em laboratório, foi o do lepidóptero *Plodia interpunctella* (McGaughey, 1985). A partir de então, várias espécies de insetos das ordens Coleóptera (*Leptinotarsa decemlineata*), Díptera (*Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*) e Lepidóptera (*Heliothis virescens*, *Plutella xylostella*, *Trichoplusia ni* (Estada & Ferre, 1994), *Spodoptera exigua* (Moar et al., 1995) e *S. littoralis* (Müller-Cohn et al., 1996) têm apresentado elevados níveis de resistência a *Bt* em laboratório. A traça das crucíferas, *P. xylostella*, é o único inseto reconhecido como tendo desenvolvido importantes níveis de resistência nas populações de campo em resposta a tratamentos comerciais com *Bt* (McGaughey & Whalon, 1992; Tabashnik et al., 1996; Tang et al., 1996; Ibarra & Lopes, 1997).

As bases teóricas do desenvolvimento de resistência são evolutivas, pois esse é um processo lento e considerado como uma coevolução dos organismos envolvidos (patógeno e hospedeiro) (Schnepf et al., 1998). Quando uma população enfrenta uma pressão de seleção em seu ambiente, reage em função dos atributos qualitativos e quantitativos do seu *pool gênico*. Assim, os

indivíduos mais capacitados transferem esta capacidade a seus descendentes, os quais darão mais vantagens as suas novas gerações e incrementarão a frequência de alelos na população em cada geração (Ibarra & Lopes, 1997).

Vários são os mecanismos que podem ocasionar a resistência em insetos. O modo de ação da delta-endotoxina, descrito anteriormente, permite propor algumas hipóteses para os prováveis mecanismos de resistência:

- 1- pH intestinal menos alcalino impedindo a solubilização do cristal;
- 2- proteases intestinais incapazes de digerir/ativar as delta-endotoxinas;
- 3- proteases intestinais muito eficazes, que poderiam digerir totalmente a protoxina;
- 4- mudança conformacional dos receptores;
- 5- hipersensibilidade dos indivíduos-alvo.

Desses mecanismos de resistência alguns são mais passíveis de se desenvolver do que outros e devem ser tratados de forma única para cada toxina e para cada população de insetos. A estabilidade desta resistência também é variável, devendo ser tratada da mesma forma (Ibarra & Lopez, 1997).

A maior parte dos mecanismos de resistência está relacionada a alterações no número e na conformação dos receptores presentes nas membranas do epitélio do intestino médio dos insetos suscetíveis. Como foi mostrado na Tabela 2, alguns receptores foram identificados e podem ter afinidade pela mesma toxina, como é o caso do receptor de 120kDa de *P. xylostella* que reconhece Cry1Ab e Cry1Ac (Denolf et al., 1996; Luo et al., 1997). Uma mesma toxina pode ainda ter afinidade por receptores diferentes, como é o caso de Cry1Ab em *Manduca sexta*, que se liga a um receptor de 210 e outro de 120kDa (Vadlamudi et al., 1995; Denolf et al., 1996).

Em estudos realizados com *Plodia interpunctella* foi observado que, após 15 gerações de tratamento em laboratório com um formulado de *Bacillus thuringiensis* subs. *kurstaki*, os valores de  $CL_{50}$ , concentração letal para 50% da população exposta, aumentaram cerca de 100 vezes em relação à dos insetos não-selecionados. Esse nível de resistência diminuiu quando a pressão de seleção

foi removida, demonstrando que esse caráter deveria ser recessivo (McGaughey & Beeman, 1988). Através de testes de imunodeteção de receptores da membrana intestinal, verificou-se que a afinidade à toxina Cry1Ab foi reduzida em cerca de 50%. Em compensação, houve um aumento de sensibilidade a Cry1C, proteína que não estava presente na formulação. Foi verificado que o número de receptores para Cry1C, aumentou (Van Rie et al., 1990), mostrando que o fato de o inseto perder suscetibilidade a uma toxina não implica adquirir resistência a outras toxinas. Testes realizados com outras duas populações do mesmo inseto resistentes a Cry1Ac mostraram que houve uma baixa ativação da protoxina devido à perda da síntese de uma das proteinases intestinais (Oppert et al., 1994, 1997).

O desenvolvimento de raças hipersensíveis foi comprovado com o inseto *Leptinotarsa texana*, que deixa de se alimentar quando o *Bt* está incorporado à dieta. Cogitou-se que esse inseto seria pouco sensível às toxinas dessa bactéria. No entanto, testes posteriores mostraram que ele era tão sensível à toxina que, assim que a detectava, deixava de se alimentar (De León & Ibarra, 1995).

Em muitos casos, os mecanismos de resistência não justificam os níveis de resistência encontrados, sugerindo que vários fatores podem estar envolvidos. Por exemplo, numa população de *H. virescens* selecionada com Cry1Ab expressa em *Pseudomonas fluorescens*, a  $CL_{50}$  aumentou 20 vezes em sete gerações. Esta resistência aumentou 71 vezes após quatro gerações de exposição ao Dipel, produto que contém diversas proteínas inclusive Cry1Ab. A toxina apresentou baixa afinidade com os sítios receptores, mas isto não foi considerado suficiente para explicar esse alto nível de resistência (Schnepf et al., 1998).

Existem exemplos de insetos que adquiriram resistência a várias toxinas quando expostos a uma única toxina. É o que se chama resistência cruzada. Por exemplo, uma população de *H. virescens* selecionada com Cry1Ac, apresentou resistência a Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1Aa e Cry1Fa, entretanto permaneceu sensível a Cry1Ba e Cry1Ca. É bastante provável que haja competição entre as toxinas pelos sítios receptores que, uma vez alterados, causam problemas

na afinidade de outras toxinas (Schnepf et al., 1998).

Um outro exemplo é o caso da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. Diversos estudos têm sido conduzidos com esse inseto, pois ele desenvolveu resistência a *Bt* em campo em diferentes regiões do planeta, como Filipinas, Tailândia, Flórida, Nova York, Japão, Honduras e Brasil. Estudos realizados por Tabashnik et al. (1990) com uma população no Hawaii, citam valores de resistência de 25 a 33 vezes em relação as populações suscetíveis, quando tratadas com o produto Dipel. Estudos realizados com toxinas individualizadas mostraram que a população tornou-se resistente às toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa e Cry1Ja, mas continuou sensível às toxinas Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ia, Cry2Aa e Cry9C (Ferré et al., 1991; Tabashnik et al., 1996). Os autores verificaram que o grupo de toxinas resistentes apresentavam uma seqüência de aminoácidos semelhantes no domínio II que, como foi visto, é o responsável pela ligação da toxina ao receptor. Uma alteração conformacional desse sítio deve ter sido a causa da resistência cruzada (Schnepf et al. 1998). Resultados semelhantes foram obtidos em estudos feitos com uma outra população na Flórida, que se tornou resistente a Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e continuou sensível às toxinas Cry1B, Cry1C e Cry1D. A ligação toxina-receptor de Cry1Ab foi reduzida nos insetos resistentes, mas não foi alterada em Cry1B (Shelton et al., 1993). Resultados interessantes foram encontrados numa população das Filipinas, onde os insetos se tornaram resistentes a Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, mas continuaram sensíveis a Cry1C, Cry1F e Cry1J. A ligação da toxina-receptor foi alterada em Cry1Ab, mas permaneceu a mesma para Cry1Aa, Cry1Ac e Cry1C, indicando haver um outro fator influenciando a resistência (Tabashnik et al., 1997; Schnepf et al., 1998).

Quando a resistência é ainda limitada, tem sido observado que é relativamente instável e cai quando a seleção é descontinuada, ou seja, é uma característica reversível (McGaughey & Beeman, 1988; Tabashnik et al., 1994). Ela pode ser explicada em tempo e espaço, em função das mudanças na proporção dos genes de suscetibilidade e de resistência de uma população. Isto implica que

as doses elevadas praticamente eliminam os genes de suscetibilidade de uma população e os poucos genes de resistência se incrementam exponencialmente. Por outro lado, uma pressão de seleção constante impede a recuperação dos genes de suscetibilidade, que ocorreria nas gerações não-expostas à pressão de seleção. A distribuição e rapidez com que se difundem os genes de resistência dependem do número de genes envolvidos e sua dominância ou recessividade (Ferro, 1993).

Os resultados dos estudos de resistência a toxinas de *Bt* têm sido divergentes em diferentes espécies. Na maioria dos casos, a resistência é parcialmente recessiva ou codominante e, aparentemente, diversos genes estão envolvidos. Em estudos realizados com *P. interpunctella*, McGaughey (1995), sugeriu que a resistência seria um caráter monogênico e recessivo. No caso de *H. virescens*, foi determinado que a resistência é autossômica, incompletamente dominante e determinada por diversos fatores genéticos (Sims & Stones, 1991). Tabashnik et al. (1992) concluíram que em *P. xylostella* a resistência é autossômica, recessiva e determinada por um ou poucos loci. Chaufaux et al. (1997), estudando populações resistentes e sensíveis de *Spodoptera littoralis* mostraram que a resistência é parcialmente recessiva e que a F1 obtida de machos resistentes e fêmeas suscetíveis era mais resistente que as obtidas de machos sensíveis e fêmeas resistentes, indicando um efeito paterno. O grupo concluiu que o gene que confere resistência deve ser autossômico ou ligado ao sexo e que, neste caso, a resistência é provavelmente multifatorial.

Para evitar o aparecimento da resistência é fundamental compreender o efeito biológico do agente de controle e os mecanismos de resistência que a praga pode desenvolver. Dentro desta ótica, cabe ressaltar que o manejo integrado de pragas ocupa um lugar importante, pois utiliza a diversificação de recursos de controle, redução da pressão de seleção unilateral, utilização de refúgios e monitoramento da resistência. No caso de *Bt*, as estratégias variam dependendo da técnica utilizada para administrar toxinas, seja como bioinseticida ou como plantas transgênicas (Ibarra & Lopes, 1997).

Diversas formas para evitar a resistência foram propostas, como a

utilização de diferentes toxinas que atuam sobre os mesmos insetos, mas que se unam com diferentes receptores (Van Rie, 1991), a utilização de refúgios, que manteriam a heterogenicidade da população de insetos, o uso de inimigos naturais em conjunto com as  $\delta$ -endotoxinas (Monnerat, 1995) e a rotação entre produtos biológicos e químicos. Qualquer que seja a estratégia escolhida, a resistência só deixará de ser problema se a área tratada for bem monitorada. Os avanços dos estudos sobre o modo de ação das delta endotoxinas e os mecanismos de resistência desenvolvidos pelos insetos estão contribuindo muito para um bom monitoramento. Nesse sentido, Gould et al. (1997) conseguiram estimar a frequência inicial dos genes de resistência em populações de *H. virescens* e baseando-se nesse dado pode-se determinar, inclusive, o tamanho da área de refúgio necessária para que se tenha um retardamento do aparecimento da resistência.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, W. Y.; ELLAR, D.J. Directed mutagenesis of selected regions of a *Bacillus thuringiensis* entomocidal protein. *FEMS Microbiology*, v.68, p.97-104, 1990.
- ARONSON, A.I.; BECKMAN, W. Y; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiology Review*, v.50, p.1-24, 1986.
- ARONSON, A.I.; WU, D.; ZHANG, C. Mutagenesis of specific and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *Journal of Bacteriology*, v.177, p.4059-4065, 1995.
- BARLOY, F.; DELÉCLUSE, A.; NICOLAS, L.; LECADET, M. Cloning and expression of the first anaerobic toxin gene from *Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia*, encoding a new mosquitocidal protein with homologies to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Journal of Bacteriology*, v.178, p.3099-3105, 1996.
- BELFIORE, C.J.; VADLAMUDI, R.K.; OSMAN, Y.A.; BULLA JR., L. A specific binding protein from *Tenebrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.200, p.359-364, 1994.
- BIETLOT, H.; CAREY, P.P.; KAPLAN, H.; LESSARD, T.; POZSGAY, M. Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biochemical Journal*, v.260, p.87-91, 1989.
- BOSCH, D.; SCHIPPER, B.; VAN DER KLEIJ, H.; DE MAAGD, R.A.; STIEKEMA, W.J. Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. *Bio/Technology* v. 12, p.915-918, 1994.
- BRAVO, A.; JANSSENS, S.; PEFEROEN, M. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 60, p.237-246, 1992.
- BRAVO, A.; HENDRICKX, K.; JANSSENS, S.; PEFEROEN, M. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.60, p.247-254, 1992.
- BRAVO, A.; QUINTERO, R. *Importancia y potencial del Bacillus thuringiensis en el control de plagas*. Santiago de Chile: Oficina Regional de la FAO para America Latina y el Caribe: Red de Cooperación Técnica en Biotecnología Vegetal (REDBIO), 1993. 55p.

- BRAVO, A. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin family proteins and their functional domains. *Journal of Bacteriology*, v. 179, p. 2793-2801, 1997.
- BUTKO, P.; COURNOYER, M.; PUZTAI-CAREY, M.; W.K. SUREWICK. Membrane interactions and surface hydrophobicity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin CryIC. *FEBS Letters*, v. 340, p. 89-92, 1994.
- CARAMORI, T.; ALBERTINI, A.M.; GALIZZI, A. *In vivo* generation of hybrids between two *Bacillus thuringiensis* insect-toxin-encoding genes. *Gene*, v. 98, p. 37-44, 1991.
- CARROLL, J.; ELLAR, D.J. An analysis of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins action on insect-midgut-membrane permeability using light-scattering assay. *European Journal of Biochemistry*, v. 214, p. 771-778, 1993.
- CARROLL, J.; ELLAR, D.J. Analysis of the large aqueous pores produced by a *Bacillus thuringiensis* protein insecticide in *Manduca sexta* midgut-brush-border-membrane vesicles. *European Journal of Biochemistry*, v. 245, p. 797-804, 1997.
- CHAUFAUX, J.; MÜLLER-COHN, J.; BUISSON, C.; SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; PASTEUR, N. Inheritance of resistance to the *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin in *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 90, n. 4, p. 873-878, 1997.
- CHEN, X.J.; LEE, M.K.; DEAN, D.H. Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 90, p. 9041-9045, 1993.
- CHEN, X.J.; CURTISS, A.; ALCANTARA, E.; DEAN, D.H. Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin CryIA<sub>b</sub> reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 6412-6419, 1995.
- CIOFFI, M. Comparative ultrastructure of arthropod transporting epithelia. *American Zoology*, v. 24, p. 139-156, 1984.
- CRAWFORD, D.N.; HARVEY, W.R. Barium and calcium block *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki*  $\delta$ -endotoxin inhibition of potassium current across isolated midgut of larval *Manduca sexta*. *Journal of Experimental Biology*, v. 137, p. 277-286, 1988.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Review*, v. 62, p. 807-813, 1998.
- CUMMINGS, C.E.; ARMSTRONG, G.; HODGMAN, T.C.; ELLAR, D.J. Structural and functional studies of a synthetic peptide mimicking a proposed membrane inserting region of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. *Molecular Microbiology*, v. 11, p. 87-92, 1994.
- DAI, S.-M.; GILL, S.S. *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 23, p. 273-283, 1993.
- DEAN, D.H.; RAJAMOHAN, F.; LEE, M.K.; WU, S.-J.; CHEN, X.J.; ALCÁNTARA, E.; HUSSAIN, S.R. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis- a minireview. *Gene*, v. 179, p. 111-117, 1996.
- DE LÉON, T.; IBARRA, J.E. Alternative bioassay technique to measure activity of CryIII proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, v. 88, p. 1596-1601, 1995.
- DE MAAGD, R.A.; KWA, M.S.-G.; VAN DER KLEI, H.; YAMAMOTO, T.; SCHIPPER, B.; VLAK, J.M.; STIEKEMA, W.J.; BOSCH, D. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 1537-1543, 1996 a.
- DE MAAGD, R.A.; VAN DER KLEI, H.; BAKKER, P.L.; STIEKEMA, W.J.; BOSCH D. Different domains of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins can bind to insect midgut membrane proteins on ligand blots. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 2753-2757, 1996 b.
- DENOLF, P.; HENDRICKX, K.; VANDAMME, J.; JANSSENS, S.; PEFEROEN, M.; DEGHEELE, D.; VAN RIE, J. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. *European Journal of Biochemistry*, v. 248, n. 3, p. 748-761, 1997.

- DIAS, J.M.C.S. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 27, p. 59-76, 1992.
- DONOVAN, W. P.; GONZALEZ, J. G.; JR.; GILBERT, M. P.; DANKOCSIK, C. Isolation and characterization of EG 2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae, and nucleotide sequence of the toxin gene. *Molecular & General Genetics*, v. 214, p. 365-372, 1988.
- DU, C.; NICKERSON, K.W. *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized Cry1Ac toxin: physiological and pathogenic consequences. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 3722-3726, 1996.
- EBERSOLD, H.R.; LÜTHY, P.; GEISER, P.; ETTLINGER, L. The action of the  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: an electron microscope study. *Experientia*, v. 34, p. 1672, 1978.
- ENGLISH, L.H.; READDY, T.L.; BASTIAN, A. E. Delta-endotoxin induced leakage of  $^{86}\text{Rb-K}^+$  and  $\text{H}_2\text{O}$  from phospholipid vesicles is catalyzed by reconstituted midgut membrane. *Insect Biochemistry*, v. 21, p. 177-184, 1991.
- ESCRICHÉ, B.; MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A.C.; REAL, M.D.; SILVA, F.J.; FERRÉ, J. Occurrence of three different binding sites for *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins in the midgut brush border membrane of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 26, p. 315-327, 1994.
- ESTADA, U.; FERRÉ, J. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) and selection for resistance to one of the crystal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 3840-3846, 1994.
- ESTRUCH, J.J.; WARREN, G.W.; MULLINS, M.A.; NYE, G.J.; CRAIG, J.A.; KOZIEL, M.G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 93, p. 5389-5394, 1996.
- FARKAS, J.; SEBESTA, K.; HORSKA, K.; SAMEK, Z.; DOLIJS, J.; SORM, F. The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, v. 34, p. 1118-1120, 1969.
- FAUST, R.M.; BULLA, A.L. JR. Bacterial and their toxins as insecticides. In: KURSTAKI, E., ed. *Microbial and viral pesticides*. New York: Marcel Dekker, 1982. p. 75-206.
- FELDMANN, F.; DULLEMANS, A.; WAALWIJK, C. Binding of the CryIVD toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to larval dipteran midgut proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 2601-2605, 1995.
- FERRÉ, J.; REAL, M.D.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; PEFFEROEN, M. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 88, p. 5119-5123, 1991.
- FERRO, N.D. Potential for resistance to *Bacillus thuringiensis*: Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) - a model system. *American Entomologist*, v. 39, p. 38-44, 1993.
- FLORES, H.; SOBERÓN, X.; SÁNCHEZ, J.; BRAVO, A. Isolated domain II and III from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab  $\delta$ -endotoxin binds to lepidopteran midgut membranes. *FEBS Letters*, v. 414, p. 313-318, 1997.
- GARCZYNSKI, S.F.; CRIM, J.W.; ADANG, M.J. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin by protein blot analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, p. 2816-2820, 1991.
- GARCZYNSKI, S.F.; ADANG, M.J. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c)  $\delta$ -endotoxin binding aminopeptidase in the *Manduca sexta* midgut has a glycosylphosphatidylinositol anchor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 25, p. 409-415, 1995.
- GAZIT, E.; BACH, D.; KERR, I.D.; SANSOM, M.S.P.; CHEJANOVSKY, N.; SHAI, Y. The alpha-5 segment of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: *in vitro* activity, ion channel formation and molecular modelling. *Biochemical Journal*, v. 304, p. 895-902, 1994.
- GE, A.Z.; RIVERS, D.; MILNE, R.; DEAN, D.H. Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: refinement of *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domain of Cry1A(c). *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, p. 17954-17958, 1991.
- GILL, S.S.; COWLES, E.A.; FRANCIS, V. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 27277-27282, 1995.

- GOULD, F.; MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A.; ANDERSON, A.; FERRÉ, J.; SILVA, F.J.; MOAR, W.J. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 89, p. 7986-7990, 1992.
- GOULD, F.; ANDERSON, A.; JONES, A.; SUMERFORD, D.; HECKEL, D.G.; LOPEZ, J.; MICINSKI, S.; LEONARD, R.; LASTER, M. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 89, p. 3519-3523, 1997.
- GRIEGO, V.M.; MOFFETT, D.; SPENCE, K.D. Inhibition of active  $K^+$  transport in the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut after ingestion of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. **Journal of Insect Physiology**, v. 25, p. 283-288, 1979.
- GRINGORTEN, J.L.; MILNE, R.E.; FAST, P.G.; SOHI, S.S.; VAN FRANKENHUYZEN, K. Suppression of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin activity by low alkaline pH. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, p. 47-52, 1992.
- GROCHULSKI, P.; MASSON, L.; BORISOVA, S.; PUSZTAI-CAREY, M.; SCHWARTZ, J.L.; BROUSSEAU, R.; CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **Journal of Molecular Biology**, v. 254, p. 447-464, 1995.
- GUPTA, B.L.; DOW, J.A.T.; HALL, T.A.; HARVEY, W.R. Electron probe X-ray microanalysis of the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* crystal protein insecticide on ions and electrogenic  $K^+$ -transporting epithelium of the larval midgut in the lepidopteran, *Manduca sexta* *in vitro*. **Journal of Cell Science**, v. 74, p. 137-152, 1985.
- HAIDER, M.Z.; ELLAR, D.J. Functional mapping of an entomocidal  $\delta$ -endotoxin. Single amino acid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity and specificity on the protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 208, p. 183-194, 1989.
- HAIDER, M.Z.; ELLAR, D.J. Characterization of the toxicity and cytopathic specificity of a cloned *Bacillus thuringiensis* crystal protein using insect cell culture. **Molecular Microbiology**, v. 1, p. 59-66, 1987.
- HARVEY, W.R. Physiology of V-ATPases. **Journal of Experimental Biology**, v. 172, p. 1-17, 1992.
- HERRNSTADT, C.; SOARES, G.G.; WILCOX, E.R.; EDWARDS, D.L. A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects. **Bio/Technology**, v. 4, p. 305-308, 1986.
- HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 85, p. 7844-7848, 1988.
- HÖFTE, H.; DE GREVE, H.; SEURINCK, J.; JANSSENS, J.; MAHILLON, J.; AMPE, C.; VANDEKERKHOVE, J.; VANDERBRUGGEN, H.; VAN MONTAGU, M.; ZABEAU, M.; VAECK, M. Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner 1715. **European Journal of Biochemistry**, v. 161, p. 273-280, 1986.
- HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Reviews**, v. 53, p. 242-255, 1989.
- HUSSAIN, S.R.; ARONSON, A.I.; DEAN, D.H. Substitution of residues on the proximal side of Cry1A *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins affects irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 226, p. 8-14, 1996.
- IBARRA, J.; LOPEZ, J. Desarrollo de resistencia a *Bacillus thuringiensis*. **Agrociencia**, v. 31, p. 121-131, 1997.
- IHARA, H.; KURODA, E.; WADANO, A.; HIMENO, M. Specific toxicity of  $\delta$ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, p. 200-204, 1993.
- INDRASITH, L.S.; HORI, H. Isolation and partial characterization of binding proteins for immobilized delta endotoxin from solubilized brush border membrane vesicles of the silkworm, *Bombyx mori*, and the common cutworm, *Spodoptera litura*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 102 B, p. 605-610, 1992.
- JOHNSON, D.E.; MCGAUGHEY, W.H. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards indian meal moth larvae. **Current Microbiology**, v. 33, p. 54-59, 1996.
- KNIGHT, P.J.K.; CRICKMORE, N.; ELLAR, D.J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIAC delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. **Molecular Microbiology**, v. 11, p. 429-436, 1994.

- KNIGHT, P.J.K.; KNOWLES, B.H.; ELLAR, D.J. Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 17765-17770, 1995.
- KNIGHT, P.J.K.; ELLAR, D.J. N-acetyl-D-galactosamine is part of the receptor in insect gut epithelia that recognizes an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of London*, v.245, p.31-35, 1991.
- KNOWLES, B.H.; ELLAR, D.J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificity. *Biochemical and Biophysical Acta*, v. 924, p. 509-518, 1987.
- KNOWLES, B.H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. *Advances in Insect Physiology*, v.24, p.275-308, 1994.
- KOLLER, C.N.; BAUER, L.S.; HOLLINGWORTH, R.M. Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native  $\delta$ -endotoxin crystals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.184, p.692-699, 1992.
- KRIEG, A. Is the potential pathogenicity of bacilli for insects related to production of alpha-exotoxin? *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 18, p. 425-426, 1971.
- KRIEG, A.; HUGER, A. M.; LANGENBRUCH, G. A.; SCHNETTER, W. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer, gegenüber larven von coleopteren wirksamer pathotyp. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, v. 96, p.500-508, 1983.
- LECHNER, M.; KUPKE, T.; STEFANOVIC, S.; GÖTZ, F. Molecular characterization and sequence of phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*, v. 3, p. 621-626, 1989.
- LEE, M.K.; RAJAMOCHAN, F.; GOULD, F.; DEAN, D.H. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1A  $\delta$ -endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p.3836-3842, 1995 a.
- LEE, M.K.; YOUNG, B.A.; DEAN D.H. Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 216, p. 306-312, 1995b.
- LEE, M.K.; YOU, T.H.; YOUNG, B.A.; COTRILL, J.A.; VALAITIS, A.P.; DEAN, D.H. Aminopeptidase N purified from gypsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.2845-2849, 1996a.
- LEE, M.K.; YOU, T.H.; CURTISS, A.; DEAN, D.H. Involvement of two amino acid residues in the loop region of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin in toxicity and binding to *Lymantria dispar*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.229, p.139-146, 1996b.
- LERECLUS, D.; BOURGOUIN, C.; LECADET, M.M.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Role, Structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: ISSAR SMITH, R.; SLEPECKY, A.; SETLOW, P., ed. *Regulation of prokaryotic development*. Washington: American Society for Microbiology, 1989.
- LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M.M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S. *Bacillus thuringiensis*. an environmental biopesticide: theory and practice. New York: John Wiley, 1993. 311p.
- LEVINSON, B. L.; KASYAN, K. J.; CHIU, S. S.; CURRIER, S.; GONZÁLEZ JR., J. M. Identification of b-exotoxin production, plasmids encoding b-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. *Journal of Bacteriology*, v. 172, p.3172-3179, 1990.
- LI, J.; CARROLL, J.; ELLAR, D.J. Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, v.353, p.815-821, 1991.
- LI, J. Bacterial toxins. *Current Opinion in Structural Biology*, v.2, p.545-556, 1992.
- LIANG, Y.; PATEL, S.S.; DEAN, D.H. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA  $\delta$ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, v.270, p.24719-24724, 1995.
- LIEBIG, B.; STETSON, D.L.; DEAN, D.H. Quantification of the effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on short-circuit current in the midgut of *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, v. 41, p. 17-22, 1995.
- LORENCE, A.; DARSZON, A.; DÍAZ, C.; LIÉVANO, A.; QUINTERO, R.; BRAVO, A.  $\delta$ -Endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Letters*, v.360, p.217-222, 1995.

- LORENCE, A.; DARSZON, A.; BRAVO, A. The pore formation activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes depends on the presence of aminopeptidase N. **FEBS Letters**, v. 414, p. 303-307, 1997.
- LU, H.; RAJAMOHAN, F.; DEAN, D.H. Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin CryIAa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 5554-5559, 1994.
- LU, Y.-J.; ADANG, M.J. Conversion of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac-binding aminopeptidase to a soluble form by endogenous phosphatidylinositol phospholipase C. **Insect Biochemical and Molecular Biology**, v. 26, p. 33-40, 1996.
- LUO, K.; LU, Y.J.; ADANG, M.J. A 106kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1C  $\delta$ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. **Insect Biochemical and Molecular Biology**, v. 26, p. 783-791, 1996.
- LUO, K.; TABASHNIK, B.E.; ADANG, M.J. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to aminopeptidase in susceptible and resistant diamondback moths *Plutella xylostella*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1024-1027, 1997.
- MARTENS, J.W.M.; VISSER, B.; VLAK, J.M.; BOSCH, D. Mapping and characterization of the entomocidal domain of the *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) protoxin. **Molecular and General Genetics**, v.247, p.482-487, 1995.
- MARTIN, F.G.; WOLFERSBERGER, M.G. *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin and larval *Manduca sexta* midgut brush-border membrane vesicles act synergistically to cause very large increases in the conductance of planar lipid bilayers. **Journal of Experimental Biology**, v. 198, p.91-96, 1995.
- MASSON, L.; MAZZA, A.; BROUSSEAU, R. Stable immobilization of lipid vesicles for kinetic studies using surface plasmon resonance. **Analytical Biochemistry**, v.218, p.405-412, 1994.
- MASSON, L.; MAZZA, A.; BROUSSEAU, R.; TABASHNIK, B. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* toxin binding with brush border membrane vesicles from susceptible and resistant larvae of *Plutella xylostella*. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p. 11887-11896, 1995a.
- MASSON, L.; LU, Y.J.; MAZZA, A.; BROUSSEAU, R.; ADANG, M.J. The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p. 20309-20315, 1995 b.
- McGAUGHEY, W.H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, v. 229, p. 193-195, 1985
- McGAUGHEY, W. H.; M.E. WHALON, Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins, **Science**, v. 258, 1451-1455, 1992.
- McGAUGHEY, W.H; BEEMAN, R.W. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of the indian meal moth and almond moth (Lep.: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, v.81, p.28-33, 1988.
- MOAR, W.J.; PUSZTAI-CAREY, M; VAN FAASSEN, H.; BOSCH, D.; FRUTOS, R.; RANG, C.; LUO, K.; ADANG, M.J. Development of *Bacillus thuringiensis* Cry1C resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.2086-2092, 1995.
- MONNERAT, R. G. Interrelations entre la teigne des crucifères, *Plutella xylostella*, son parasitoïde *Diadegma* sp. et la bactérie entomopathogène *Bacillus thuringiensis* Berliner. Montpellier: Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 1995. 160 p. Thèse de Doctorat.
- MÜLLER-COHN, J.; CHAUFaux, J.; BUISSON, C.; GILOIS, N.; SANCHIS, V.; LERECLUS, D. *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to Cry1c and cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal toxins. **Journal of Economic Entomology**, v.89, p.791-797, 1996.
- NISHIMOTO, T.; YOSHISUE, H.; IHARA, K.; SAKAI, H.; KOMANO, T. Functional analysis of block 5, one of the highly conserved amino acid sequences in the 130-kDa Cry1VA protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEBS Letters**, v. 348, p.249-254, 1994.
- ODDOU, P.; HARTMANN, H.; GEISER, M. Identification and characterization of *Heliothis virescens* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. **European Journal of Biochemistry**, v. 202, p. 676-680, 1991.
- ODDOU, P.; HARTMANN, H.; RADECKE, F.; GEISER, M. Immunologically unrelated *Heliothis* sp. and *Spodoptera* sp. midgut membrane-proteins bind *Bacillus thuringiensis* CryIA(b)  $\delta$ -endotoxin. **European Journal of Biochemistry**, v.212, p.145-150, 1993.

- OPPERT, B.; KRAMER, K.J.; BEEMAN, R.W.; JOHNSON, D.; McGAUGHEY, W.H. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Biological Chemistry*, v.272, p.23473-23476, 1997.
- OPPERT, B.; KRAMER, K.J.; JOHNSON, D.; MACINTOSH, S.C.; McGAUGHEY, W.H. Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.198, p.940-947, 1994.
- PARKER, M.W.; PATTUS, F. Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins. *TIBS*, v.18, p.391-395, 1993.
- PERCY, J.; FAST, P.G. *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.41, p.86-98, 1983.
- PIETRANTONIO, P.V.; GILL, S.S. *Bacillus thuringiensis* endotoxins: action on the insect midgut. In: LEHANE, M.J.; BILLINGSLEY, P.F., ed. *Biology of the insect midgut*. London: Chapman & Hall, 1996. p.345-372.
- RAJAMOCHAN, F.; ALCANTARA, E.; LEE, M.K.; CHEN, X.J.; CURTISS, A.; DEAN, D.H. Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb  $\delta$ -endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, v.177, p.2276-2282, 1995.
- RAJAMOCHAN, F.; COTRILL, J.A.; GOULD, F.; DEAN, D.H. Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* CryIAb  $\delta$ -endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *Journal of Biological Chemistry*, v.271, p.2390-2396, 1996a.
- RAJAMOCHAN, F.; ALZATE, O.; COTRILL, J.; CURTISS, A.; DEAN, D.H. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: mutations at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity towards gypsy moth larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 93, p. 14338-14343, 1996 b.
- RAVOAHANGIMALALA, O.; CHARLES, J.F.; SCHOELLER-RACCAUD, J. Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* toxin in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). *Research Microbiology*, v.44, p.271-278, 1993.
- SACCHI, V.F.; PARENTI, P.; HANOZET, G.M.; GIORDANA, B.; LÜTHY, P.; WOLFERSBERGER, M.G. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits  $K^+$  gradient dependent-amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. *FEBS Letters*, v.204, p.213-218, 1986.
- SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; MENOU, G.; CHAUFAX, J.; LECADET, M.M. Multiplicity of  $\delta$ -endotoxin genes with different insecticidal specificities in *B. thuringiensis aizawai* 7.29. *Molecular Microbiology*, v. 2, p. 393-404, 1988.
- SANGADALA, S.; WALTERS, F.W.; ENGLISH, L.H.; ADANG, M.J. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryI(Ac) toxin binding and  $^{86}Rb^+ - K^+$  efflux *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, v.269, p.10088-10092, 1994.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.62, n.3, p.775-806, 1998.
- SCHWARTZ, J.L.; GARNEAU, L.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R. Early response of cultured lepidopteran cells to exposure to  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: involvement of calcium and anionic channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1065, p.250-260, 1991.
- SCHWARTZ, J.L.; GARNEAU, L.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R.; ROUSSEAU, E. Lepidopteran-specific  $\delta$ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *Journal of Membrane Biology*, v.132, p.53-62, 1993.
- SCHWARTZ, J.L.; LU, Y.J.; SOEHNLEIN, P.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L.; LAPRADE, R.; ADANG, M. *Manduca sexta* midgut receptors for *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxins affect ion channels formed by the insecticidal proteins in planar lipid bilayers. *Biophysical Journal*, v.70, p.195, 1996.
- SCHWARTZ, J.L.; JUTEAU, M.; GROCHULSKI, P.; CYGLER, M.; PRÉFONTAINE, G.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L. Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Letters*, v.410, p.397-402, 1997.
- SEBESTA, K.; FARKAS, J.; HORSKÁ, K.; VANKOVÁ, J. Thuringiensin, the Beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. In: BURGESS, H.D., ed. *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. London: Academic Press, 1981. p.249-281.

- SHELTON, A.M.; ROBERTSON, J.L.; TANG, J.D.; PEREZ, C.; EIGENBRODE, S.D.; PREISLER, H.K.; WILSEY, W.K.; COOLEY, R.L. Resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. *Journal of Economic Entomology*, v.86, p.697-705, 1993.
- SILVA-WERNECK, J.O. Caracterização da estirpe S93 de *Bacillus thuringiensis* subs. *kurstaki* efetiva contra a lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*). Brasília: Universidade de Brasília-Departamento de Biologia Celular, 1997. 143p. Dissertação de Mestrado.
- SIMS, S.R.; T.B. STONE. Genetic basis of tobacco budworm resistance to an engineeringp*Seudomonas fluorescens* expressing the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* *kurstaki*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 57, p. 206-210, 1991.
- SLATIN, S.L.; ABRAMS, C.K.; ENGLISH, L. d-Endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.169, p.765-772, 1990.
- SMEDLEY, D.P.; ELLAR, D.J. Mutagenesis of three surface-exposed loops of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin reveals residues important for toxicity, receptor recognition and possibly membrane insertion. *Microbiology*, v.142, p.1617-1624, 1996.
- STRIZHOV, N.; KELLER, M.; KONEZ-KÁLMÁN, Z.; REGEV, A.; SNEH, B.; SCHELL, J.; KONCZ, C.; ZILBERSTEIN, A. Mapping of the entomocidal fragment of *Spodoptera*-specific *Bacillus thuringiensis* toxin CryIC. *Molecular & General Genetics*, v. 253, p.11-19, 1996.
- SZABO, A.; STOLZ, L.; GRANZOW, R. Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). *Current Opinion in Structural Biology*, v. 5, p.699-705, 1995.
- TABASHNIK, B.E.; CUSHING, N.L.; FINSON, N.; MARSHALL, J.W. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 83, p. 1671-1676, 1990.
- TABASHNIK, B. E.; FINSON, N.; GROETERS, F.R.; MOAR, W.J.; JOHNSON, M. W.; LUO, K.; ADANG, M.J. Reversal resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 91, p.4120-4124, 1994.
- TABASHNIK, B. E.; FINSON, N.; SCHWARTZ, J. M.; CAPRIO, M. A.; JOHNSON, M. W.; Diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis* in Hawaii. In: TALEKAR N. S. *Management of diamondback moth and other crucifer pests* : Proceedings of the second International Workshop, 11-14 December 1990. Tainan, Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Center, 1992. p.175-184.
- TABASHNIK, B. E.; LUI, Y.B.; FINSON, N.; MASSON, L.; HECKEL, D.G. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 94, p.1640-1644, 1997.
- TABASHNIK, B. E.; MALVAR, T.; LUI, Y.B.; FINSON, N.; BORTHAKUR, D.; SHIN, B.S.; PARK, S.H.; MASSON, L.; DE MAAG, R.A.; BOSCH, D. Cross resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 2839-2844, 1996.
- TANG, J.D.; SHELTON, A.M.; VAN RIE, J.; DE ROECK, S; MOAR, W.; ROUSH, R.; PEFFEROEN, M. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 564-569, 1996.
- THIE, N.M.R.; HOUSEMAN, J.G. Identification of cathepsin B, D and H in the larval midgut of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Biochemistry*, v. 20, p. 313-318, 1990.
- UEMURA, T.; IHARA, H.; WADANO, A.; HIMENO, M. Fluorometric assay of potential change of *Bombyx mori* midgut brush border membrane induced by  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v.56, p.1976-1979, 1992.
- VACHON, V.; PARADIS, M.J.; MARSOLAIS, M.; SCHWARTZ, J.L.; LAPRADE, R. Ionic permeabilities induced by *Bacillus thuringiensis* in Sf9 cells. *Journal of Membrane Biology*, v. 148, p.57-60, 1995.
- VADLAMUDI, R.K.; WEBER, E.; JI, T.H.; BULLA, L.A. JR. 1995. Cloning and expresion of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry* , v. 270, p. 5490-5494, 1995.
- VALAITIS, A.P.; LEE, M.K.; RAJAMOHAN, F.; DEAN, D.H. Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIA(c)  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemical and Molecular Biology*, v.25, p.1143-1151, 1995.

- VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; HÖFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. *European Journal of Biochemistry*, v. 186, p.239-247, 1989.
- VAN RIE, J.; MCGAUGHEY, W.H.; JOHNSON, D.E.; BARNETT, B.D.; VAN MELLAERT, H. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, v. 247, p. 72-74, 1990.
- VAN RIE, J. Insect control with transgenic plants: resistance proof ? *Tibtech*, v. 9, p.177-179, 1991.
- VON TERSCH, M.A.; SLATIN, S.L.; KULESZA, C.A.; ENGLISH, L.H. Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIB2 and CryIIIB2 domain I peptide. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 3711-3717, 1994.
- WABIKO, H.; RAYMOND, K.C.; BULLA, AL. JR. *Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. *DNA*, n. 5, p. 305-314, 1986.
- WABIKO, H.; YASUDA, E. *Bacillus thuringiensis* protoxin: location of toxic border and requirement of non-toxic domain for high-level *in vivo* production of active toxin. *Microbiology*, v. 141, p. 629-639, 1995.
- WALTERS, F.S.; SLATIN, S.L.; KULESZA, C.A.; ENGLISH, L.H. Ion channel activity of N-terminal fragments from CryIA(c)  $\delta$ -endotoxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 196, p.921-926, 1993.
- WALTERS, F.S.; ENGLISH, L.H. Toxicity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins towards the potato aphid in an artificial diet bioassay. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 77, p.211-216, 1995.
- WELTENS, R.; PEFFEROEN, M.; STEELS, P.; VAN KERKHOVE, E. Electrophysiological measurements and cable analysis of coleopteran midgut epithelium: effect of ionic changes and of an insecticidal product. *Archives Internationales de Physiologie et Biochimie*, v. 100, p. 6, 1992.
- WHITELEY, H. R.; SCHNEPE, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Microbiology*, v. 40, p. 549-576, 1986.
- WIDNER, W.R.; WHITELEY, H.R. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. *Journal of Bacteriology*, v. 171, p. 965-974, 1989.
- WOLFERSBERGER, M.G. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. *Experientia*, v. 46, p. 475-477, 1990.
- WOLFERSBERGER, M.G. V-ATPase-energized epithelia and biological insect control. *Journal of Experimental Biology*, v. 172, p. 377-386, 1992.
- WRIGHT, D. J.; IQBAL, M.; GRANERO, F.; FERRÉ, J. A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only in part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, p. 1814-1819, 1997.
- WU, D.; ARONSON, A.I. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin involved in toxicity and specificity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, p. 2311-2317, 1992.
- WU, S. J.; DEAN, D.H. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIIIA  $\delta$ -endotoxin. *Journal of Molecular Biology*, v. 255, p. 628-640, 1996.
- YAOI, K.; KADOTANI, T.; KUWANA, H.; SHINKAWA, A.; TAKAHASHI, T.; IWAHANA, H.; SATO, R. Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *European Journal of Biochemistry*, v. 246, p. 652-657, 1997.
- YAMAMOTO, T.; MCLAUGHLIN, R. E. Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* toxic to the mosquito larva, *Aedes taeniorhynchus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 103, p. 414-421, 1981.
- YUNOVITZ, H.; YAWETZ, A. Interaction between the  $\delta$ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* spp. *entomocidus* and liposomes. *FEBS Letters*, v. 230, p. 105-108, 1988.
- ZHANG, J.; HODGMAN, T.C.; KRIEGER, L.; SCHNETTER, W. Y.; SCHAIRER, H.V. Cloning and analysis of the first cry gene from *Bacillus popilliae*. *Journal of Bacteriology*, v. 179, p. 4336-4341, 1997.

# 8

## UTILIZAÇÃO DO *BACULOVÍRUS* NO CONTROLE DA LAGARTA-DO-CARTUCHO DO MILHO, *SPODOPTERA FRUGIPERDA*

Ivan Cruz

### INTRODUÇÃO

No Brasil, a *Spodoptera frugiperda* (Smith), conhecida como lagarta-do-cartucho, é uma praga-chave da cultura do milho (*Zea mays* L.) e de outras culturas anuais (Cruz, 1995a). Larvas de primeiro instar geralmente consomem os tecidos verdes de um lado da folha, deixando a epiderme membranosa do outro lado intacta. Larvas mais desenvolvidas começam a fazer orifícios na folha, destruindo o cartucho da planta, podendo, inclusive, provocar a morte em plantas recém-nascidas (Cruz 1995b).

As perdas ocasionadas pela praga à cultura do milho são, geralmente, de maneira indireta, ou seja, através dos danos nas folhas, sem, no entanto, matar a planta, e variam com o estágio de desenvolvimento e do tipo de milho (Carvalho, 1970; Cruz, 1980; Cruz & Turpin, 1982, 1983; Cruz et al., 1996, 1999a). Estima-se que os danos provocados por essa praga ocasionam prejuízos acima de 400 milhões de dólares anuais à produção brasileira de milho (Cruz, 1999).

O controle de *S. frugiperda* na cultura do milho é baseado em produtos químicos, empregados quando aparecem os primeiros sintomas de danos na cultura. Entretanto, devido aos problemas acarretados pelo uso constante desses

produtos, especialmente em relação ao desenvolvimento de resistência e à redução da ocorrência de inimigos naturais (Cruz, 1997, 1999), ênfase tem sido dada a medidas de controle mais ecológicas (Cruz 1995a,b). Entre os agentes de controle biológico, os inseticidas à base de vírus, que são, na maioria, do grupo *Baculovirus*, têm sido apontados como os de maior potencial para o desenvolvimento como bioinseticidas, devido à especificidade, à alta virulência ao hospedeiro e à maior segurança proporcionada a vertebrados (Tanada & Reiner 1962, Ignoffo et al. 1965, Allen et al. 1966, Whitlock 1977, Klein & Podoler 1978, Burghes et al. 1980, Moscardi 1986). Para a lagarta-do-cartucho, têm-se estudado dois tipos de *Baculovirus*, ou seja, o vírus de granulose e o vírus de poliedrose nuclear. No entanto, este último tem sido apontado como de maior potencial de uso contra lagartas de *Spodoptera* spp. (Young & Hamm 1966, Garcia 1979, Gardner & Fuxa 1980, Hamm & Hare 1982, Fuxa 1982, Gardner et al. 1984, Moscardi & Kastelic 1985, Valicente et al. 1989, Valicente & Cruz 1991, Jones et al. 1994, Hamm & Carpenter 1997). As propriedades de alguns vírus de poliedrose nuclear, isolados de *S. frugiperda* (VPNSf), já foram estudadas tanto no exterior (Harrap et al. 1977), como no Brasil (Gerk et al., 1997).

O vírus é composto internamente pelo ácido nucléico, DNA, que representa a sua porção biológica do vírus. Envolvendo o DNA, existem proteínas compostas de subunidades denominadas capsômeros, as quais formam uma capa chamada capsídeo. O conjunto formado pelo capsídeo e ácido nucléico é conhecido por nucleocapsídeo (Alves, 1986). Este é envolvido por um envelope ou membrana, que é normalmente construído a partir do material celular do inseto-hospedeiro, formando a partícula infectiva do vírus, denominada vírion. Uma membrana protéica pode envolver um ou mais nucleocapsídeos, que, por sua vez, são envolvidos por uma matriz de natureza protéica, formando uma estrutura conhecida por corpos de inclusão poliédrica (CIP).

O vírus de poliedrose nuclear de *Spodoptera frugiperda* (VPNSf) é específico, isto é, só tem ação sobre a lagarta-do-cartucho. A larva é a fase mais suscetível à sua infecção. Em condições naturais, a praga é infectada mais comumente por via oral ao ingerir o alimento (folhas de milho) contaminado; no

entanto, é possível também a infecção através dos ovos, dos orifícios de respiração do corpo (espiráculos), ou mesmo através de insetos parasitóides contendo vírus. Uma vez ingerido, os corpos de inclusão poliédrica, encontrando condições alcalinas existentes no mesêntero são dissolvidos, liberando os vírions. O vírus começa a se multiplicar nos núcleos das células dos tecidos, espalhando-se por todo o corpo do inseto (tecido adiposo, epidérmico, matriz traqueal e mesmo glândulas salivares, tubo de Malpighi e células sangüíneas), provocando sua morte, geralmente de 6 a 8 dias após a ingestão. Uma lagarta infectada pelo vírus de poliedrose nuclear ingere apenas 7% do alimento normalmente ingerido por uma lagarta sadia (Valicente, 1988).

Os principais sintomas da doença são caracterizados pelo aparecimento de manchas no tegumento, amarelecimento e aparência oleosa da pele. Posteriormente, as lagartas perdem a mobilidade e tornam-se escuras, devido à desintegração dos tecidos internos. Gradativamente, elas param de se alimentar e dirigem-se para as partes mais altas da planta, ficando dependuradas de cabeça para baixo, fixadas à planta pelas patas traseiras. A partir daí, começam a soltar pela cavidade bucal um líquido rico em poliedros, os quais acabam sendo fonte de inócuo para novas contaminações do hospedeiro, que se encontra no cartucho da planta.

O tempo para o aparecimento dos primeiros sintomas da doença, bem como a morte do inseto infectado, são influenciados pela idade do hospedeiro em que ocorreu a infecção, pela quantidade ingerida do vírus, pela virulência do patógeno e pelas condições climáticas durante o período em que o inseto ficou infectado. Como conseqüência, esses fatores têm efeitos marcantes sobre a rapidez da ação do vírus, quando ele é aplicado no campo. Além disso, outros fatores, como a irradiação solar, a temperatura, a umidade, o hábito da praga, os equipamentos e a tecnologia para sua aplicação também influenciam na eficiência e na estabilidade do vírus, antes deste ser ingerido pela praga (Fuxa, 1991; Hamm et al., 1994).

## Variabilidade genética

Estudos conduzidos com diferentes isolados de vírus mostram que existe variabilidade entre eles, especialmente em relação à virulência, indicando a possibilidade de se obter ganhos nos índices de mortalidade da praga de acordo com a origem do vírus (Valicente & Cruz, 1992a); no entanto, esse aumento depende muito da idade da lagarta por ocasião da ingestão do vírus (Tabela 1).

TABELA 1. Mortalidade da lagarta-do-cartucho com diversos isolados de vírus (Valicente e Cruz 1992a).

Origem do vírus	Tipo de vírus <sup>1</sup>	Idade da lagarta (dias)	Mortalidade (%)
Patos de Minas, MG	VPN	7	91,7
Sertaneja, PR	VPN	7	58,3
Carmo do Paraíba, MG	VG	7	77,1
Patos de Minas, MG	VG	7	87,5
Patos de Minas, MG	VPN	6	97,9
Sertaneja, PR	VPN	6	85,1

<sup>1</sup> VPN = Vírus de Poliedrose Nuclear; VG = Vírus de Granulose.

## Sensibilidade de lagartas

### Efeito de doses

Bioensaios realizados em laboratório (temperatura ambiente de 25 ± 3°C), com o objetivo de estimar a melhor dose do vírus da poliedrose nuclear na mortalidade da lagarta-do-cartucho, foram conduzidos por Valicente & Cruz (1992b). Lagartas sadias com sete dias de idade (segundo instar) foram alimentadas com doses do vírus variando de  $2 \times 10^3$  a  $2 \times 10^6$ CIP, veiculadas juntamente com folhas de milho, por um período de 48 horas, findo o qual foram transferidas para dieta artificial. A mortalidade larval ultrapassou 71%, a partir de uma dose de  $2 \times 10^5$ CIP, atingindo a totalidade na dose de  $2 \times 10^6$ CIP, sendo esta última, portanto, a dose recomendada para o controle efetivo da praga.

### Efeito da idade da lagarta

A taxa de mortalidade da lagarta-do-cartucho é influenciada tanto pela dose do vírus, como pela idade da lagarta no dia em que foi infectada. Para

doses acima de  $4 \times 10^6$  CIP/lagarta, pode ser esperada uma mortalidade quase total em lagartas infectadas até sete dias de idade; no entanto, para lagartas maiores, começa a ocorrer redução na taxa de mortalidade (Figura 1). Essa queda é, inclusive, muito acentuada para doses inferiores a  $4 \times 10^6$  CIP/lagarta.

**Efeito de temperatura**

A temperatura pode influenciar tanto a taxa de mortalidade quanto o tempo médio para ocorrer a morte da lagarta infectada com o *Baculovirus*. Esta influência foi demonstrada por Valicente & Cruz (1992e), avaliando o efeito de três temperaturas fixas de 15, 26 e 30°C (fotofase semelhante de 12 horas) na infectividade da lagarta-do-cartucho com o *Baculovirus*, utilizando lagartas de sete dias de idade contaminadas pelo vírus veiculado em folhas de milho ( $3,8 \times 10^6$  CIP/ml). Não houve diferença significativa entre a mortalidade obtida, cuja média foi superior a 97,6% (Tabela 2). No entanto, quando as lagartas foram mantidas numa temperatura de incubação de 15°C, o pico de mortalidade ocorreu 12 dias após a infecção. Nas outras temperaturas, mais próximas àquelas observadas em condições de campo, a mortalidade ocorreu do quinto para o sexto dia após a infecção, não havendo diferença entre as duas temperaturas.

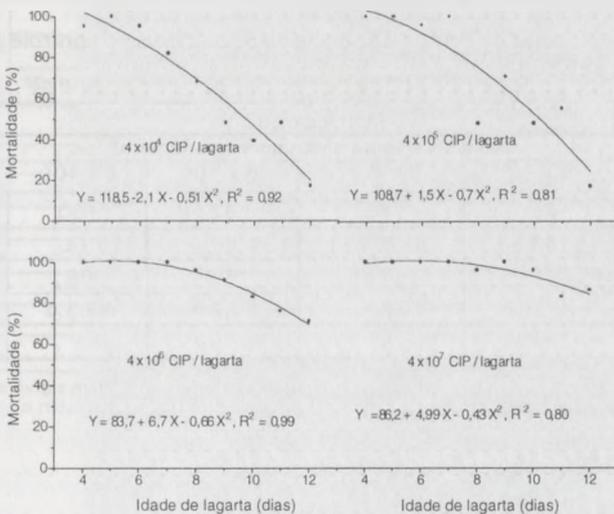


FIGURA 1. Relação entre idade de lagartas de *S. frugiperda* e mortalidade provocada por diferentes concentrações de *Baculovirus*.

TABELA 2. Efeito de três temperaturas de incubação no desempenho do *Baculovirus* ( $3,8 \times 10^6$  CIP/ml) sobre lagartas de *S. frugiperda*.

Temperatura (°C)	Mortalidade larval (%)	Tempo letal médio (dias)
15	98,1	12
26	98,9	6
30	95,7	6

Cruz & Valicente (1992c) estudaram o efeito da temperatura, variando também a dose do *Baculovirus*. Utilizaram lagartas de oito e nove dias de idade, individualizadas em copos de 50ml, às quais foram oferecidas, por um período de 24 horas, doses variando de  $6 \times 10^4$  a  $6 \times 10^7$  poliedros. Após esse período, foi adicionada, em cada copo, uma dieta artificial. Foram utilizadas três repetições, sendo cada uma representada por 24 lagartas, mantidas em incubadoras com temperatura de 20, 25 e 30°C, e fotofase de 12 horas. De maneira geral, a mortalidade das larvas aumentou com o aumento da temperatura. Quando foi oferecida a concentração de  $6 \times 10^7$  poliedros a cada larva, a mortalidade foi de 99,0% (Tabela 3). Em média, as lagartas morreram depois de 11, 8 e 6 dias após a ingestão do vírus, quando mantidas na temperatura de 20, 25 e 30°C, respectivamente.

TABELA 3. Efeito da temperatura sobre a eficiência do *Baculovirus* no controle de *S. frugiperda* (Cruz & Valicente 1992c).

Temperatura (°C)	Mortalidade (%) <sup>1</sup>				Média
	Concentração do vírus (poliedros/lagarta)				
	$6 \times 10^4$	$6 \times 10^5$	$6 \times 10^6$	$6 \times 10^7$	
20	29	63	67	100	64,8 A
25	53	55	86	100	73,4 A
30	46	72	89	98	76,2 A
Média	42,7 a	63,3 b	80,7 c	99,3 d	
CV (%)	20,4				

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente entre si, segundo o teste de Duncan (p ≤ 0,05).

## Efeito da formulação pó-molhável

Experimentos iniciais com a formulação pó-molhável foram conduzidos por Cruz & Valicente (1992a) em laboratório, inoculando-se lagartas de *S. frugiperda*, com idades variando de cinco a dez dias. O *Baculovirus* formulado, contendo  $2,5 \times 10^9$  poliedros por grama, suspenso em 100ml de solução tampão, foi oferecido às lagartas na base de 0,004ml da suspensão, isto é,  $1 \times 10^6$  poliedros/lagarta. Essa quantidade foi colocada sobre uma seção de folha de milho de um centímetro de diâmetro, em copos de plástico de 50ml, contendo individualmente uma lagarta de cada idade correspondente. As lagartas foram mantidas em sala a 25°C. Após um período de 24 horas, foi adicionada a cada copo uma dieta artificial sem vírus. Daí em diante, os insetos foram distribuídos em incubadoras, com temperaturas fixas de 25 e 30°C e fotofase de 12 horas. Os resultados (Tabela 4) indicaram uma maior mortalidade na temperatura mais baixa, ou seja, 25°C. Nas duas temperaturas, tanto a mortalidade quanto o período letal (Figura 2) tiveram relação linear com o aumento da idade da lagarta.

TABELA 4. Efeito do *Baculovirus* formulado em pó-molhável sobre lagartas de *S. frugiperda* de diferentes idades, em duas temperaturas (Cruz & Valicente 1992a).

Idade das lagartas (dias)	Temperatura (°C) <sup>1</sup>			
	25		30	
	Mortalidade (%)	Período letal (dias)	Mortalidade (%)	Período letal (dias)
5	99 A	6.8 B	93 A	5.0 B
6	85 B	7.4 B	86 A	5.6 B
7	81 B	7.5 B	93 A	5.4 B
8	64 C	8.4 AB	57 B	7.0 AB
9	67 C	8.9 AB	43 B	9.0 A
10	46 D	10.0 A	44 B	8.2 A
Média	73	8.2	64	6.7
CV (%)	7.4	20.0	8.8	22.2

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente entre si, segundo o teste de Duncan (p ≤ 0,05).

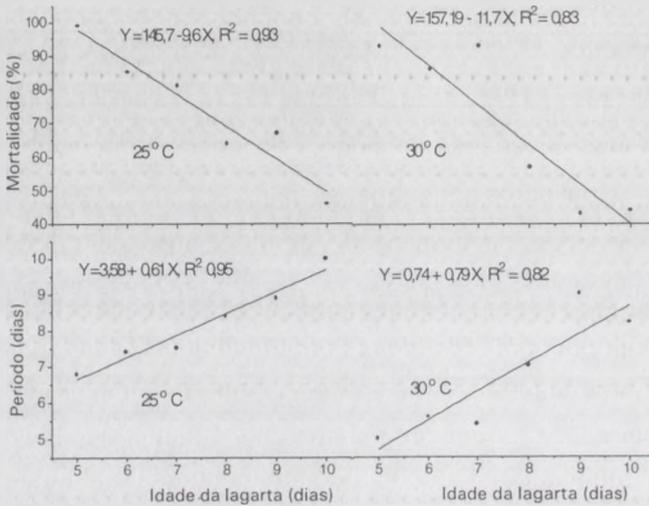


FIGURA 2. Retas ajustadas de mortalidade (%) e período letal (dias) em relação a lagartas de *S. frugiperda*, de diferentes idades, sujeitas ao *Baculovirus* formulação pó-molhável.

## Armazenamento do *Baculovirus*

Um dos problemas relacionados com a perda de eficiência do *Baculovirus* diz respeito à condição de armazenamento. Valicente & Cruz (1992c,d) conduziram estudos com o objetivo de determinar a perda de viabilidade do *Baculovirus* na mortalidade de *S. frugiperda*, em uma solução de vírus armazenada em temperatura ambiente ou sujeita a altas temperaturas. No primeiro ensaio, uma solução contendo  $2 \times 10^6$  CIP/ml foi retirada do armazenamento a baixa temperatura (*freezer*) e deixada em temperatura ambiente ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ). Em diferentes intervalos de tempo, larvas de seis dias de idade foram alimentadas com folhas de milho contendo o vírus, por um período de 48 horas. Depois desse período, as larvas foram transferidas para dieta artificial e observadas diariamente. Os resultados (Figura 3) mostraram que a mortalidade diminuiu à medida que o tempo de exposição do vírus, fora do freezer, aumentou, porém com reduções mais significativas a partir de dez dias de armazenamento à temperatura ambiente, indicando que, para melhor conservação, devem-se manter as soluções do vírus em baixa temperatura, como aquelas encontradas dentro do freezer ou congelador de uma geladeira, o que já é relatado por vários autores.

No segundo ensaio, foi demonstrado que períodos curtos de alta temperatura praticamente não apresentam efeitos deletérios ao vírus. Mesmo colocando uma solução de vírus numa temperatura de 45 ou até 50°C, por duas horas, a mortalidade média provocada em lagartas de seis dias de idade, alimentadas com o vírus veiculado a folhas de milho, manteve-se acima de 96,9% (Valicente & Cruz, 1992d).

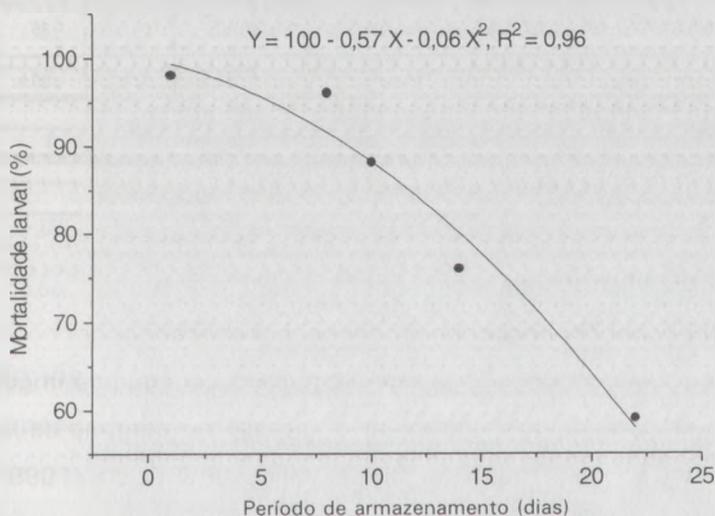


FIGURA 3. Mortalidade da lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda* provocada por uma solução de *Baculovirus* armazenada em temperatura ambiente até por 22 dias.

Cruz & Valicente (1992b) compararam dois lotes de *Baculovirus* formulado em pó-molhável, armazenados em sacos de plástico transparente deixados em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), um deles por um período de 30 e o outro por 60 dias, com outra formulação líquida (macerado de lagartas) e mantida a baixa temperatura, no freezer ( $-15^\circ\text{C}$ ), utilizando-se lagartas com idades variando de seis a oito dias. De acordo com a Tabela 5, o *Baculovirus* formulado em pó-molhável apresentou-se tão estável quanto o vírus preparado apenas por maceração da lagarta, pois, mesmo deixado em condição ambiente por um período de até 60 dias, não perdeu a viabilidade, provocando mortalidade acima de 90%.

TABELA 5. Eficiência da formulação pó-molhável do *Baculovirus* sobre lagartas de *S. frugiperda*, após diferentes períodos e condições de armazenamento à temperatura ambiente (Cruz & Valicente, 1992b).

Formulação <sup>1</sup>	Dose (CIP/lagarta)	Armazenamento		Mortalidade (%) <sup>2</sup>			
				Idade da lagarta (dias) <sup>3</sup>			
		Temperatura (°C)	Tempo (dias)	6	7	8	Média
PM	2,1 x 10 <sup>6</sup>	25	60	94	88	98	93,3 A
PM	7,6 x 10 <sup>6</sup>	25	30	100	95	87	94,0 A
Macerado	8,8 x 10 <sup>6</sup>	-15	30	100	94	85	93,0 A
Média				98 a	92 b	90 b	

<sup>1</sup> PM = pó-molhável.

<sup>2</sup> Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente entre si, segundo o teste de Duncan (p < 0,05).

<sup>3</sup> No dia da infecção com o vírus.

## Resultados de campo

### Aplicação via água de irrigação

A aplicação de vírus de poliedrose nuclear via água de irrigação já foi realizada nos Estados Unidos, com relativo sucesso no controle da lagarta-do-cartucho (Hamm & Hare, 1982). No Brasil, Valicente & Costa (1995) também estudaram a eficiência do bioinseticida aplicado por um equipamento acoplado à rede de irrigação (Costa & Brito, 1988). Foram conduzidos dois experimentos, sendo, no primeiro, utilizadas diferentes lâminas de água (3, 5 e 7mm) e também diferentes doses do vírus, obtidas de macerados de lagartas infectadas (Tabela 6). No segundo experimento, foi utilizada apenas uma lâmina de água (6mm) para veicular o produto formulado em pó-molhável. No primeiro experimento, independente da lâmina de água aplicada, não houve diferença significativa na mortalidade da lagarta-do-cartucho causada por *Baculovirus*. Entretanto, no segundo experimento, a mortalidade foi diretamente proporcional à dose do produto (Tabela 6). Deve ser considerado, inclusive, que a mortalidade média nesse segundo experimento foi maior do que aquela obtida no primeiro, mesmo utilizando doses menores. Provavelmente, tais diferenças sejam devidas à maior estabilidade do vírus formulado em pó-molhável. Os resultados desses experimentos evidenciam que a aplicação via água de irrigação pode ser uma

alternativa no manejo da praga, especialmente em áreas onde o sistema irrigado já é uma prática comum, seja através da irrigação convencional ou mesmo através do uso de pivô central.

TABELA 6. Mortalidade de *S. frugiperda* por *Baculovirus* aplicado via água de irrigação (adaptado de Valicente & Costa, 1995).

Lâmina de água (mm)	Dose de <i>Baculovirus</i> (CIP/ha)	Mortalidade de lagartas (%) <sup>1</sup>
<b>Experimento 1 (formulação líquida)</b>		
3	$3,0 \times 10^{12}$	77,5 A
5	$3,0 \times 10^{13}$	79,0 A
7	$2,8 \times 10^{12}$	78,8 A
CV		12,3%
<b>Experimento 2 (formulação pó-molhável)</b>		
6	$2,0 \times 10^{11}$	62,6 B
	$10,0 \times 10^{11}$	90,7 A
	$2,0 \times 10^{12}$	89,4 A
CV		18,5%

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra, para cada experimento, não diferem significativamente entre si, segundo o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

## Aplicação via trator

Apesar da viabilidade do uso do *Baculovirus* via água de irrigação, no Brasil ainda predomina o cultivo de milho convencional, isto é, dependente da precipitação natural. Nesses casos, a aplicação de medidas de controle é geralmente realizada através do pulverizador costal ou do pulverizador acoplado ao trator. Portanto, atualmente predomina no Brasil o controle da lagarta-do-cartucho através de pulverizações tratorizadas. Considerando esse aspecto, Cruz et al. (1997) avaliaram diferentes concentrações da formulação pó-molhável do vírus de poliedrose nuclear aplicadas em suspensão aquosa, através de um pulverizador acoplado a um trator ou através de um pulverizador costal manual. A mortalidade de lagartas variou de acordo com o equipamento de aplicação (Tabela 7). Na aplicação via trator, foi necessária uma dose de pelo menos  $2,5 \times 10^{12}$  corpos de inclusões poliédricas (CIP)/ha para se ter uma eficiência comparável à que se obteve com o pulverizador manual-costal (70,2%). Para esse tipo de pulverizador, pode-se usar  $2,5 \times 10^{11}$  CIP/ha, porém o efeito residual é curto (Tabela 8). Maior persistência é obtida com doses acima de  $1,25 \times 10^{12}$  CIP/ha (93,4% de mortalidade larval). Nos Estados Unidos, Hamm et al. (1994), aplicando

o *Baculovirus* na dose de  $3 \times 10^{12}$  CIP/ha, veiculando o produto com 246 litros de água por hectare, obtiveram apenas 58,9% de mortalidade provocada pelo vírus. Segundo esses autores, muitos fatores são importantes para garantir o sucesso no controle da lagarta-do-cartucho com o *Baculovirus*. O vírus precisa ser colocado onde a larva está se alimentando e numa concentração suficiente para que o inseto ingira uma dose letal. A mortalidade larval aumentou com o aumento da concentração do vírus até a dose máxima utilizada ( $7,41 \times 10^{12}$  CIP/ha). O aumento do volume de água, até o máximo avaliado de 936 litros por hectare, ajudou a colocar as partículas de vírus bem no interior do cartucho, local onde se encontra a praga.

TABELA 7. Mortalidade larval (%) de *S. frugiperda* causada por diferentes concentrações de *Baculovirus*, em três intervalos de amostragem após a pulverização (Cruz et al., 1997).

Doses (poliedros/ha)	Método de aplicação	Mortalidade larval (%) em diferentes períodos (dias) de amostragem <sup>1</sup>			
		3	6	9	Média
$2,50 \times 10^{11}$	Trator	30,5 d	35,7 c	31,2 bc	32,5 c
$1,25 \times 10^{12}$	Trator	42,1 c	41,5 c	47,8 ab	43,8 b
$2,50 \times 10^{12}$	Trator	63,9 b	62,3 b	55,7 ab	60,6 a
$5,00 \times 10^{12}$	Trator	65,4 b	79,4 a	60,3 a	68,3 a
$2,50 \times 10^{11}$	Costal	74,0 a	66,8 b	69,9 a	70,2 a
Testemunha		3,7 e	7,0 d	18,8 c	9,8 d
CV (%)		13,5	21,4	23,7	26,1

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

TABELA 8. Percentagem de mortalidade larval de *S. frugiperda* causada por diferentes concentrações de *Baculovirus*, aplicadas por pulverizador manual-costal e persistência do vírus em plantas de milho (Cruz et al., 1997).

Doses de <i>Baculovirus</i> (Poliedros/ha)	Mortalidade larval (%) <sup>1</sup>			
	Curativo	Residual de 1 dia	Residual de 2 dias	Residual de 3 dias
$2,50 \times 10^{11}$	90,5 B,a	71,5 B,ab	74,5 AB,ab	57,8 B,b
$1,25 \times 10^{12}$	97,3 A,a	92,9 A,a	96,3 A,a	87,3 A,a
$2,50 \times 10^{12}$	99,2 A,a	93,4 A,a	80,4 A,a	93,1 A,a
$1,25 \times 10^{13}$	97,8 A,a	100,0 A,a	95,9 A,a	100,0 A,a
$2,50 \times 10^{13}$	98,6 A,a	98,1 A,a	100,0 A,a	100,0 A,a
Testemunha	15,6 C,b	42,0 C,a	50,1 B,a	52,5 B,a
CV (%)	6,2	15,3	30,1	27,0

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, ou minúscula, na linha, não diferem significativamente entre si, segundo o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

## Distribuição do *Baculovirus* em diferentes partes da folha

Em função do hábito da lagarta de se alojar dentro do cartucho, é necessário que as aplicações sejam sempre dirigidas para essa parte da planta, visando a colocar o máximo de produto o mais próximo possível da praga. Com esse objetivo, Cruz & Valicente (1992e) realizaram pesquisas aplicando o *Baculovirus* através de um pulverizador costal com bico leque e pressão de 40PSI. Vinte e duas horas após a pulverização, houve coleta, na altura do cartucho, de plantas pulverizadas e não-pulverizadas, que foram trazidas para o laboratório, onde tiveram tratamentos diferentes. Foram separadas as três folhas mais internas do cartucho e cada uma foi dividida em três partes, sendo oferecida cada parte a lagartas de nove dias de idade, por 48 horas. Lagartas infectadas ou não, findo o período de alimentação na folha, foram transferidas para uma dieta artificial. Os resultados evidenciaram que, na base da folha, concentra-se a maior quantidade de vírus, pois a mortalidade larval foi alta, principalmente nas folhas centrais e na primeira folha (Tabela 9), o que é, em termos práticos, um fator positivo, pois, pelo comportamento da praga, ela se aloja exatamente entre essas folhas.

TABELA 9. Efeito da parte e da posição da folha de milho na eficiência do *Baculovirus* ( $7,4 \times 10^{12}$ CIP/hectare) sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda*.

Posição da folha	Parte da folha	Mortalidade (%) <sup>1</sup>	Período letal (dias) <sup>1</sup>
Central	Base	90 A	8.6 B
	Média	68 B	9.7 A
	Ponta	46 BC	8.6 B
Primeira	Base	100 A	7.6 C
	Média	83 A	8.8 B
	Ponta	25 C	10.5 A
Segunda	Base	63 B	9.3 AB
	Média	63 B	9.7 A
	Ponta	41 C	10.4 A

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, segundo o teste de Duncan (p ≤ 0,05).

## Efeito do estágio de desenvolvimento da planta, da dose e do intervalo de aplicação

Experimentos conduzidos por Cruz et al. (1999b) evidenciaram boa eficiência do *Baculovirus* quando aplicado sobre plantas de milho, nos estádios de seis a oito ou oito a dez folhas, para o controle de *S. frugiperda*, com um pulverizador costal-manual (Tabela 10). O vírus foi aplicado 24 horas após a infestação artificial, com dez larvas recém-nascidas/planta, usando variações de uma dose padrão de 50 gramas do produto formulado em pó-molhável ( $2,5 \times 10^{11}$  CIP/ha), aplicado de uma só vez ou com intervalo de uma semana. Numa primeira avaliação, realizada sete dias após a aplicação do vírus, obteve-se mortalidade larval mínima, de 79,2 a 97,2, quando a aplicação foi feita sobre plantas no estágio de 6 a 8 folhas. Numa segunda avaliação, realizada três dias após a segunda aplicação do vírus, a mortalidade variou, respectivamente, de 86,6 a 100% e de 84,1 a 99,3%. A eficiência do vírus praticamente não variou entre os dois estádios de crescimento da planta. No entanto, deve ser salientado que a aplicação do vírus foi sobre lagartas de primeiro instar e, portanto, bem suscetíveis a ele.

TABELA 10. Efeito da dose e do intervalo de aplicação de *Baculovirus* sobre a mortalidade média (%)<sup>1</sup> de lagartas de *Spodoptera frugiperda*.

Dose (g/ha)	Amostragem sete dias após a primeira aplicação do vírus			Amostragem três dias após a segunda aplicação do vírus		
	Estádio de crescimento da planta (número de folhas abertas)					
	6-8	8-10	Média	6-8	8-10	Média
50	95,5 A	93,6 A	94,6 A	96,1 A	88,2 B	92,2 B
25 + 25	81,1 B	76,4 B	78,8 B	86,6 B	84,1 B	85,3 C
25 + 50	79,2 B	76,5 B	77,8 B	88,5 B	87,0 B	87,7 C
50 + 25	95,5 A	91,4 A	93,5 A	100,0 A	99,3 A	99,6 A
50 + 50	97,2 A	90,9 A	94,1 A	100,0 A	98,2 A	99,1 A
100	96,5 A	93,4 A	95,0 A	99,4 A	98,5 A	99,0 A
Testemunha	1,2 C	3,2 C	2,2 C	0,0 C	1,0 C	0,5 D
Média	78,0 a	75,1 a		81,5 a	79,5 b	
CV	4,95%	5,21%	6,2%	5,24%	3,71%	4,40%

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha não diferem significativamente entre si, segundo o teste de Duncan (p ≤ 0,05).

## Resistência ao vírus

Boots & Begon (1993) descreveram o desenvolvimento de resistência de *Plodia interpunctella* à infecção do vírus de granulose (Baculoviridae), após exposição prolongada a ele em culturas de laboratório. No entanto, os insetos resistentes apresentavam desenvolvimento mais lento e também menor viabilidade dos ovos produzidos. Esses resultados foram interpretados como sendo os efeitos pleiotrópicos da seleção nos locos controladores da resistência. Resultados semelhantes tinham sido descritos anteriormente por Fuxa & Richter (1989), usando a seleção artificial para aumentar a resistência de *S. frugiperda* à infecção do vírus de granulose (também Baculoviridae). O ganho de resistência foi interpretado como aumento da frequência dos alelos. Também com a *S. frugiperda*, os insetos resistentes apresentavam desvio em relação aos insetos normais, como menor longevidade, menor número de ovos produzidos e menor viabilidade dos ovos. Nesses estudos, sugere-se que a seleção de indivíduos sem aqueles desvios resultaria na diminuição do nível de resistência. Isso foi demonstrado por Fuxa & Richter (1989) e Boots & Begon (1993). Goulson & Hauxwell (1995) propuseram uma outra interpretação para o fato baseado no conhecimento existente sobre o *Baculovirus*. Segundo esses autores, a transmissão do vírus (vírus de poliedrose nuclear e vírus de granulose) pelos insetos sobreviventes via ovo e/ou via ovário para as gerações seguintes é bem documentada para vários insetos, incluindo *S. frugiperda* (Neelgund & Mathad, 1978; Melamed-Madjar & Raccah, 1979; Young & Yearian, 1982; Shapiro & Robertson, 1987; Smits & Vlak, 1988; Fuxa & Richter, 1991; Fuxa et al., 1992). Segundo Goulson & Hauxwell (1995), a infecção por *Baculovirus* pode ser transmitida verticalmente de geração para geração, sem que a infecção seja letal. Embora os efeitos subletais das infecções transmitidas verticalmente não tenham sido examinados, sabe-se que a inoculação de larvas com doses subletais pode produzir efeitos que incluem alterações na taxa de desenvolvimento e redução na fecundidade. Portanto, as populações aparentemente resistentes apontadas por Boots & Begon (1993) e Fuxa & Richter (1989) podem estar carregando infecções subletais, as quais resultam nos sintomas observados. A volta rápida à situação de normalidade de

insetos selecionados decorre do fato de indivíduos não-infectados, presentes dentro da população, produzirem uma descendência maior do que os indivíduos infectados e porque nem toda a descendência de insetos infectados está também infectada. Dessa maneira, a frequência de infecção subletal verticalmente transmitida declinará nas gerações seqüenciais, como demonstrado em populações infectadas de *S. frugiperda* (Fuxa & Richter, 1992). Segundo a hipótese de Goulson & Hauxwell (1995), as infecções subletais conferem um grau de resistência a novas infecções, como já tinha sido proposto por Fuxa (1993). Embora existam boas evidências da existência de resistência, a base genética para explicar tanto o desvio da normalidade, quanto a reversão da resistência, ainda não está estabelecida de maneira convincente. É, portanto, fundamental confirmar para cada caso se os insetos aparentemente resistentes estão carregando infecções subletais ou exibem resistência genética (Goulson & Hauxwell, 1995).

### **Melhoramento da eficácia de *Baculovirus***

O melhoramento genético de viroses do grupo *Baculovirus* para o controle de insetos tem sido considerado uma área importante de pesquisa nos últimos anos (Fuxa et al., 1994). Para melhorar sua eficácia, as baculoviroses podem ser artificialmente selecionadas pelo método clássico de manipulação genética dos caracteres, tais como maior virulência e resistência à radiação ultravioleta (Aizawa, 1971; Brassel & Benz, 1979; Shapiro & Bell, 1984).

Fuxa & Richter (1991) também consideraram a possibilidade de se ter ganhos significativos na eficiência do controle pelo *Baculovirus* através da transmissão vertical, ou seja, a passagem do vírus dos pais para os descendentes. Na verdade, a transmissão vertical de *Baculovirus* já tinha sido detectada em diversos insetos (Bird, 1961; Swaine, 1966; Neelgund & Mathad, 1978; Abul-Nasr et al., 1979; Melamed-Madjar & Raccah, 1979; Shapiro & Robertson, 1987; Smiths & Vlak, 1988). Fuxa & Richter (1991) selecionaram uma raça de vírus de poliedrose nuclear de *S. frugiperda* com uma alta taxa de transmissão vertical, pelo isolamento do vírus a partir de pupas que tinham sido infectadas através de

transmissão vertical. Os autores argumentaram que a raça melhorada poderia ser muito útil no controle das populações avançadas da praga, porque haveria uma melhor eficiência no transporte do vírus para as partes mais altas das plantas, o que não acontece normalmente, quando a fonte de infecção é baseada somente no reservatório natural, que é o solo. Estudos complementares sobre biologia, interações com hospedeiro e caracterização de DNA da raça selecionada foram posteriormente realizados (Fuxa & Richter, 1992; Fuxa et al., 1992, 1994).

Segundo Hamm et al. (1994), uma das razões da baixa eficiência do *Baculovirus* aplicado no campo, descrita em trabalhos prévios (Hamm & Young, 1971; Hamm & Hare, 1982), era a falta de inclusão de adjuvantes para proteger o vírus dos raios solares ou mesmo para aumentar sua infectividade. A importância do assunto foi demonstrada por Shapiro (1992) e Shapiro & Robertson (1992), usando uma série de protetores fluorescentes contra os raios ultravioletas. Em alguns casos, houve aumento da infectividade do vírus de poliedrose nuclear em lagartas de *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae), mesmo quando este não era exposto aos raios UV. Dentro dessa linha de raciocínio, Hamm & Shapiro (1992) demonstraram, inicialmente em laboratório, o aumento da eficiência do vírus de poliedrose nuclear de *S. frugiperda*, utilizando o protetor *Tiponal*. Em função da qualidade desse produto, eles obtiveram, nos Estados Unidos, sua patente, em 1992 (Shapiro et al., 1992). Em condições de campo, Hamm et al. (1994) aplicaram o VPN de *S. frugiperda* em combinação com o produto para o controle da praga na cultura de milho, em concentrações variadas, tanto do vírus quanto do protetor UV. Observaram que o protetor interagiu significativamente, tanto com a concentração do vírus quanto com o volume de água aplicado (234 a 926 litros/ha), aumentando a eficiência do vírus.

Mais recentemente, o melhoramento genético das Baculoviroses tem sido realizado através de técnicas de DNA-recombinante (Wood & Granados, 1991). Com essa tecnologia, novas perspectivas têm surgido para aumentar a eficiência dos inseticidas virais (Gerk et al., 1997). Segundo Hawtin & Possee (1993), o principal objetivo do uso da engenharia genética em *Baculovirus* é aumentar a sua velocidade de ação, colocando-o em igualdade de condições

com um produto químico. Tem sido proposto que a inserção de genes modificados levando toxinas específicas para determinada praga, seguida por sua expressão dentro do organismo do inseto hospedeiro, pode aumentar a taxa de mortalidade ou pelo menos inibir a alimentação e, conseqüentemente, reduzir os danos à planta (Bishop et al., 1989; Federici, 1993; Vlak, 1993; Corsaro et al, 1993; Cory et al., 1994; Wood et al., 1994; Gopalakrishnan et al., 1995; Miller, 1995; Lee et al., 1997). É possível, inclusive, aumentar o espectro de ação do vírus, fazendo com que ele seja eficiente para diferentes pragas. Nesse caso, isso poderia ser realizado através da introdução de determinados genes de um *Baculovirus* dentro do genoma de outro, como proposto por Kondo & Maeda (1991).

### Produção do *Baculovirus*

Além dos diferentes fatores que afetam a eficiência do *Baculovirus*, uma vez que este já foi aplicado no campo para o controle da lagarta-do-cartucho, um dos principais entraves à sua efetiva utilização no Brasil é, sem dúvida, a produção em larga escala. O grupo *Baculovirus* possui um ciclo de multiplicação bifásico característico (Faulkner, 1981; Kelly, 1982). Inicialmente, as partículas viróticas são secretadas no meio na forma de vírus não-occlusos. Essas partículas são infecciosas para as células dos insetos. Posteriormente, no ciclo de duplicação, as partículas do vírus são oclusas em cristais protéicos, chamados poliedros, os quais são letais para os insetos. Tanto os poliedros quanto as partículas não oclusas são parâmetros chaves na determinação da eficiência do processo contínuo de produção do *Baculovirus*.

Apesar do grande potencial de uso do *Baculovirus*, a maioria das produções comerciais são ainda realizadas *in vivo*. Nesse tipo de produção, deve-se considerar duas fases bem distintas e importantes. Na primeira delas, tem-se o maior desafio para se garantir o sucesso de um programa de controle biológico da lagarta-do-cartucho na cultura do milho: obtenção de grande quantidade de insetos a um custo competitivo. Uma vez que se tem os insetos, a segunda fase, que é a da multiplicação e formulação do vírus, é relativamente mais fácil.

## Fase 1: criação artificial do hospedeiro

O *Spodoptera frugiperda* é um inseto cuja criação no laboratório já está bem documentada, podendo todo o seu processo ser mecanizado (Shorey & Hale, 1965; Burton & Cox, 1966; Burton, 1967; Bowling, 1967; Bailey & Chada, 1968; Snow, 1968; Harrell et al., 1968; Ignoffo & Boening, 1970; Perkins & Young, 1972; McMillian & Wiseman, 1972; Vasquez et al., 1975; Sparks & Harrell, 1976; Mihm, 1983; Ferguson et al., 1994; 1997). Na Embrapa Milho e Sorgo, o inseto vem sendo criado, há mais de 20 anos, em dieta artificial à base de feijão, germe de trigo e levedo de cerveja (Cruz, 1992a,b).

Os adultos, na proporção de um macho para uma fêmea, são colocados em gaiolas com capacidade para 2.000 adultos por quinzena. A gaiola é feita de metalão, com 16 lados removíveis, de 30 por 30cm. A parte superior da gaiola é confeccionada com acrílico, para facilitar a inspeção. A parte inferior é feita com chapa galvanizada em formato trapezoidal, com abertura na base, para descarte de adultos mortos. No interior da gaiola existem coxos para colocação de alimento (solução açucarada a 10%, enriquecida com ácido ascórbico a 0,5%). Como sítio de postura, são colocadas, no teto da gaiola, folhas de papel, em forma de chapéu. Já nos lados removíveis, são colocados guardanapos brancos. Normalmente, 48 horas após a emergência dos adultos, começam a ser observadas as primeiras posturas, que são retiradas de dois em dois dias, para evitar a eclosão de lagartas no interior da gaiola. As posturas são recortadas e colocadas individualmente no interior de copos de plástico de 50ml, contendo dieta artificial (8 gramas), e mantidas em sala climatizada ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ). Deve-se ter o cuidado de não deixar que o papel com a postura entre em contato com a dieta artificial, o que provoca mortalidade nas larvas recém-nascidas. As larvas permanecem juntas por um período de até sete dias, pois, a partir daí, ocorre o canibalismo. Desse ponto em diante, as larvas são individualizadas em recipientes semelhantes e com a mesma quantidade de dieta. Para continuar o processo de multiplicação da praga, as larvas permanecem no copo de plástico até a transformação em adulto, quando, então, são transferidas para a gaiola de oviposição.

## Fase 2: obtenção do *Baculovirus*

Diversas alternativas têm sido tentadas para a obtenção do *Baculovirus* no laboratório. Uma delas é aplicar na superfície da dieta artificial da lagarta hospedeira uma suspensão purificada do vírus (Valicente et al., 1989). A dieta deve ser produzida sem anticontaminantes que possam inibir a atuação do vírus. Lagartas de terceiro instar (uma por recipiente) são colocadas sobre a dieta contaminada e, geralmente, sete dias após a infecção começam a aparecer as primeiras lagartas mortas. Estas devem ser retiradas manualmente, através de pinças e colocadas em recipientes próprios (frascos de vidros ou de plástico) que serão armazenados geralmente no congelador ou freezer. Muitas vezes, no processo de remoção manual, a larva morta pode romper-se fazendo com que grande quantidade do vírus fique impregnada na dieta artificial, aumentando as perdas. Para evitar tais perdas, é recomendado, antes da remoção, colocar o recipiente contendo as lagartas mortas e a dieta artificial dentro de um freezer, para depois facilmente remover a lagarta congelada.

Um processo alternativo, porém também artesanal, é preparar inicialmente a suspensão do vírus em uma bandeja de plástico. Dentro de cada bandeja, são submergidas, por cerca de 30 segundos, folhas de milho. As folhas impregnadas com o vírus, após a retirada do excesso de líquido, são colocadas em baldes de 20 litros. Dentro de cada balde são colocadas de 400 a 800 lagartas de terceiro instar, por um período de 15 a 24 horas. Findo esse período, as larvas são removidas e colocadas individualmente nos copos de plástico utilizados para a criação de insetos sadios, contendo um terço da dieta consumida por uma larva sadia.

Independente do processo de obtenção, no Brasil, a produção do *Baculovirus* é realizada *in vivo*, ou seja, em lagartas. Tal produção, no entanto, ainda possui custo elevado e exige muito tempo, além de ser difícil, quando se pensa em demandas maiores. No entanto, considerando a possibilidade de se ter número diversificado de pequenos empresários, distribuídos em diferentes regiões brasileiras, o processo pode ser eficaz.

Existe a possibilidade de multiplicação do *Baculovirus* em escala industrial, através de processos *in vitro*, usando cultura de tecidos. Vários trabalhos envolvendo *Baculovirus* de *S. frugiperda* ou outros lepidópteros podem ser encontrados na literatura (Goodwin et al., 1970; McIntosh & Ignoffo, 1976; Crawford & Sheehan, 1983; Weiss & Vaughn, 1986; Kompier et al., 1988; Schlaeger et al., 1993; Rhiel et al., 1997; Shih & Chang, 1997). Com certeza, no futuro, com o avanço da biotecnologia nessa área, o processo de produção do *Baculovirus* terá um grande impulso no Brasil.

Uma vez obtidas as lagartas infectadas e mortas pelo *Baculovirus*, elas são maceradas em liqüidificador e coadas, para eliminação de materiais grosseiros, como resíduos da lagarta morta, que podem obstruir a saída uniforme do produto ao entupir o bico do pulverizador. Uma amostra do material é levada ao microscópio ótico comum, para se fazer as quantificações do vírus, utilizando a câmara de Neubauer (Moraes & Alves, 1986).

Além do uso do macerado, para se obter maior estabilidade e facilidade de manuseio o vírus pode ser formulado em pó. Na Embrapa Milho e Sorgo, o produto é formulado em pó-molhável, através da mistura da suspensão do vírus em um inerte, o caulin, que é uma argila muito utilizada na indústria de cerâmica e pode ser facilmente obtido a um baixo custo. O macerado de vírus, devidamente quantificado, é misturado ao caulim em proporções, de modo a se ter um produto final com o peso de 50g, contendo  $2,5 \times 10^{11}$  CIP. A mistura é espalhada em uma camada fina sobre bandejas e colocada para secar à temperatura ambiente. Quanto mais fina for a camada, mais rápida será a secagem. Uma das grandes vantagens do caulin é a perda rápida de água, eliminando, em torno de 24 horas, praticamente todo o líquido excedente do macerado de vírus. Pode-se diminuir o tempo de secagem através de fluxo de ar artificial. Uma vez seco, o material é primeiramente colocado em baixa temperatura (congelador) para, no dia seguinte, ser finamente moído e empacotado.

## Efeito da idade da lagarta *Spodoptera frugiperda* na produção de *Baculovirus*

Em condições de campo, procura-se eliminar as lagartas antes que danos significativos sejam ocasionados à planta hospedeira. No entanto, no processo de produção, geralmente no laboratório, deve-se aumentar ao máximo o rendimento do vírus, ou seja, deve-se infectar as lagartas de modo a se ter sua morte antes de se transformar em pupa. Cruz & Valicente (1992d) determinaram a freqüência de mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* em função da idade do inseto no dia da infecção pelo *Baculovirus*, usando uma dose padrão de  $4,3 \times 10^7$  CIP/lagarta, oferecida a lagartas com idades variando entre 10 e 12 dias, mantendo todos os insetos em sala com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotofase de 12 horas. As lagartas, individualmente acondicionadas em copos de plástico de 50ml, foram alimentadas com dieta artificial, 24 horas após o oferecimento da suspensão do vírus. Noventa e dois por cento das lagartas infectadas com dez dias morreram entre sete e nove dias após a infecção (Tabela 11). Já as lagartas de 11 e 12 dias, retardaram um pouco mais o seu período letal, pois somente 81% e 55% dos insetos estavam mortos dentro do período de sete a nove dias. Além disso, a maior taxa de mortalidade (91%) ocorreu quando as lagartas foram submetidas ao vírus com a idade de dez dias. A mortalidade das lagartas caiu para 76% e 51% com a idade de 11 e 12 dias, respectivamente, provavelmente porque o período de infecção não foi suficiente para provocar a morte delas (Tabela 12). Portanto, no processo de produção do *Baculovirus*, a lagarta não pode ter idade superior a dez dias (Cruz & Valicente, 1992d).

O ajuste no estágio de desenvolvimento da lagarta no dia da infecção é fundamental para melhorar a eficiência na produção do *Baculovirus*. Por exemplo, uma lagarta morta, exibindo o tamanho médio acima de 2,5cm, produz cerca de  $3,4 \times 10^9$  CIP, enquanto lagartas médias e pequenas produzem muito menos, respectivamente,  $1,95 \times 10^9$  e  $1,46 \times 10^9$  CIP (Tabela 13). Considerando a dose recomendada de  $2,5 \times 10^{11}$  CIP/ha, seriam necessárias 74 lagartas grandes para se ter uma dose para uso em um hectare de milho. Esse valor subiria para 128 e 171 lagartas, no caso de lagartas médias e pequenas, respectivamente.

TABELA 11. Frequência do período letal e mortalidade (%) média de lagartas de *S. frugiperda* sujeitas à infecção pelo *Baculovirus* utilizado na dose de  $4,3 \times 10^7$  CIP/lagarta (Cruz & Valicente, 1992d).

Idade das lagartas (dias) <sup>1</sup>	Dias após a infecção com o <i>Baculovirus</i>							Total	
	7	8	9	10	11	12	13	14	
<b>Número de lagartas mortas</b>									
10	235	199	49	14	11	1	7	1	517
11	145	142	62	43	19	7	5	7	430
12	043	051	55	57	33	14	12	6	271
<b>Lagartas mortas (%)</b>									
10	45	38	9	3	2	<1	1	<1	
11	34	33	14	10	4	2	1	2	
12	16	19	20	21	12	5	4	2	

<sup>1</sup> 10 dias = 5º instar; 11 = início do 6º instar; 12 = final do 6º instar.

 TABELA 12. Mortalidade e tempo letal médio de lagartas de *S. frugiperda* sujeita à ação do *Baculovirus*, na dose de  $4,3 \times 10^7$  CIP/lagarta.

Idade da lagarta no dia da infecção (dias)	Mortalidade média (%) <sup>1</sup>	Período letal médio <sup>1</sup> (dias)
10	91 A	7,8 C
11	76 B	8,4 B
12	51 C	9,4 A

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, segundo o teste de Duncan (p < 0,05).

 TABELA 13. Produção de *Baculovirus* em função do estágio de desenvolvimento do hospedeiro.

	Tamanho das lagartas (cm)			
	Pequena(até 1,5cm)	Média(entre 1,5 e 2,5cm)	Grande(maior que 2,5cm)	Pupa (aos quatro dias de idade)
Produção/inseto	$1,46 \times 10^9$ CIP	$1,95 \times 10^9$ CIP	$3,4 \times 10^9$ CIP	$0,4 \times 10^9$ CIP
Relação de rendimento do vírus	1	1,33	2,32	0,27
Insetos avaliados	10.000	12.000	4.500	1.000

## Recomendações finais

Os resultados de pesquisa mostram que o período de maior ocorrência da lagarta na planta de milho está entre 40 e 45 dias após o plantio. Este é, portanto, o período crítico para entrar com o *Baculovirus*. Deve-se considerar também que, à medida que a lagarta se desenvolve, ela fica mais resistente ao vírus. Portanto, quanto mais novas forem as lagartas, maior eficiência pode ser esperada do vírus. Por isso, é recomendada a aplicação do *Baculovirus* em lagartas de, no máximo, 1,5cm. A pulverização é realizada com os mesmos equipamentos utilizados para a aplicação de um produto químico convencional. Particularmente para a lagarta-do-cartucho, recomenda-se usar o bico tipo leque 8004 ou 6504 (Cruz & Santos, 1984). Quanto mais uniforme for o plantio, mais eficiente será a aplicação. Isso é particularmente importante quando a aplicação é tratorizada, porque, se o plantio não for uniforme, ou seja, o espaçamento entre as fileiras de milho variar, ao longo da aplicação o produto pode ser jogado fora do alvo (lagarta), que está localizado dentro do cartucho da planta. Quando a aplicação for em área pequena, ela pode ser realizada com o aparelho manual-costal e, nesse caso, a falta de uniformidade no plantio é menos importante, pois o jato da pulverização pode ser facilmente ajustado de modo a cair dentro do cartucho da planta de forma mais eficiente. O vírus pode também ser aplicado via água de irrigação. Independentemente do equipamento utilizado, deve-se fazer a pulverização fora das horas de maior incidência de raios ultravioletas e períodos chuvosos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUL-NASR, S. E.; AMMAR, E. D.; ABUL-ELA, S. M. Effects of nuclear polyhedrosis virus on various developmental stages of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boid.). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, Hamburg, v. 88, p. 181-187, 1979.
- AIZAWA, K. Strain improvement and preservation of virulence of pathogens. In: BURGESS, H. D.; HUSSEY, N. W., eds. *Microbial control of insects and mites*. London: Academic Press, 1971. p. 655-672.
- ALLEN, G. E.; GREGORY, B. G.; BRAZZELL, J. R. Integration of the *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus into a biological control program on cotton. *Journal of Economic Entomology*, College Park, v. 59, n. 6, p. 1333-1336, 1966.
- ALVES, S. B. Vírus entomopatogênicos. In ALVES, S. B., coord. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo: Editora Manole, 1986. p. 171-187.
- BAILEY, D. L.; CHADA, H. L. Effects of natural (Sorghum) and artificial (Wheat germ) diets on development of the corn earworm, fall armyworm, and southwestern corn borer. *Journal of Economic Entomology*, College Park, v. 61, n. 1, p. 257-259, 1968.

- BIRD, F. T. Transmission of some insect viruses with particular reference to ovarian transmission and its importance in the development of epizootic. *Journal of Insect Pathology*, New York, v. 3, p. 352-380, 1961.
- BISHOP, D. H. L.; HARRIS, M. P. G.; HIRST, M.; MERRYWEATHER, A. T.; POSSEE, R. D. **The control of insect pests by viruses: opportunity for the future by using genetically engineered virus insecticides.** Farnham: British Crop Protection Council, 1989. p.145-155. (BCPC Monograph, 43).
- BOOTS, M.; BEGON, M. Trade-offs with resistance to a granulosis virus in the Indian meal moth, examined by a laboratory evaluation experiment. *Functional Ecology*, Oxford, v. 7, p. 528-534, 1993.
- BOWLING, C. C. Rearing of two lepidopterous pests of rice on a common artificial diet. *Annals of the Entomological Society of America*, College Park, v. 60, n. 6, p.1215-1216, 1967.
- BRASSEL, J.; BENS, G. Selection of a strain of the granulosis virus of the codling moth with improved resistance against artificial ultraviolet radiation and sunlight. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, v. 33, n. 3, p. 358-363, 1979.
- BURGES, H. D.; CROZIER, G.; HEBER, J. A review of safety tests on Baculoviruses. *Entomophaga*, Paris, v. 25, n. 4, p. 329-340, 1980.
- BURTON, R. L. **Mass rearing the fall armyworm in the laboratory.** S.I.: USDA-ARS, 1967. 12p. (USDA-ARS, 33-117).
- BURTON, R. L.; COX, H. C. An automated packaging machine for lepidopterous larvae. *Journal of Economic Entomology*, College Park, v. 59, n. 4, p. 907-909, 1966.
- CARVALHO, R. P. L. Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho, em condições de campo. Piracicaba: ESALQ/USP, 1970. Tese Doutorado.
- CORSARO, B. G.; GIJZEN, M.; WANG, P.; GRANADOS, R. R. Baculovirus enhancing proteins as determinants of viral pathogenesis. In: BECKAGE, N. E.; THOMPSON, S. N.; FEDERICI, B. A., eds. **Parasites and pathogens of insects.** San Diego: Academic Press, 1993. v.2, p. 127-146.
- 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*, London, v. 370, n. 6485, p. 138-140, 1994.
- COSTA, E. F.; BRITO, R. A. L. **Aplicador portátil de produtos químicos via água de irrigação.** Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1988. 19 p.
- CRAWFORD, A. M.; SHEEHAN, C. S. Persistent Baculovirus infections: *Spodoptera frugiperda* NPV and *Autographa californica* NPV in *Spodoptera frugiperda* cells. *Archives of Virology*, New York, v. 78, n. 1, p. 65-79, 1983.
- CRUZ, I. **Impact of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Smith and Abott 1797) on grain yield in field corn.** West Lafayette: Purdue University, 1980. 162p. Tese Mestrado.
- CRUZ, I. Aspectos biológicos de *Spodoptera frugiperda* criada com diferentes dietas artificiais. **Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo 1988-1991**, Sete Lagoas, v. 5, p. 75, 1992 a.
- CRUZ, I. Determinação dos instares de *Spodoptera frugiperda* em lagartas alimentadas com diferentes dietas. **Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo 1988-1991**, Sete Lagoas, v. 5, p. 76-77, 1992 b.
- CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho.** Sete Lagoas: EMBRAPA. CNPMS, 1995 a. 45p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 21).
- CRUZ, I. Manejo Integrado de Pragas de milho com ênfase para o controle biológico. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS, 4., 1995, Campinas, SP. **Anais**. Campinas: Instituto Biológico, 1995b. p. 48-92.
- CRUZ, I. Manejo de pragas da cultura de milho. In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO SAFRINHA, 5, 1999, Barretos, SP. **Cursos para agricultores.** Campinas: IAC, 1999. p. 27-56.
- CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; VALICENTE, F. H.; OLIVEIRA, A. C. Application rate trials with a nuclear polyhedrosis virus to control *Spodoptera frugiperda* (Smith) on maize. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 145-152, 1997.

- CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; OLIVEIRA, A. C.; VASCONCELOS, C. A. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management**, v. 44, 1999a. (no prelo).
- CRUZ, I.; GONÇALVES, E. P.; FIGUEIREDO, M. L. C. Effect of a Nuclear Polyhedrosis Virus on *Spodoptera frugiperda* (Smith) larvae, its damage and yield of maize crop. **International Journal of Pest Management**, 1999b (no prelo).
- CRUZ, I.; OLIVEIRA, L. J.; VASCONCELOS, C. A.; OLIVEIRA, A. C. Efeito no nível de saturação de alumínio em solo ácido sobre os danos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em milho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, n. 2, p. 293-297, 1996.
- CRUZ, I.; SANTOS, J. P. Diferentes bicos do tipo leque no controle da lagarta-do-cartucho em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 1-7, 1984.
- CRUZ, I.; TURPIN, F. T. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estágios de crescimento da cultura de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 355-359, 1982.
- CRUZ, I.; TURPIN, F. T. Yield impact of larval infestation of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) to mid-whorl growth stage of corn. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 76, n. 5, p. 1052-1054, 1983.
- CRUZ, I.; VALICENTE, F. H. Efeito da formulação pó molhável do Baculovírus em lagartas de *Spodoptera frugiperda*. **Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo 1988-1991**, Sete Lagoas, v. 5, p. 70, 1992a.
- CRUZ, I.; VALICENTE, F. H. Efeito da formulação pó molhável do Baculovírus sujeita a diferentes condições de armazenamento sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* de diferentes idades. **Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo 1988-1991**, Sete Lagoas, v. 5, p. 70, 1992 b.
- CRUZ, I.; VALICENTE, F. H. Efeito da temperatura sobre a eficiência do vírus da poliedrose nuclear, Baculovírus, no controle da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*. **Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo 1988-1991**, Sete Lagoas, v. 5, p. 71, 1992 c.
- CRUZ, I.; VALICENTE, F. H. Efeito da idade da lagarta *Spodoptera frugiperda* na produção de vírus de poliedrose nuclear (Baculovírus). **Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo 1988-1991**, Sete Lagoas, v. 5, p. 71-72, 1992 d.
- CRUZ, I.; VALICENTE, F. H. Deposição de Baculovírus em diferentes partes da folha de milho. **Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo 1988-1991**, Sete Lagoas, v. 5, p. 72-73, 1992 e.
- FAULKNER, P. Baculoviruses. In: DAVIDSON, E. A. ed. **Pathogenesis of invertebrate microbial diseases**. Totowa, NJ: Allanheld, Osmun, 1981. p. 3-37.
- FEDERICI, B. A. Viral pathobiology in relation to insect control. In: BECKAGE, N. E.; THOMPSON, S. N.; FEDERICI, B. A. eds. **Parasites and pathogens of insects**. San Diego, CA: Academic Press, 1993. v. 2, p. 81-101.
- FERGUSON, H. J.; EATON, J. L.; ROGERS, C. E. Larval rearing density effects on lipid reserves and wing-loading in fall armyworm adults (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Agricultural Entomology**, v. 14, n. 4, p. 369-384, 1997.
- FERGUSON, H. J.; EATON, J. L.; ROGERS, C. E.; SIMMONS, A. M. Rearing density effects on pupal weight, wing width, development, and female adult activity of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 87, n. 6, p. 823-830, 1994.
- FUXA, J. R. Prevalence of viral infections in populations of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in southeastern Louisiana. **Environmental Entomology**, College Park, v. 11, n. 1, p. 239-242, 1982.
- FUXA, J. R. Insect control with Baculovirus. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 9, p. 425-442, 1991.
- FUXA, J. R. Insect resistance to viruses. In: BECKAGE, N. E.; THOMPSON, S. N.; FEDERICI, B. A. eds. **Parasites and pathogens of insects**. San Diego: Academic Press, 1993. v. 2, p. 215-248.
- FUXA, J. R.; MARUNIAK, J. E.; RICHTER, A. R. Characterization of the DNA of a nuclear polyhedrosis virus selected for an increased rate of vertical transmission. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 64, n. 1, p. 1-5, 1994.
- FUXA, J. R.; RICHTER, A. R. Reversion of resistance by *Spodoptera frugiperda* to nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 53, n. 1, p. 52-56, 1989.

- FUXA, J. R.; RICHTER, A. R. Selection for an increased rate of vertical transmission of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus. **Environmental Entomology**, College Park, v. 20, n. 2, p. 603-609, 1991.
- FUXA, J. R.; RICHTER, A. R. Virulence and multigeneration passage of a nuclear polyhedrosis virus selected for an increased rate of vertical transmission. **Biological Control** v. 2, p. 171-175, 1992.
- FUXA, J. R.; WEIDNER, E. H.; RICHTER, A. R. Polyhedra without virions in a vertically transmitted nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 60, n. 1, p. 53-58, 1992.
- GARCIA, M. A. Potencialidade de alguns fatores bióticos e abióticos na regulação populacional de *Spodoptera frugiperda* (Abbot & Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). Campinas: UNICAMP, 1979. 96p. Tese Mestrado.
- GARDNER, W. A.; FUXA, J. R. Pathogens for the suppression of the fall armyworm. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 63, n.4, p. 439-447, 1980.
- GARDNER, W. A.; NOBLET, R.; SCHWEHR, R. D. The potential of microbial agents in managing populations of the fall armyworm. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 67, n. 3, p. 325-332, 1984.
- GERK, A. O.; KITAJIMA, E. W.; SOUZA, M. L. Identificação e caracterização de isolado brasileiro do vírus de polihedrose nuclear da lagarta do cartucho-do-milho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 26, n. 3, p.507-515, 1997.
- GOODWIN, R. H.; VAUGHN, J. L.; ADAMS, J. R.; LOULOUDES, S. J. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in an established cell lines. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 16, p. 284-288, 1970.
- GOPALAKRISHNAN, B.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K. Baculovirus-mediated expression of a *Manduca sexta* chitinase gene - properties of the recombinant protein. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 255-265, 1995.
- GOULSON, D.; HAUXWELL, C. Resistance or covert infection; baculovirus studies re-examined. **Functional Ecology**, Oxford, v. 9, p. 548-550, 1995.
- HAMM, J. J.; CARPENTER, J. E. Compatibility of nuclear polyhedrosis viruses and inherited sterility for control of corn earworm and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomological Science**, Georgia, v. 32, n. 2, p. 148-153, 1997.
- HAMM, J. J.; CHANDLER, L. D.; SUMNER, H. R. Field tests with a fluorescent brightener to enhance infectivity of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 77, n. 4, p. 425-437, 1994.
- HAMM, J. J.; HARE, W. W. Application of entomopathogens in irrigation water for control of fall armyworm and corn earworms (Lepidoptera: Noctuidae) on corn. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 75, n. 6, p. 1074-1079, 1982.
- HAMM, J. J.; SHAPIRO, M. Infectivity of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus enhanced by a fluorescent brightener. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 85, n. 6, p. 2149-2152, 1992.
- HAMM, J. J.; YOUNG, J. R. Value of virus presilk treatment for corn earworm and fall armyworm control in sweet corn. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 64, n. 1, p. 144-146, 1971.
- HARRAP, K. A.; PAYNE, C. C.; ROBERTSON, J. S. The properties of three baculoviruses from closely related hosts. **Virology**, New York, v. 79, n. 1, p. 14-31, 1977.
- HARRELL, E. A.; HARE, W. W.; BURTON, R. L. Collecting pupae of the fall armyworm from rearing containers. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 61, n. 3, p. 873-876, 1968.
- HAWTIN, R. E.; POSSEE, R. D. Genetic manipulation of the Baculovirus genome for insect pest control. In: BEAKAGE, N. E.; THOMPSON, S. N.; FEDERICI, B. A. eds. **Parasites and pathogens of insects**. San Diego: Academic Press, 1993. v. 2, p. 179-195.
- IGNOFFO, C. M.; BOENING, O. P. Compartmented disposable plastic trays for rearing insects. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 63, n. 5, p. 1696-1697, 1970.
- IGNOFFO, C. M.; CHAPMAN, A. J.; MARTIN, D. F. The nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis zea* (Boddie) and *Heliothis virescens* (Fabricius). III. Effectiveness of the virus against field populations of *Heliothis* on cotton, corn and grain sorghum. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 7, p. 227-235, 1965.

- JONES, K. A.; IRVING, N. S.; GRZYWACZ, D.; MOAWAD, G. M.; HUSSEIN, A. H.; FARGAHLI, A. Application rate trials with a nuclear polyhedrosis virus to control *Spodoptera littoralis* (Boisd.) on cotton in Egypt. **Crop Protection**, Surrey, v. 13, n. 5, p. 337-340, 1994.
- KELLY, C. D. Baculovirus replication. **Journal of General Virology**, v. 63, p. 1-13, 1982.
- KLEIN, M.; PODOLER, H. Studies on the application of a nuclear polyhedrosis virus to control populations of the Egyptian cottonworm, *Spodoptera littoralis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 32, p. 244-248, 1978.
- KOMPIER, R.; TRAMPER, J.; VLAK, J. M. A continuous process for the production of baculovirus using insect cell cultures. **Biotechnology Letters**, Surrey, v. 10, n. 12, p. 849-854, 1988.
- KONDO, A.; MAEDA, S. Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 65, p. 3625-3632, 1991.
- LEE, S. Y.; QU, X.; CHEN, W.; POLOUMIENKO, A.; MACAFFEE, N.; MORIN, B.; LUCAROTI, C.; KRAUSE, M. Insecticidal activity of a recombinant baculovirus containing an antisense c-myc fragment. **Journal of General Virology**, Cambridge, v. 78, n. 1, p. 273-281, 1997.
- McINTOSH, A. H.; IGNOFFO, C. M. Establishment of a persistent baculovirus infection in a lepidopteran cell line. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 38, n. 3, p. 395-403, 1976.
- McMILLIAN, W. W.; WISEMAN, B. R. Separating egg masses of the fall armyworm. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 65, n. 3, p. 900-902, 1972.
- MELAMED-MADJAR, V.; RACCAH, B. The transstadial and vertical transmission of a granulosis virus from corn borer *Sesamia nonagroides*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 33, n. 3, p. 259-264, 1979.
- MIHM, J. A. Efficient mass-rearing and infestation techniques to screen for host plant resistance to fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. El Batán: CIMMYT, 1983. 16p.
- MILLER, L. K. Genetically engineered insect virus pesticides: present and future. **Journal of Insect Pathology**, New York, v. 65, n. 3, p. 211-216, 1995.
- MORAES, S. A.; ALVES, S. B. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. coord. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Editora Manole, 1986. p. 278-288.
- MOSCARDI, F. Utilização de vírus para controle da lagarta-da-soja. In: ALVES, S. B. coord. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Editora Manole, 1986. p. 188-202.
- MOSCARDI, F.; KASTELIC, J. G. Ocorrência de vírus de poliedrose nuclear e vírus de granulose em populações de *Spodoptera frugiperda* atacando soja na região de Sertaneja, PR. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR). **Resultados de pesquisa da soja 1984/85**. Londrina, 1985. p. 128. (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 15).
- NEELGUND, Y. F.; MATHAD, S. D. Transmission of nuclear polyhedrosis virus in laboratory population of the armyworm, *Mythimna (Pseudaletia) separata*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 31, n. 2, p. 143-147, 1978.
- PERKINS, W. D.; YOUNG, J. R. A modified loop for feeding solutions to adult lepidopterans. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 65, n. 5, p. 1518-1519, 1972.
- RHIEL, M.; MITCHELL-LOGEAN, C. M.; MURHAMMER, D. W. Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High Five™) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 55, n. 6, p. 909-920, 1997.
- SCHLAEGER, E. J.; FOGGETTA, M.; VONACH, J. M.; CHRISTENSEN, K. SF-1, a low cost culture medium for the production of recombinant proteins in baculovirus infected cells. **Biotechnology Techniques**, Surrey, v. 7, n. 3, p. 183-188, 1993.
- SHAPIRO, M. Use of optical brighteners as radiation protectants for gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 85, n. 5, p. 1682-1686, 1992.
- SHAPIRO, M.; BELL, R. A. Selection of a UV-tolerant strain of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus recovered from survivors of viral challenge. **Environmental Entomology**, College Park, v. 13, p. 1522-1526, 1984.

- SHAPIRO, M.; DOUGHERTY, E. M.; HAMM, J. J. Compositions and methods for biocontrol using fluorescent brighteners. U.S. Patent number 5, 124, 149, 1992.
- SHAPIRO, M.; ROBERTSON, J. L. Yield and activity of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus recovered from survivors of viral challenge. *Journal of Economic Entomology*, College Park, v. 80, n. 4, p. 901-905, 1987.
- SHAPIRO, M.; ROBERTSON, J. L. Enhancement of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus activity by optical brighteners. *Journal of Economic Entomology*, College Park, v. 85, n. 4, p. 1120-1124, 1992.
- SHIH, C.-J.; CHANG, J.-C. A simple media for growth of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) cells and propagation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Applied Entomology and Zoology*, Tokyo, v. 32, n. 4, p. 589-594, 1997.
- SHOREY, H. H.; HALE, R. L. Mass-rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, College Park, v. 58, n. 3, p. 522-524, 1965.
- SMITS, P. H.; VLAK, J. M. Biological activity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus against *S. exigua* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, v. 51, n. 2, p. 107-114, 1988.
- SNOW, J. W. A holding cage and handling device for noctuid moths. *Journal of Economic Entomology*, College Park, v. 59, n. 6, p. 1547-1548, 1968.
- SPARKS, A. N.; HARRELL, E. A. Corn earworm rearing mechanization. S.I.: USDA-ARS, 1976. 12p. (USDA-ARS, 1554).
- SWAINE, G. Generation-to-generation passage of the nuclear polyhedral virus of *Spodoptera exempta* (Wlk.). *Nature*, London, v. 210, n. 5040, p. 1053-1054, 1966.
- TANADA, Y.; REINER, C. The use of pathogens in the control of the corn earworm *Heliothis zea* (Boddie). *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, v. 4, p. 139-154, 1962.
- VALICENTE, F. H. Consumo foliar da lagarta do milho, *Spodoptera frugiperda* infectada com Vírus de Granulose ou de Poliedrose. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Jaboticabal, v. 17, n. 1, p. 347-357, 1988.
- VALICENTE, F. H.; COSTA, E. F. Controle da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), com o *Baculovirus spodoptera*, aplicado via água de irrigação. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Londrina, v. 24, n. 1, p. 61-67, 1995.
- VALICENTE, F. H.; CRUZ, I. Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o *Baculovirus*. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1991. 23p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 15).
- VALICENTE, F. H.; CRUZ, I. Mortalidade da lagarta do cartucho por vírus encontrados em diversas regiões do Estado de Minas Gerais. *Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo 1988-1991*, Sete Lagoas, v. 5, p. 66, 1992 a.
- VALICENTE, F. H.; CRUZ, I. Efeito de várias doses do *Baculovirus* na mortalidade da lagarta do cartucho do milho. *Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo 1988-1991*, Sete Lagoas, v. 5, p. 67, 1992 b.
- VALICENTE, F. H.; CRUZ, I. Efeito da temperatura ambiente sobre o *baculovirus*, na mortalidade da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*). *Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo 1988-1991*, Sete Lagoas, v. 5, p. 67, 1992 c.
- VALICENTE, F. H.; CRUZ, I. Efeito de altas temperaturas sobre o VPN na mortalidade da lagarta do cartucho. *Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo 1988-1991*, Sete Lagoas, v. 5, p. 67, 1992 d.
- VALICENTE, F. H.; CRUZ, I. Efeito de diferentes temperaturas sobre a infectividade da lagarta do cartucho com o *Baculovirus spodoptera*. *Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo 1988-1991*, Sete Lagoas, v. 5, p. 68, 1992 e.
- VALICENTE, F. H.; PEIXOTO, M. J. V. D.; PAIVA, E.; KITAJIMA, E. W. Identificação e purificação de um vírus da poliedrose nuclear da lagarta *Spodoptera frugiperda*. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Jaboticabal, v. 18, suplemento, p. 71-81, 1989.

- VASQUEZ G., M.; CARRILLO S., J. L.; GRANADOS R., G.; GARCIA M., C. Cria massiva del gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* y evaluacion de infestaciones artificiales sobre maiz en el campo. **Agrociencia**, Argentina, v. 22, p. 3-13, 1975.
- VLAK, J. M. Genetic engineering of Baculoviruses for insect control, In: WHITTEN, M. J.; OAKESHOT, J. G. eds. **Molecular approaches to pure and applied entomology**. New York: Springer-Verlag, 1993. p. 90-127.
- WEISS, S. A.; VAUGHN, J. L. Cell culture methods for large-scale propagation of baculoviruses. In: GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. eds. **The biology of Baculoviruses**. Boca Raton. CRC Press, 1986. v. 2, p. 63-87.
- WHITLOCK, V. H. Simultaneous treatments of *Heliothis armigera* with nuclear polyhedrosis virus and a granulose virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 29, n. 3, p. 297-303, 1977.
- WOOD, H. A.; GRANADOS, R. R. Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 45, p. 69-87, 1991.
- WOOD, H. A.; HUGHES, P. R.; SHELTON, A. Field studies of the co-occlusion strategy with a genetically altered isolate of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Environmental Entomology**, College Park, v. 23, n. 2, p. 211-219, 1994.
- YOUNG, J. R.; HAMM, J. J. Nuclear-polyhedrosis viruses in control of corn earworm and fall armyworm in sweet corn. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 59, n. 2, p. 382-384, 1966.
- YOUNG, S. Y.; YEARIAN, W. C. Nuclear polyhedrosis infection of *Pseudoplusia includens* (Lep.: Noctuidae) larvae: effect on post larval stages and transmission. **Entomophaga**, Paris, v. 27, n. 1, p.61-66, 1982.

# 9

## **NOMURAEA RILEYI COMO AGENTE DE CONTROLE MICROBIANO DA LAGARTA-DA- SOJA**

Neiva Monteiro de Barros

Marcelo Rossato

Sideney Becker Onofre

### **INTRODUÇÃO**

A cultura da soja, que ocupa o segundo lugar no País, considerando-se área cultivada e produtividade, dissemina-se por 331 municípios do Rio Grande do Sul, sendo de extrema importância econômica para o Estado e para o Brasil, não somente em termos de divisas (exportação), mas para alimentação humana e animal.

A região Sul, na última safra, destacou-se como a maior produtora nacional, ocupando uma área de 6.228.726ha, com uma produção de 14.403.434ton, e um rendimento médio de 2.312Kg/ha (dados IBGE-DIP Q/RS SDDI, safra 1998).

A monocultura da soja, implantada como alternativa de exploração agrícola, desfavorece o equilíbrio do ambiente e favorece a explosão populacional de pragas, cuja ação é responsável pela perda de aproximadamente 30% da sua produtividade. A principal praga dessa cultura é a lagarta *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Turnipseed & Kogan, 1976; De Gaspari & Gomez, 1982), a qual, em ataques intensos, chega a ocasionar 100% de destruição foliar em períodos de clímax populacional, em janeiro e fevereiro, nas regiões Norte e Sul do país,

respectivamente (Hoffmann et al., 1979; Silva, 1993).

Entre os agentes biológicos de ocorrência natural com possibilidade de serem utilizados no controle da lagarta-da-soja destaca-se o fungo *Nomuraea rileyi*, um patógeno que ocorre em mais de 32 espécies de insetos das ordens Coleóptera, Lepidóptera e Orthoptera. Cerca de 90% dos hospedeiros desse fungo pertencem à ordem Lepidóptera, tendo como espécies importantes para as condições do Brasil, *A. gemmatalis*, *Cirphis latiuscula*, *Diatraea saccharalis*, *Plusia sp* e *Trichoplusia ni* (Ignoffo, 1981; Alves, 1998).

A ocorrência natural do fungo *N. rileyi* em muitos agroecossistemas, sua capacidade de indução de epizootias, bem como o grande número de pragas suscetíveis a ele, são fatores favoráveis para a formulação econômica de um biopesticida.

No presente capítulo, serão abordados aspectos relacionados à produção de enzimas extracelulares, virulência, variabilidade genética entre linhagens do fungo *N. rileyi* isoladas de *Anticarsia gemmatalis* e produção de metabólitos secundários pelo fungo *N. rileyi*.

## **Produção de enzimas extracelulares e virulência**

Os fungos, ao contrário das bactérias, vírus e protozoários entomopatogênicos, não necessitam ser ingeridos pelo hospedeiro para causarem infecções, bastando, para isso, que seus esporos penetrem diretamente através da cutícula dos insetos. Este processo pode ser aumentado pela produção de enzimas que degradam a cutícula. Estas enzimas, possivelmente relacionadas com a infectividade, talvez sejam determinantes na efetividade do processo.

Vários fungos produzem enzimas, as quais supostamente facilitam a penetração através da cutícula de insetos e a invasão subsequente do seu corpo. Uma vez que a cutícula do inseto é composta por proteínas, quitinas e lipídios (Hackman, 1974) as pesquisas têm se concentrado nas atividades proteolíticas, lipolíticas e quitinolíticas, bem como na função dessas enzimas como um mecanismo possível, pelo qual os fungos entomopatogênicos podem transpor a cutícula do hospedeiro. Essas enzimas, possivelmente presentes nas hifas

penetrantes, consistem de lipases, proteases e quitinases (Facchin, 1989; Rossato, 1991; St. Leger et al., 1993; Barros, 1995; Barros et al., em preparação).

Isolados virulentos e avirulentos do fungo *N. rileyi* apresentam atividade quitinolítica durante seu crescimento, entretanto somente os isolados virulentos apresentam níveis elevados desta atividade enzimática no momento da infecção, o que mantém sua capacidade de invadir a cutícula do inseto (El Sayed et al., 1989).

Tem sido evidenciado que a quitinase tem um papel menor na penetração da cutícula, quando comparada com proteases, mas pode exercer uma função importante, dependendo da estrutura cuticular do inseto (Charnley & St. Leger, 1991).

Em estudos realizados no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, verificou-se correlação entre a produção de enzimas extracelulares (Protease e Lipase) e virulência do fungo *N. rileyi* (Figura 1), sendo que linhagens que apresentaram altas taxas de protease e lipase foram mais virulentas (Barros et al., em preparação).

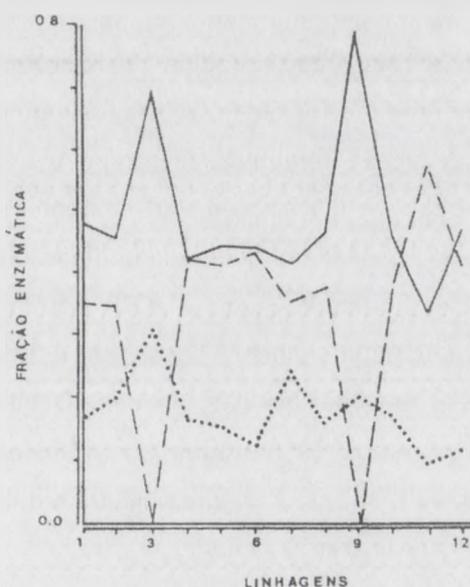


FIGURA 1. Correlação multivariada da atividade enzimática: protease, amilase, lipase. Fração da atividade enzimática representada pela relação: índice médio de cada enzima/somatória dos índices de todas as enzimas.

## Variabilidade genética entre linhagens do fungo *N. rileyi* isoladas de *Anticarsia gemmatalis*

Os fungos entomopatogênicos diferenciados, como aqueles com capacidade de colonizar e provocar a morte de insetos, constituem um grupo de microrganismos amplamente estudados em todo o mundo, tendo sido identificadas, até o presente momento, mais de 700 espécies, reunidas em 100 gêneros. A maioria dos fungos entomopatogênicos pertencem à classe dos deuteromicetos. Estes fungos têm a particularidade de parasitar diferentes tipos de artrópodos, insetos e ácaros, serem encontrados em habitats dos mais variados, desde o aquático ao terrestre, e colonizarem artrópodos que afetam culturas anuais, semipermanentes e permanentes. Sua característica de penetrar no hospedeiro via tegumento não é muito comum entre os demais entomopatógenos, como bactérias e vírus, os quais requerem a ingestão.

Um dos principais obstáculos à implementação de fungos entomopatogênicos como agentes de biocontrole é a caracterização do isolado antes de sua liberação em campo, sendo a análise genética destes fungos limitada pela falta de marcas.

A identificação e classificação rápida de microrganismos, em geral, relaciona-se com caracteres morfológicos, requisitos nutricionais, capacidade de degradação, ou produção de determinados compostos, os quais podem ser utilizados como parâmetros para uma seleção entre diferentes isolados. Entretanto, estas características têm um valor limitado na identificação de linhagens dentro de uma mesma espécie. Bartinicki-Garcia (1970) determinou diferenciação filogenética em fungos entomopatogênicos, baseando-se fundamentalmente nos critérios morfológicos e nas marcas bioquímicas. O advento de métodos moleculares tem suplementado os métodos taxonômicos tradicionais com instrumentos baseados em DNA, os quais possibilitaram o exame da filogenia e a sistemática dos fungos (Bruns et al., 1971).

A seleção da linhagem é muito importante para o desenvolvimento de fungos utilizados em controle biológico, devido à considerável variação natural existente. Ignoffo (1981) salientou a importância da variabilidade geográfica

para a seleção de linhagens mais efetivas. Entretanto, dados apresentados por St.Leger et al.(1992) mostraram que os requisitos nutricionais para a germinação e formação de apressórios, eventos necessários para a infectividade do fungo, estão freqüentemente relacionados ao hospedeiro, independente da distância geográfica e genética. Assim sendo, a estrutura populacional em habitats naturais e a genética de fungos fitopatogênicos são difíceis de estudar, devido à falta de marcadores morfológicos ou fisiológicos.

O conhecimento de características ecológicas e biológicas de interação entre hospedeiro e patógeno é importante para a obtenção de níveis significativos de controle de pragas, tendo sido detectados problemas nas análises dos resultados de campo referentes à detecção do patógeno introduzido versus as linhagens nativas do mesmo fungo (Lecuona,1996).

Os trabalhos realizados atualmente, empregando-se o fungo *N.rileyi*, apresentam resultados importantes na redução de populações de *Anticarsia gemmatalis*, sendo de fundamental importância a distinção entre o patógeno introduzido para controle biológico de pragas em novos ecossistemas e linhagens nativas do mesmo fungo, visando ao acompanhamento das populações de fungos e sua manutenção ao longo da safra, em anos consecutivos.

A variabilidade genética entre linhagens de fungos entomopatogênicos tem sido identificada em relação a caracteres associados com a patogenicidade, incluindo dimensões de conídios, taxa de crescimento, atividade enzimática (Fachin & Barros, 1991; Rossato, 1991; Barros, 1995) e, mais recentemente, sistemática molecular, utilizando-se técnicas de RFLP (Michelmore & Hulbert, 1987) RFLP, PCR (para revisão ver Erlich e Arnheim, 1992) e RAPD (Strongman e Mackay, 1993).

Os resultados obtidos pela técnica de amplificação de fragmentos randômicos (RAPD) apresenta um alto potencial na caracterização no âmbito intergenérico, interespecífico e intraespecífico, auxiliando no acompanhamento das populações, na seleção de linhagens, em estudos populacionais e de distribuição geográfica, entre outras.

Neste sentido, a utilização da técnica de RAPD, para identificação de

linhagens entomopatogênicas e avaliação da variabilidade genética do fungo *Nomuraea rileyi*, pode ser uma ferramenta de grande importância.

No Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, na Divisão de Controle Biológico, foram testados sessenta primers, pertencentes aos kits X,Y e W da Operon Technologies. O processo de seleção ou triagem de primers foi realizado em duas etapas. Numa primeira fase, os sessenta primers foram utilizados para amplificação de fragmentos na linhagem Sa 86101, avaliando-se o número de fragmentos amplificados e a sua intensidade. Desta forma, foram selecionados vinte oligonucleotídeos, que mostraram potencial para análise de RAPD em *N. rileyi* (Rossato, 1996).

Vinte primers foram selecionados para proceder à segunda etapa, no processo de triagem. Estes primers, listados na Tabela 1, amplificaram de 5 a 18 fragmentos, sendo a maior parte deles de intensidade elevada. Esta frequência, de 33% aproximadamente, encontra-se dentro daquelas observadas por outros autores em diversos organismos. No caso específico de fungos filamentosos podem ser citados os trabalhos de Strogman e Mackay (1993), com *Hirsutella* e Moeller e Harling (1996), em *Plasmodiophora brassicae*.

TABELA 1. Primers selecionados por número de bandas e número de bandas polimórficas (asterisco).

PRIMER	SEQÜÊNCIA	Nº DE BANDAS	Nº BANDAS POLIMÓRFICAS	% DE POLIMORFISMO
OPW-01	CTCAGTGTCC*	11	111,11	
OPW - 03	GTCCGGAGTG*	9	2	22,22
OPW - 04	CAGAAGCGGA*	18	2	11,11
OPW - 06	AGGCCCGATG*	15	3	20,00
OPW - 13	CACAGCGACA*	10	1	7,70
OPW - 19	CAAAGCGCTC	9	0	0,00
OPX - 04	CCGCTACCGA	6	0	0,00
OPX - 06	ACGCCAGAGG*	9	1	11,11
OPX - 07	GAGCGAGGCT*	9	2	22,22
OPX - 11	GGAGCCTCAG*	8	1	12,50
OPX - 13	ACGGGAGCAA*	11	2	18,18
OPX - 17	GACACGGACC*	13	3	23,07
OPX - 18	GACTAGGTGG*	12	3	25,00
OPX - 20	CCCAGCTAGC*	5	1	20,00
OPY - 01	GTGGCATCTC	6	0	0,00
OPY - 05	GGTGGGAGCA	8	2	0,00
OPY - 07	AGAGCCGTCA*	11	3	27,27
OPY - 08	AGGCAGAGCA*	10	5	50,00
OPY - 10	CAAACGTGGG*	10	1	10,00
OPY - 14	GGTCGATCTG	7	0	0,00

\* Primers selecionados para análise de polimorfismo.

A identificação de organismos através da utilização de marcadores moleculares tem como objetivo a discriminação de distintos genótipos entre grande número de indivíduos. Para tanto, é necessária a seleção de um número mínimo de marcadores, que permitam a caracterização e individualização de cada genótipo, reduzindo, desta forma, o tempo, o trabalho e os custos do processo. Assim sendo, após a seleção dos primers capazes de detectar polimorfismos, selecionou-se um número mínimo de primers, para permitir a identificação de linhagens de *Nomuraea rileyi* analisados.

O poder de detecção de polimorfismo do ensaio de RAPD é, na grande maioria dos casos, uma vantagem significativa para a detecção de variabilidade genética, porém esta elevada sensibilidade pode, em alguns casos, limitar a sua capacidade de análise. Assim como para todos os tipos de marcadores, no caso marcadores RAPD, algumas bandas são fácil e claramente interpretadas, enquanto outras são ambíguas. Essa ambigüidade pode resultar em um baixo poder de um primer, específico em discriminar entre sítios de amplificação distintos, na competição entre diferentes sítios de amplificação por substrato e enzima, de maneira que a presença de certos segmentos possam interferir com a amplificação de outros, e de problemas relacionados com a padronização de condições de amplificação, variação de laboratório para laboratório (Penner et al., 1993; Wang & Cutler, 1993).

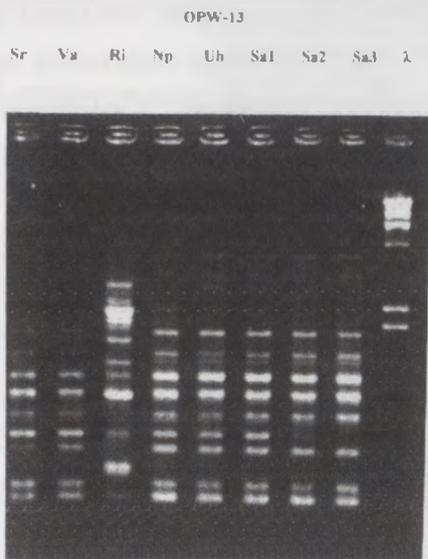


FIGURA 2. Padrão de amplificação para 7 linhagens do fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* em gel de agarose 1,4%: gerado pelo primer OPX-13 e OPY-07, reação em branco sem DNA; marcador de peso molecular (λ Hind III e Eco RI)

Dos primers selecionados (Tabela 1), três deles possibilitam a distinção entre as sete linhagens estudadas. Portanto, para seleções futuras de linhagens de *N. rileyi*, podem-se utilizar os primers OPW-04, OPX-17 e OPY-08. Em muitos trabalhos realizados, um número mínimo de primers é suficiente para permitir diferenciação, como por exemplo, em *Diospyros kaki*, no qual dois primers (Operon Technologies) foram suficientes para identificação dos quinze cultivares (Luo et al., 1995) e, num caso extremo, Fegan et al. (1993) mostraram que um único primer pode ser suficiente para a identificação de isolados de *Metarhizium anisopliae*.

Algumas linhagens mostraram fragmentos de RAPD idênticos para um ou dois primers, mas não para os três. Muitos trabalhos mostram uma variedade muito grande em relação a primers e polimorfismos. A utilização de um único primer com seqüência arbitrária pode possibilitar a análise de polimorfismo de DNA, sendo que um número definido de produtos de amplificação é gerado, devido ao fato de as seqüências parcialmente complementares à seqüência do primer estarem em fitas opostas no DNA (Williams et al., 1990). Para fungos, resultados semelhantes aos obtidos em *Nomuraea rileyi* têm sido observados nos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* (Bidochka et al., 1994)

A análise de sete linhagens do fungo *N. rileyi* foi realizada usando-se produtos de amplificação de primers selecionados. Utilizando a matriz de dados de leitura dos géis de eletroforese e considerando cada banda como uma variável, foi realizada a análise multivariada dos dados. Calculou-se uma matriz de similaridade, na qual podemos observar que todas as linhagens apresentaram alto grau de similaridade refletido num índice mínimo de 88%.

Os índices obtidos demonstraram baixa variabilidade dentro de linhagens de *N. rileyi* isoladas de *A. gemmatalis*. Dados semelhantes foram relatados recentemente para o fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, no qual isolados obtidos a partir do homóptero *Deois flavopicta* apresentaram nível de similaridade de 82%, enquanto que os isolados obtidos de solo apresentaram alta diversidade (Fungaro et al, 1996). Um outro caso apresentado sobre a baixa variabilidade em fungos isolados de um mesmo hospedeiro foi relatado no fitopatógeno *Botrytis*

*cinerea*, no qual os coeficientes de similaridade variaram de 83 a 94% (Van Der Vlugt - Bergmans et al., 1993). Este alto grau de similaridade deve estar, segundo Wyss & Bonfante, (1993), associado à alta pressão de seleção que estes fungos sofrem para manter-se no ambiente e infectar o hospedeiro. A baixa variabilidade obtida nas análises de RAPD confirmou os resultados iniciais obtidos em linhagens de *N. rileyi*, utilizando caracteres tais como atividade de enzimas extracelulares e virulência (Barros, 1995).

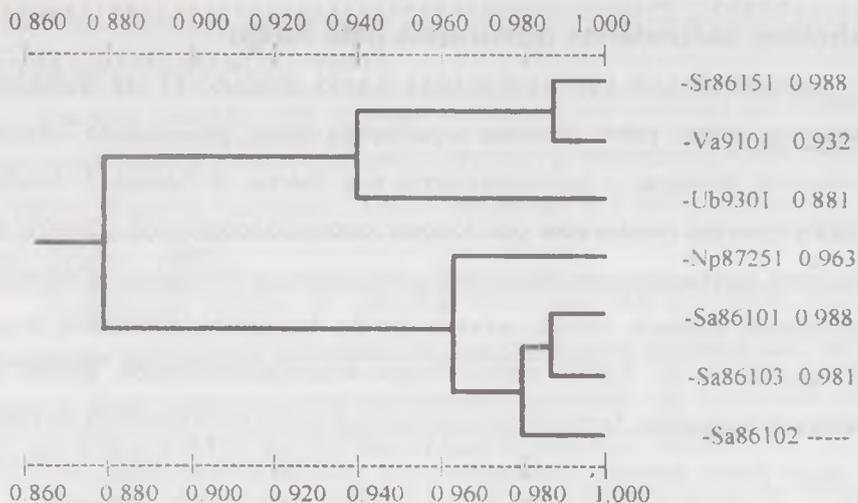


FIGURA 3. Agrupamento das 7 linhagens do fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi*.

Na Figura 3, mostra-se o dendrograma obtido a partir da análise dos RAPDs. Observam-se dois grupos com 88% de homologia, sendo o grupo I formado por Sr86151, Va9101 e Ub9301 e o grupo II formado por Np87251 e Sa86101, Sa86102, Sa86103. Pode-se verificar, através do dendrograma, uma alta homologia entre as linhagens do fungo *N. rileyi*. Estes resultados não são diferentes daqueles encontrados em outros fungos filamentosos; por exemplo: a comparação dos perfis de RAPD entre isolados de *M. flavoviride* provenientes de vários países não mostrou correlação com a origem geográfica, sendo que três isolados de *M. anisopliae* provenientes da mesma região mostraram menos similaridade entre si do que com isolados separados geograficamente (Fegan et al., 1993). Da mesma

TABELA 2. Principais toxinas produzidas por fungos entomopatogênicos

Toxina	Fungo	Descrição
Destruixinas	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Kodaira, 1961; Tamura et al., 1962,
	<i>Aschersonia spp</i>	Krasnoff et al., 1996.
Citocalasinas	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Aldridge & Turner, 1969; Natori, 1977
	<i>Zygosporium masonii</i>	Hayakawa et al., 1968
Viridoxinas	<i>Metarhizium flavoviride</i>	Gupta et al., 1993
Beauvericina	<i>Beauveria bassiana</i>	Hamil et al., 1969
	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Dorschner & Lardy, 1969
Enniatina	<i>Beauveria bassiana</i>	Ovchinnikov, 1974
Bassianolide	<i>Beauveria bassiana</i>	Suzuki et al., 1977
	<i>Verticillium lecanii</i>	Murakoshi et al., 1978
Efraeptinas	<i>Tolypocladium niveum</i>	Krasnoff & Gupta, 1992
NR-tox.	<i>Nomuraea rileyi</i>	Onofre, 1998
Ciclosporina	<i>Tolypocladium spp</i>	Weiser & Matha, 1988
	<i>Beauveria bassiana</i>	Matha et al., 1992
	<i>Paecilomyces farinosus</i>	Kadlec et al., 1994
Leucinostatinas	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Arai et al., 1973
	<i>Paecilomyces marquandi</i>	Rossi et al., 1983
	<i>Paecilomyces farinosus</i>	
Hirsutelinas	<i>Hirsutella thompsonii</i>	Mazet & Vey, 1995
Cordycepinas	<i>Cordyceps militaris</i>	Hanessian et al., 1966
Ácido oxálico	<i>Beauveria brongniartii</i>	Cordon & Schwartz, 1962
	<i>Beauveria bassiana</i>	Kodaira 1961, Kodaira, 1962
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Müller-Kögler, 1965

Ye et al. (1993) isolaram do micélio do fungo *N. rileyi*, após fermentação a 26°C, um peptídeo ativo sobre larvas de *Bombyx mory*, *Prodenra litura* e *Pieris rapae*. Com esse mesmo objetivo, Onofre (1998), utilizando meio de cultivo SMY, em cultura submersa com oxigenação contínua, usando solventes orgânicos e processos cromatográficos, isolou e purificou um peptídeo com as seguintes características: reação de ninhidrina positiva, ponto de fusão de 244°C, Rf de 0,37, usando como eluentes clorofórmio: metanol: acetato de etila (18:1:1). Este peptídeo (Figura 1), mostrou atividade antimicrobiana sobre bactérias gram positivas e gram negativas.

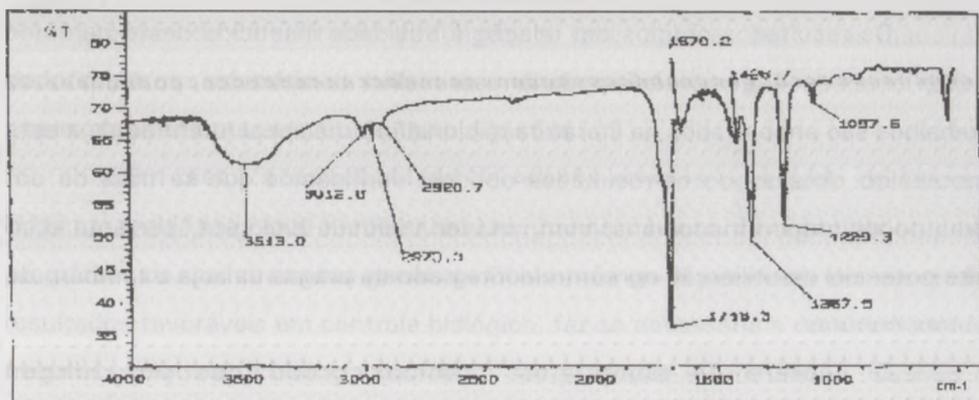


FIGURA 4. Infravermelho referente ao peptídeo produzido pelo fungo entomopatogênico *N. rileyi*.

Esse mesmo peptídeo foi avaliado no sentido de verificar sua atividade inseticida sobre larvas de 3º instar da lagarta da soja *A gemmatilis*. Os resultados mostraram que ele possui atividade inseticida sobre essas larvas, apresentando uma  $CL_{50}$  de 0,0085mg/ml, com um intervalo de confiança de (0,0034 - 0,0215) e um  $TL_{50}$  73,46 horas ou de aproximadamente 3 dias, com um intervalo de confiança de (32,1014 - 95,7342). Esses dados mostram que o peptídeo diminuiu o tempo letal em 50% em relação aos conídios desta mesma linhagem (SA - 86101), que foi de 6,48 dias (Barros, 1995). Esses resultados são observados na tabela 3.

TABELA 3. Médias da mortalidade (%) de larvas de 3º instar de *A gemmatilis* sob ação de extratos purificados produzidos pelo fungo *N. rileyi*, sob diferentes concentrações.

Conc <sup>3</sup> .	Mortalidade <sup>1</sup> (%)				
	12 <sup>2</sup>	24	48	72	120
Controle	0,00m	0,00m	0,00m	2,66m	2,66m
0,0001	0,00m	0,00m	0,00m	1,30lm	2,00lm
0,001	3,00jlm	4,66ijlm	5,66ghij	6,33ghi	10,00fghi
0,01	22,00de	29,00d	31,66d	37,66cd	40,00c
0,1	64,33b	70,00b	74,33b	77,66b	80,00ab
0,2	69,00b	70,00b	70,66b	76,00b	81,00ab
1,0	70,66b	72,33b	75,00b	77,33b	82,66ab

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Duncan (P < 0,05).

<sup>2</sup>Tempo de observação em horas.

<sup>3</sup>Concentração utilizada em mg/ml.

Os resultados obtidos em relação à atividade inseticida deste peptídeo sobre larvas de *A. gemmatalis* poderiam ser melhor comparados, porém poucos trabalhos são encontrados na literatura nacional/internacional referindo-se a este metabólito. Analisando os resultados obtidos, verificamos que se trata de um produto de origem microbiana, com notável atividade biológica, portanto com alto potencial de utilização no controle integrado de pragas da soja e também de outras culturas.

O número de compostos químicos produzidos por fungos entomopatogênicos é maior que o previamente esperado. A função da maioria desses compostos é ainda desconhecida. Apesar de se conhecer a atividade antimicrobiana e inseticida de metabólitos produzidos pelo fungo *N. rileyi*, sua estrutura química e seu modo de ação são desconhecidos.

Essas substâncias, mesmo desconhecidas, devem ser consideradas como instrumentos potencialmente muito importantes para o melhoramento de fungos entomopatogênicos na agricultura, visando ao controle integrado de pragas. Alguns podem ser utilizados como inseticidas, outros como antibióticos, outros ainda para aplicação em campo no controle de insetos. A forma mais importante de utilização de metabólitos ativos contra insetos produzidos por fungos entomopatogênicos está na identificação dos genes envolvidos na produção desses metabólitos e associados à mortalidade dos insetos e posteriormente manipulados para produzirem organismos mais virulentos, inserindo genes em linhagens pouco ativas. Outra área bastante promissora é a inserção de genes em plantas para produzir compostos ativos, produzindo, assim, plantas menos susceptíveis ao ataque de insetos.

## Conclusão

A utilização do fungo entomopatogênico *N. rileyi* como agente microbiológico do controle da lagarta da soja *A. gemmatalis* tem despertado interesse nos últimos anos devido, principalmente, às perspectivas crescentes da possibilidade de eficiência de controle aliada à diminuição do impacto ambiental causado pelos agrotóxicos. O estudo da relação patógeno/hospedeiro torna-se

completo quando da utilização de fungos, os quais apresentam várias maneiras de infecção, ao contrário de bactérias e vírus que infectam o hospedeiro quase que exclusivamente através do trato digestivo.

Além disto, a complexidade da relação envolve uma série de fatores bióticos e abióticos que apresentam um grande número de dificuldades para programas de melhoramento genético. Como o fungo *N. rileyi* tem demonstrado resultados favoráveis em controle biológico, faz-se necessária a continuidade de trabalhos relativos à biologia do fungo, sua produção e formulação, visando a sua utilização em programas de manejo integrado de pragas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRIDGE, D. C.; TURNER, W.B. Structure of cytochalasins. *Journal of the American Chemical Society*, p.923-928, 1969.
- ALVES, S.B. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.
- ARAI, T.; MIKAMI, Y.; FUKUSHIMA, K.; UTSUMI, T.; YARAZAWA, K. A new antibiotic, Leucinostatin, derived from *Penicillium lilacinum*. *Journal of Antibiotics*, v.26, p.157-161, 1973.
- BARROS, N. M. Variabilidade de linhagens de *N. rileyi* quanto a produção de enzimas extracelulares e virulência a lagarta da soja *A gemmatilis*. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 153p. Tese, Doutorado.
- BARTINICKI-GARCIA, S. Cell wall, composition and other biochemical markers in fungal phylogeny. In: HARBORNE, J.B., ed. *Phytochemical phytochemistry*. London: Academic Press, 1970. p.81-102.
- BERNARDINI, M.; CARILLI, A.; PACIONI, G.; SANTURBANO, B. Isolation of beauvericin from *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry*, v.14, p.1865, 1975.
- BIDOCHA, 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.
- BRUNS, T. D.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.22, p.252-564, 1971.
- CERENIUS, L.; THORNQVIST, P.O.; VEY, A.; JOHANSSON, M. W.; SODERHALL, K. The effects of the fungal toxin destruxin E on isolated crayfish hemocytes. *Journal of Insect Physiology*, v.36, p.785-790, 1990.
- CHARNLEY, A. K.; ST. LEGER, R. J. The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: COLE, G.T.; HOCH, M.C., ed. *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. New York: Plenum Press, 1991. p.267-286.
- CIANCIO, A. Observations on the nematocidal properties of some mycotoxins. *Fundamental and Applied Nematology*, v.18, p.451-454, 1996.
- CORDON, T. C.; SCHWARTZ, J.H. The fungus *Beauveria tenella*. *Science*, v.138, p.1265-1266, 1962.
- CRISAN, E.V. Mechanism responsible for release of toxin by *Metarrhizium anisopliae* spores in mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.17, p.260-264, 1971.
- DE GASPARI, N.; GOMEZ, S. A. Controle químico da lagarta da soja em condições de campo no Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.17, n.4, p.513-517, 1982.

- DIENER, L.U.; DAVIS, N. D. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. In: GOLDBLATT, L.A. **Aflatoxin**. New York: Academic Press, 1969. cap. 2.
- DORSHER, E.; LARDY, H. Specificity of ion transport induced by beauvericin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.19, p.11-14, 1969.
- DUMAS, C.; ROBERT, P.; PAIS, M.; VEY, A.; QUIOT, J.M. Insecticidal and cytotoxic effects of natural and hemisynthetic destruxins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.108, p.195-203, 1995.
- EL-SAYED, G. N.; COUDRON, T. A.; IGNOFFO, C.M. Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.54, p.394-403, 1989.
- ERLICH, H.; ARNHEIM, N. Polymerase chain reaction strategy. **Annual Review of Biochemistry**, v.61, p.131-145, 1992.
- FACCHIN, I. **Atividades enzimáticas de três linhagens do fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson e sua patogenicidade**. Caxias do Sul: UCS, 1989. 118p. Dissertação, Especialização.
- FACCHIN, I.; BARROS, N. M. Production of extracellular enzymes by *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, p.17-20, 1991.
- 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.
- FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C.; PIZZIRIANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. **Letters in Applied Microbiology**, v.22, p.389-392, 1996.
- GROVE, J.F.; POPE, M. The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. **Mycopathologia**, v.70, p.103-105, 1980.
- GUPTA, S.; KRASNOFF, S.B.; UNDERWOOD, N.L.; RENWICK, J.A.A.; ROBERTS, D.W. Structures of the efrapeptins: potent inhibitors of mitochondrial ATPase from the fungus *Tolyocladium niveum*. **Journal of the American Chemical Society**, v.113, p.707-709, 1991.
- GUPTA, S.; KRASNOFF, S.B.; RENWICK, J.A.A.; ROBERTS, D.W.; STEINER, J.R.; CLARDY, J. Viridoxins A and B: novel toxins from fungus *Metarhizium flavoviride*. **Journal of Organic Chemistry**, v.58, p.1062-1067, 1993.
- HACKMAN, R. H. Chemistry of the insect cuticle In: ROCKSTEIN, M., ed. **The physiology of insects**. 2. ed. New York: Academic Press, 1974. p.215-270.
- HAMILL, R.L.; HIGGINS, C.E.; BOAZ, H.E.; GORMAN, M. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. **Tetrahedron Letters**, v.49, p.4255-4258, 1969.
- HANESSION, S.; DEJONGH, D.C.; McCLOSKEY, J.A. Further evidence on the structure of cordycepin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.117, p.480-482, 1966.
- HAYAKAWA, S.; MATSUSHIMA, T.; KIMURA, T.; MINATO, H.; KATAGIRI, K. Zygospurin A, a new antibiotic from *Zygosporium masonii*. **Journal of Antibiotics**, v.21, p.523-524, 1968.
- HOFFMANN, C. B.; NEWMAN, G. C.; FOERSTER, L. A. Incidência estacional de doenças e parasitas em populações naturais de *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 e *Plusia spp.* em soja. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 8, n.1, p.115-124, 1979.
- HUSHAM, I. M.; LACKIE, A. M.; McCARKINDALE, N.J. Inhibitory effects of cyclodipeptide, destruxins, from the fungus *Metarhizium anisopliae* on cellular immunity in insects. **Journal of Insect Physiology**, v.35, p.97-105, 1989.
- IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C.; HOSTETTER, D.L. Effects of temperature on growth and sporulation of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Environmental Entomology**, v.5, p.935-936, 1976.
- IGNOFFO, C. M. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide. In: BURGESS, H.D., ed. **Microbial control of pests and plant diseases**. London: Academic Press, 1981. p.513-538.
- JEGOROV, A.; SEDMERA, P.; MATHA, V. Biosynthesis of destruxins. **Phytochemistry**, v.3, p.1403-1405, 1995.

- KADLEC, Z.; SIMEK, P.; HEYDOVA, A.; JEGOROV, A.; MATHA, V.; LANDA, Z.; EYAL, J. Chemotaxonomic discrimination among the fungal genera *Tolypocladium*, *Beauveria* and *Paecilomyces*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.22, p.803-806, 1994.
- KAIJIANG, L.; ROBERTS, D.W. The production of destruxins by the entomogenous fungus, *Metarrhizium anisopliae* var. major. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.47, n.3, p.120-122, 1986.
- KODAIRA, Y. Biochemical studies on the muscardine fungi in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of the Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu-University. Séries E Agriculture and Sericulture*, v.5, p.1-68, 1961.
- KODAIRA, Y. Studies on the new toxic substance to insects, destruxin A and B, produced by *Oospora destructor*. Part I. Isolation and purification of destruxin A and B. *Agricultural and Biological Chemistry Journal*, v.26, p. 36-42, 1962.
- KODAIRA, Y. Toxic substances to insects, produced by *Aspergillus ochraceus* and *Oospora destructor*. *Agricultural and Biological Chemistry Journal*, v.25, p.261-262, 1969.
- KRASNOFF, S. B.; GUPTA, S. Efrapeptin production by *Tolypocladium* fungi (deuteromycotina: Hyphomycetes): Intra- and interspecific variation. *Journal of Chemical Ecology*, v.20, p.293-302, 1992.
- KRASNOFF, S. B.; GIBSON, D.M.; BELOFSKY, G.N.; GLOER, K.B.; GLOER, J.B. New destruxins from entomopathogenic fungus *Aschersonia* sp. *Journal of Natural Products*, v.59, p.485-489, 1996.
- LECUONA, R. E. *Microrganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*. Argentina, 1996. 338p.
- LOGRIECO, A.; MORETTI, A.; ALTOMARE, C.; BOTTALICO, A.; TORRES, E. C. Occurrence and toxicity of *Fusarium subglutinans* from *Peruvia maize*. *Mycopathologia*, v.122, p.85-190, 1996.
- LUO, Z. R.; YONEMORI, K.; SUGIURA, A. Evaluation of RAPD analysis for cultivar identification of persimmons. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, v.64, p.535-541, 1995.
- MATHA, V.; JEGOROV, A.; WEISER, J.; PILLAI, J.S. The mosquitocidal activity of conidia of *Tolypocladium tundrense* and *Tolypocladium terricola*. *Cytobios*, v.69, p.163-170, 1992.
- MAZET, I.; VEY, A. Hirsutellin A, a toxic protein produced in vitro by *Hirsutella thompsonii*. *Microbiology*, v.141, p.1343-1348, 1995.
- MILCHEMORE, R. W.; HULBERT, S. H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Phytopathology*, v.25, p.383-404, 1987.
- MOELLER, M.; HARLING, R. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) profiling of *Plasmodiophora brassicae*. *Letters in Applied Microbiology*, v.22, p. 70-75, 1996.
- MOHAMED, A.K.A.; NELSON, F.R.S. Toxic effects of *Nomuraea rileyi* extract on *Heliothis* spp. *Journal of Agricultural Entomology*, v.1, p.349-353, 1984.
- MOREL, E.; PAIS, M.; TURPIN, M.; GUYOT, M. Cytotoxic of cyclo-dipeptide on murine lymphocytes and on L. 1210 leukemia cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v.37, p.183-185, 1983.
- MÜLLER-KÖGLER, E. *Pilzkrankheiten bei Insekten*. Berlin: Paul Parey, 1965. 444p.
- MURAKOSHI, S.; ICHINOE, M.; SUZUKI, S.; KANAOKA, M.; ISOGAI, A.; TAMURA, S. Presence of toxic substances in fungus bodies of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Applied Entomology and Zoology*, v.13, p.97-102, 1978.
- MYKUMI, T.; KAWAKAMI, K. Toxinas produzidas por *Nomuraea rileyi*. In: BURGESS, H.D., ed. *Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980*. New York: Academic Press, 1975. p. 450-451.
- MYOKEY, R.; SAMURAI, A.; CHANG, C.F.; KODAIRA, Y.; TAKAHASHI, N.; TAMURA, S. Aspochracin, a new insecticidal metabolite of *Aspergillus ochraceus*. Part I. Isolation, structure and biological activities. *Agricultural and Biological Chemistry Journal*, v.33, p.1491-1494, 1969.
- NATORI, S. Toxic cytochalasins. In: RODRICKS, J.V.; HESSELTINE, C. W.; MEHLMAN, M.A., ed. *Mycotoxins in human and animal health*. Park Forest South: Pathotox Publishers, 1977. p.559-581.

- ODIER, F.; VAGO, P.; QUIOT, J.M.; DEVAUCHELLE, G.; BUREAU J.P. Etude cytométrique des effets de la destruxine E sur des cellules leucémiques de souris. *Academic Science*, Paris, v.305, p.575-578, 1987.
- ONOFRE, S.B. Avaliação da atividade biológica de metabólitos produzidos pelo fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. Caxias do Sul: Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, 1998. 157p. Dissertação de Mestrado.
- OVCHNNIKOV, Y. A. Membrane active complexones. Chemistry and biological function. *Febs Letters*, v.44, p.01-21, 1974.
- PENNER, G. A.; BUSH, A.; WISE, R.; KIM, W.; DOMIER, L.; KASHA, K.; LAROCHE, A.; SCOLES, G.; MOLNAR, S.J.; PEDAK, G. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. In: *PCR methods and applications*. Cold Spring: Harbor Laboratory Press, 1993. p.341-345.
- POPRAWSKI, R.P.H.; MANIANIA, N.K. Susceptibility of the onin maggot, *Delia antiqua*, (Diptera: Anthomyiidae), to the mycotoxin destruxin. *Environmental Entomology*, v.117, p.801-802, 1985.
- RICHARD, J.L.; BENNETT, G. A.; MARACOS, C. M. Detection, identification, and surveillance of mycotoxins in cereals and other foods. *Fedrip Database* (NTIS), v.3, p.45-49, 1995.
- ROBERT, P.; RIBA, G. Toxic and repulsive effects spray, "per os" and systemic application of destruxins from submerged cultures. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.14, p.82-88, 1989.
- ROSSATO, M. Atividade enzimática e virulência dos isolados CH 87551 e Sa 86101 do fungo entomopatogênico *N. rileyi* (Farlow) Samson. Caxias do Sul: UCS, 1991. 65p. Trabalho de Graduação.
- ROSSATO, M. Caracterização molecular de linhagens do fungo *N. rileyi* (Farlow) Samson por Análise de RAPD. Caxias do Sul: USC- Instituto de Biotecnologia, 1996. 83p. Dissertação de Mestrado.
- ROSSI, C.; BENCIARI, Z.; CASINOVI, C.G.; TUTTOBELLO, L. Two phytotoxic, antibiotic peptides produced by submerged cultures of *Paecilomyces marquandii* (Masse) Hughes. *Phytopathology*, v.22, p.209-211, 1983.
- SILVA, M.T.B. Controle da lagarta da soja *A gemmatilis* Hubner Lepidoptera Noctuidae. Controle biológico natural. *Ciência Rural*, v.23, n.2, p.127-132, 1993.
- ST. LEGER, R.J.; MAY, B.; ALLEE, L. L.; FRANK, D.C.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Genetic differences in allozymes and in information of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungos *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.60, p. 89-101, 1992.
- ST LEGER, R. J.; STAPLES R.C.; ROBERTS, D.W. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isoenzymes. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.61, p. 81-84, 1993.
- STRONGMAN, D. B.; MACKAY, R. M. Discrimination between *Hirsutella longicolla* var. *longicolla* and *Hirsutella longicolla* var. *cornuta* using random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Mycologia*, v.85, p.65-70, 1993.
- SUZUKI, A.; KANOKA, M.; ISOGAI, A.; MURAKOSHI, S.; ICHINOE, M.; TAMURA, S. Bassianolide, a new insécticidal cyclodepeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Tetrahedron Letters*, v.25, p.2167-2170, 1977.
- TAMURA, S.; KUYAMA, Y.; KODAIRA, T.; HIGSHIKAWA, S. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.28, p.137-138, 1962.
- TURNIPSEED, S. G.; KOOGAN, M. Soyaben entomology. *Annual Review of Entomology*, v.21, p.247-282, 1976.
- VAN DER VLUGT-BERGMANS, C. J. B.; BRANDWAGT, B. F.; VAN'T KLOOSTER, J. W.; WAGEMAKERS, C. A. M. and VAN KAN, J. A. L. Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, v.97, p.1193-1200, 1993.
- VEY, A.; QUIOT, J.M.; VAGO, C.; FARGUES, J. Immunodepressive effect of fungal toxins inhibition of the reaction of multicellular encapsulation by destruxins. *Royal Academy of Science*, v.300, p.647-651, 1985.
- VEY, A.; QUIOT, J.M. Citotoxic effect of destruxins cyclodepeptide toxins produced by entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* investigated in vitro and in the insect host. *Canadian Journal of Microbiology*, v.35, p.1000-1008, 1989.
- WILCINSKAS, A.; MATHA, V.; GOTZ, P. Inhibition of phagocytic of plamatoctyes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. *Journal of Insect Physiology*, v.135, p.201-208, 1997.

- WANG, H.; QI, M.; CUTLER, A. J. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucleic Acids Research**, v.21, p. 4153-4154, 1993.
- WASTI, S.S.; HARTMANN, G.C. Host-parasite, Interactions between larvae of gypsy moth, *Lymantria dispar*, (L.) (Lepidoptera: Lymantridae) and the entomogenous fungus, *Nomuraea relewi* (farlow) SAMSON (Moniliales: moniliaceae). **Applied Entomology and Zoology**, v.13, n.1, p.23-28, 1978.
- WEISER, J.; MATHA, V. The insecticidal activity of cyclosporines on mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.51, p.92-93, 1988.
- WEST, E.J.; BUGGS, J.D. "In vitro" toxin product by the fungus *Beauveria bassiana* and bioassay in eater wax larval. **Journal of Economic Entomology**, v.61, p.684-87, 1968.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 6531-6535, 1990.
- WYSS, P.; BONFANTE, P. Amplification of genomic DNA of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. **Mycological Research**, v.97, p. 1351-1357, 1993.
- YE, M.Z.; HAN, G.Y.; FU, C.L.; BAO, J.R. Insecticidal toxin produced by the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi*. **Acta Agriculturae, Universitatis Zhejiangensis**, v.19, p.76-79, 1993.

Em 1989, a Environmental Protection Agency (EPA) dos Estados Unidos publicou um protocolo para testes de biopesticidas. Tais testes são mais apropriados para analisar os efeitos danosos potenciais à saúde humana. As empresas que quisessem registrar os produtos teriam que realizá-los e estes, por sua vez, seriam analisados pela agência. Nos estudos anteriores não havia padronização de procedimentos ou mesmo o estabelecimento do número de esporos viáveis no volume administrado aos animais. Outros países, como o Canadá, possuem legislação semelhante.

### **Protocolos de avaliação toxicopatológica**

A concessão de registro de AMCs pelos órgãos federais registrantes no Brasil está sujeita à prévia apresentação de dados que indiquem conclusivamente que o produto, quando usado de acordo com as prescrições, não causará efeitos significativamente adversos a seres humanos ou ao ambiente. Os documentos básicos relativos a este assunto são a Lei n 7.802, de 11/07/89, o Decreto nº98.816, de 11/01/90 e a Portaria 131, de 03/11/97, específica para o registro dos AMCs.

O protocolo se aplica a todos os microrganismos de ocorrência natural e àqueles que são estirpes obtidas através de seleção por métodos convencionais. O registro de microrganismos geneticamente modificados por processos biotecnológicos pode requerer testes adicionais aos estabelecidos neste protocolo, de acordo com a avaliação caso-a-caso feita pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança do Ministério de Ciência e Tecnologia – CTNBio (Decreto nº 1.752, de 20 de dezembro de 1995 regulamenta a Lei nº 8.974 de 5 de janeiro de 1995).

Os protocolos foram elaborados com o objetivo de viabilizar o registro dos produtos contendo agentes microbianos de controle de pragas no Brasil e são compostos de quatro volumes, cada um correspondendo a uma avaliação específica, como segue: informações sobre o produto e análise de resíduos; testes toxicopatológicos em mamíferos; testes toxicopatológicos em organismos aquáticos e testes toxicopatológicos em organismos não-visados do ambiente

terrestre.

### Testes Toxicopatológicos em Mamíferos

O protocolo estabelece diretrizes para a condução de testes com mamíferos, com o fim de se avaliar o potencial de efeitos indesejáveis causados por agentes microbianos de controle (AMCs). Embora várias espécies de mamíferos possam ser empregadas, devem ser preferidas linhagens de camundongos ou ratos comumente utilizadas em laboratório.

Estes testes são conduzidos em uma seqüência de três fases, considerando os seguintes aspectos:

1. Patogenicidade do AMC e de contaminantes microbianos;
2. Infectividade/persistência do AMC e de contaminantes microbianos;
3. Toxicidade do AMC, contaminantes microbianos e subprodutos de fabricação.

#### **Fase I**

O propósito dos estudos desta fase é realizar uma avaliação tóxicopatológica do AMC com respeito à patogenicidade, infectividade e toxicidade. As avaliações toxicopatológicas a serem conduzidas com o AMC puro e formulado são realizadas através de exposição aguda oral, pulmonar e intra-venosa. Um exame clínico cuidadoso de todos os animais deve ser feito pelo menos uma vez ao dia. No caso de vírus, deve-se realizar testes em cultura de tecidos. Outros estudos que são considerados apropriados para avaliar a toxicidade de componentes químicos de uma preparação de AMC devem ser realizados com a formulação completa de AMC, como toxicidade dermal aguda; irritação ocular primária; e relatos de hipersensibilidades ocasionais.

O relato de respostas alérgicas de seres humanos às preparações do AMC é tomado como suficiente para se considerar problemas de saúde a esses tipos de reação. Quando o AMC se constituir em um alergênico comum, o órgão registrante poderá requerer a declaração de precauções apropriadas no rótulo do produto.

Devem ser testados o produto técnico (PT) e o produto formulado (PF), como também o PT inativado. Em geral, a forma de um microrganismo a ser testado (ex.: célula vegetativa, esporo, cisto, vírion) deverá ser equivalente àquela presente no produto a ser registrado e àquele que se pretende registrar com respeito a estágio de crescimento, posse de organelas e apêndices e expressão de traços fenotípicos (incluindo produtos de genes que tenham sido intencionalmente introduzidos no microrganismo). Uma única dose de  $10^7$  a  $10^8$  unidades do AMC deve ser utilizada em volume apropriado à via de exposição.

Para a avaliação de infectividade e taxa de eliminação, o AMC deve ser detectado em tecidos, órgãos e fluidos corpóreos dos animais tratados por sexo, de todos os grupos, sacrificados três dias após a administração do AMC e semanalmente a partir de então; ou, dependendo do AMC testado, outro intervalo apropriado para que o número desses eventos seja suficiente para se estabelecer de forma adequada o padrão de eliminação. Dependendo do comportamento, da presença ou ausência do AMC nos tecidos e/ou fezes, podem ser incluídos outros intervalos de sacrifício, como o dia 1 no caso do microrganismo ser eliminado rapidamente.

## Fase II

Os estudos dessa fase somente serão desenvolvidos quando os testes da Fase I indicarem que o AMC mostrou infectividade ou toxicidade sem qualquer evidência de patogenicidade. No caso de serem observados efeitos tóxicos nos estudos da Fase I, na ausência de sinais de infectividade ou patogenicidade, serão então realizados estudos de toxicidade aguda pela mesma via de exposição com os componentes tóxicos da preparação de AMC. Os dados devem ser interpretados considerando as curvas de declínio dos microrganismos (clearance) obtidas e à luz de qualquer evidência que o AMC se multiplique no animal-teste.

A toxicidade de uma preparação de AMC a animais-teste pode ser causada por substâncias produzidas pelo AMC, por microrganismos contaminantes de suas formulações ou substâncias que são constituintes destas formulações. Esta fase fornece informações sobre os riscos à saúde devido a uma única exposição às toxinas ou aos componentes tóxicos derivados ou associados à

substância-teste. Os componentes tóxicos da preparação de AMC devem ser isolados e identificados. O objetivo de um estudo de toxicidade aguda é a determinação da  $DL_{50}$  por um período de 14 dias pós-tratamento.

A substância-teste é administrada em doses sucessivas a vários grupos de animais experimentais, usando-se uma dose por grupo, observando-se os possíveis efeitos e as mortes ocasionados. Os animais que sobreviverem serão sacrificados no final do teste para, junto com aqueles que morreram durante o teste, serem necropsiados. A substância-teste corresponderá a uma preparação apropriadamente isolada e purificada dos componentes tóxicos. A determinação da proporção dos componentes tóxicos será realizada por peso na substância-teste. As espécies ou linhagens de animais a serem utilizadas são aquelas para as quais os efeitos tóxicos foram observados nos estudos de toxicidade/patogenicidade da Fase I. Devem ser estudadas todas as vias (oral, dermal e pulmonar) nas quais se observou toxicidade nos estudos de toxicidade/patogenicidade aguda na Fase I. São necessários testes separados para cada via de exposição.

Os protocolos a serem utilizados são os já existentes para substâncias químicas e devem acompanhar o protocolo adotado pelo IBAMA para estudos de toxicidade de pesticidas químicos (Brasil, 1988).

A substância-teste deve ser administrada diariamente em uma dose alta por um período de pelo menos 90 dias consecutivos. Durante este período, os animais devem ser observados diariamente para se detectar sinais de toxicidade ou patogenicidade. Os animais que morrerem durante o teste, bem como os sobreviventes ao final do teste deverão ser sacrificados e necropsiados, tendo então, os tecidos, os órgãos e os fluídos corpóreos analisados para a quantificação da presença do AMC. Devem ser adotados os mesmos procedimentos da Fase I quanto à observação diária dos animais, a necrópsia e o exame patológico, a quantificação do AMC em órgãos, tecidos e fluidos corporais, além da elaboração do relatório.

O AMC deve ser quantificado em rins, fígado, cérebro, pulmões, baço, sangue e nódulos linfáticos representativos. É possível que outros tecidos,

órgãos e fluidos corpóreos tenham que ser examinados de acordo com a natureza dos efeitos tóxicos e patogênicos observados.

### Fase III

Em geral, se for determinado na Fase I que o AMC é patogênico para os animais-teste, o órgão registrante deve ser consultado para determinar a próxima ação a ser tomada. Os AMCs que são potencialmente patógenos de mamíferos não têm sido considerados como candidatos para registro como pesticidas. Entretanto, não é de todo descartável que patógenos desta natureza possam ser considerados para o desenvolvimento de AMCs, por exemplo, como rodenticidas. Em tais casos, devem ser realizadas considerações cuidadosas e avaliações extensivas dos efeitos patogênicos do AMC a mamíferos não-visados.

Os testes propostos para esta fase são efeitos sobre reprodução e fertilidade, estudos de oncogenicidade e de imunodeficiência, além de estudos de patogenicidade/infectividade em primatas.

Os estudos da fase III se destinam primariamente à avaliação do potencial de patogenicidade dos AMCs ou dos contaminantes microbianos de preparações de AMCs, que são reconhecidamente parasitas de células de mamíferos, ou que se mostraram parasitas intracelulares nos testes conduzidos nas fases anteriores. Os testes da fase III também podem ser apropriados para a avaliação de parasitas de mamíferos que tenham sido modificados geneticamente, de forma a torná-los não-patogênicos.

Os efeitos a serem estudados de um AMC sobre a reprodução, a fertilidade e no desenvolvimento embriofetal de uma geração de animais incluem a quantificação de fêmeas que não engravidam, o número de partos normais e o de reabsorções, o tamanho da prole, o período de prenhez, a mortalidade dos embriões e o peso dos descendentes. Também deve ser avaliada a transmissão do AMC dos pais aos descendentes. Tais dados são exigidos para o registro de cada PF quando for observada infectividade significativa nos testes subcrônicos da fase II, na ausência de sinais de toxicidade ou patogenicidade; o AMC é um vírus que pode persistir ou se replicar em culturas de linhagens de células de mamíferos; o AMC não pode ser adequadamente identificado taxonomicamente,

mas está relacionado a organismos reconhecidamente parasíticos às células de mamíferos; ou ainda a preparação de AMC não é suficientemente purificada, e existem indicações de que ela possa conter contaminantes que são parasitas de mamíferos.

Os órgãos, tecidos e fluidos corpóreos de cada pai devem ser avaliados no momento em que se confirmar que a mãe correspondente esteja prenhe. As mesmas avaliações devem ser feitas em cada mãe, logo após o nascimento dos filhotes e um dia após o nascimento dos descendentes.

Já o potencial para efeitos oncogênicos existe quando um componente da formulação de um AMC for um vírus que é reconhecidamente oncogênico para mamíferos, ou é muito relacionado a tais vírus; é capaz de transformar células de mamíferos no estudo conduzido com culturas de células; ou ainda os esforços para a caracterização de um vírus de um produto não forem suficientes para se concluir se ele é potencialmente oncogênico.

Estes dados são exigidos para o registro de cada PF ou PT quando o potencial para causar efeitos oncogênicos em mamíferos for indicado pela presença de certos componentes virais do produto. Os detalhes do teste serão decididos para cada caso, em consulta ao órgão registrante.

Quando um componente do AMC for um vírus que reconhecidamente possa interagir com os componentes do sistema imunológico de mamíferos, ou ainda quando for relacionado a tal tipo de vírus, deve ser avaliado o potencial de causar imunodeficiência em mamíferos.

Esses dados podem ser exigidos para o registro de um PF ou PT quando houver a indicação de que o produto possa causar um estado de imunodeficiência em mamíferos. Os detalhes do teste serão decididos para cada caso, em consulta ao órgão registrante.

Por último, os testes de infectividade/patogenicidade a primatas podem ser exigidos para o registro de cada PF ou PT quando o potencial de infectividade, patogenicidade, oncogenicidade ou imunodeficiência for indicado pela presença de certos parasitas intracelulares no produto; existir um potencial para efeitos adversos em primatas, nos casos em que um componente da

3. Grupos-testemunha tratados com AMCs inativados (produto técnico inativado) são utilizados para se avaliar as propriedades tóxicas. A inativação deve ser feita por um meio que permita a manutenção razoável da integridade estrutural do AMC.

### **Sacrifício de animais**

Para a avaliação de infectividade e taxa de eliminação, o AMC deve ser detectado em tecidos, órgãos e fluidos corpóreos de três animais tratados por sexo, de todos os grupos, sacrificados três dias após a administração do AMC e semanalmente a partir de então, ou dependendo do AMC testado, em outro intervalo apropriado para que o número destes eventos seja suficiente para se estabelecer de forma adequada o padrão de eliminação. Dependendo do comportamento, presença ou ausência do AMC nos tecidos e/ou fezes podem ser incluídos outros intervalos de sacrifício como o dia 1 no caso do microrganismo ser eliminado rapidamente.

### **Avaliações dos animais testados**

Um exame clínico cuidadoso de todos os animais deve ser feito pelo menos uma vez ao dia. Os animais devem ser pesados no início e término do experimento e semanalmente durante o teste. Outras observações a serem realizadas incluem:

1. Pele (incluindo sinais de irritação) e pêlo.
2. Olhos e mucosas.
3. Sistema respiratório.
4. Sistema circulatório.
5. Sistema nervoso periférico e central.
6. Atividade somatomotora.
7. Comportamento (atenção especial deve ser dada à ocorrência de tremores, convulsões, diarreia, letargia, salivação, sono e coma).

O momento da morte de cada animal deve ser anotado com a maior precisão possível. Os animais que morrerem durante o teste devem ser necropsiados.

## **Necrópsia e quantificação do agente**

Os animais devem ser sacrificados com éter ou CO<sub>2</sub>. Deve-se observar o aspecto geral dos animais antes da necrópsia. Devem ser anotadas quaisquer alterações nos tratos gastrointestinal e urogenital, coração, pulmões, baço, fígado, rins, cérebro e qualquer lesão deve ser removida para posterior avaliação por técnica histopatológica ou outra que seja adequada. A presença do agente deve ser quantificada nesses órgãos e tratos. A avaliação da eliminação do AMC nas fezes (*clearance*) deve ser realizada nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 após a exposição (ou outro intervalo apropriado, dependendo do caso), principalmente após a exposição por via oral. Os tecidos e/ou fluidos removidos assepticamente e as fezes coletadas diretamente do intestino reto do animal devem ser colocados em tubos estéreis, com 3,0ml de água peptonada (0,1%), pesados e homogeneizados para proceder à quantificação do agente. Após a administração intravenosa, seguindo-se os intervalos propostos durante o teste, é imprescindível a quantificação do agente no sangue. A sensibilidade do método de detecção do agente deve ser determinada e expressa como porcentagem de recuperação, além de observado o limite de detecção.

## **Relatório**

Os seguintes dados devem ser reportados:

1. Número de animais no início do teste.
2. Momento da morte de cada animal.
3. Número de animais mostrando sintomas de toxicidade ou patogenicidade.
4. Descrição de efeitos tóxicos e patogênicos.
5. Unidade do AMC utilizada e número destas unidades administrado por animal.

6. Peso corpóreo dos animais e idade.
7. Resultado das necrópsias.
8. Patologia/persistência encontrada.
9. Taxa de eliminação do AMC.
10. Descrição de todos os métodos de detecção e quantificação do AMC.
11. Verificação de que cada método de detecção é suficientemente sensível para a avaliação do AMC em tecidos, órgãos e fluidos corpóreos.

Deve-se incluir uma avaliação da relação entre a exposição à substância testada e a incidência e severidade de todas as anomalias, incluindo anomalias comportamentais, anomalias clínicas, lesões, alterações de peso corpóreo, mortalidade, intoxicações, infectividade e patogenicidade.

## **b. Patogenicidade/toxicidade oral aguda**

### **Objetivo**

Na avaliação de características tóxicas e patogênicas de um AMC, a determinação da patogenicidade/toxicidade oral aguda é normalmente o primeiro passo a ser tomado. Esta determinação fornece informações de riscos prováveis à saúde a partir de uma única exposição pela via oral. O objetivo deste estudo é fornecer informações iniciais sobre toxicidade, infectividade e patogenicidade de um AMC, utilizando-se uma única dose elevada do produto e observando-se os organismos tratados.

### **Características da dosagem do AMC**

1. Dose: uma única dose de pelo menos  $10^8$  unidades do AMC por animal tratado deve ser utilizada. Se menor, o requerente deve justificar a razão para tal.

2. Quantificação da dosagem: técnicas utilizadas para quantificar as unidades de AMC em uma dose dependerão do grupo de microrganismo ao qual o AMC pertence. Quando possível, deve-se determinar a quantidade de unidades viáveis, potencialmente viáveis ou infectivas em cada dose.

3. Veículo: o veículo recomendado para PT é qualquer um que permita a manutenção da viabilidade, a capacidade de germinação, a capacidade de evolução do cisto ou, para parasitas intracelulares, a capacidade de infecção no hospedeiro.

4. Volume: o máximo volume de líquido que pode ser administrado de uma só vez depende do tamanho do animal testado. Em roedores, o volume não deve exceder 2ml/100g de peso corpóreo. A variabilidade do volume testado deve ser minimizada.

### **Administração**

1. Os animais devem ser mantidos em jejum durante a noite anterior à administração da substância. Após a administração, o animal ainda deverá ser mantido em jejum por mais 3 ou 4 horas.

2. O AMC deve ser administrado oralmente por gavagem em uma única vez.

3. Se não for possível a administração de uma única dose, esta pode ser dada em porções menores durante um período não superior a 24h. Neste caso, pode ser necessário oferecer alimento e água aos animais durante esse período, dependendo de sua duração.

### **c. Patogenicidade/toxicidade dermal aguda**

#### **Objetivo**

Este teste fornece informações sobre os riscos prováveis de uma única aplicação dermal de químicos, na forma sólida ou solúvel, presentes na preparação do AMC e/ou associados a outros ingredientes em formulações de AMC e/ou associados a produtos de material genético intencionalmente introduzido no AMC.

## **Características da dosagem do AMC**

1. Dose: a substância-teste deve ser aplicada à razão de 2g/animal-teste. Se uma dose menor for utilizada, o requerente deverá justificar.

2. Veículo: quando necessário, a formulação a ser testada deve ser suspensa em um veículo, de preferência em uma solução aquosa. O veículo recomendado para o PF usualmente é o mesmo material no qual o AMC será misturado, suspenso ou diluído para aplicação no campo.

3. Volume: o conteúdo de umidade do material-teste não deve ser excessivo, mas apenas suficiente para evitar secagem significativa do material-teste durante o período de exposição e para assegurar um bom contato com a pele.

## **Preparação da pele do animal**

Aproximadamente 24 horas antes do teste, o pêlo deve ser removido da porção dorsal e ventral do corpo do animal, através de tosquia ou raspagem.

Pelo menos 10% da superfície do corpo devem ser preparadas para receber a aplicação da substância. O peso do animal deve ser considerado ao se decidir a área a ser preparada.

## **Administração**

1. A substância-teste deve ser aplicada uniformemente sobre uma área correspondente a aproximadamente 10% da superfície total do corpo do animal.

2. A substância-teste deve ser mantida em contato com a pele com uma gaze e uma fita adesiva não-irritante durante as 24 horas de exposição. O local de exposição deve ser coberto de forma a evitar que o animal ingira a substância-teste. Podem ser utilizados restritores, evitando-se, assim, a imobilização total do animal.

3. No final do período de exposição, a substância-teste residual deve ser removida com água.

Ao final do período de exposição, e diariamente a partir de então, devem ser anotados quaisquer sinais de irritação da pele indicando a sua extensão e intensidade. Quanto ao relatório, nesse teste são dispensáveis as informações referentes à taxa de eliminação do agente e ao método de detecção, uma vez que assume-se que ele não penetraria na pele íntegra. Entretanto, é necessário informar o peso seco do material-teste aplicado por kg de peso corpóreo de cada animal.

#### **d. Patogenicidade/toxicidade pulmonar aguda**

##### **Objetivo**

Este teste é necessário para o registro do PF, fornecendo informações sobre possíveis riscos de uma única exposição via pulmonar, no que se refere à toxicidade, infectividade e patogenicidade de um AMC aplicado em uma única dose alta.

##### **Características da dosagem do AMC**

1. Dose: uma dose de pelo menos  $10^8$  unidades de AMC por animal-teste deve ser utilizada. Se a dose utilizada for menor, o requerente deve justificar a razão para tal.

2. Volume: o máximo volume de líquido que pode ser administrado via intra-nasal ou intra-traqueal, de uma só vez, depende do tamanho do animal-teste. Em roedores, o volume usualmente não deve exceder 0,3ml/100g de peso corpóreo. A variação do volume utilizado deve ser a menor possível.

##### **Administração**

A substância-teste deve ser administrada através de um sistema apropriado em uma única dose, de cada animal-teste na dependência do diâmetro médio aerodinâmico das partículas, que pode ser suficiente para se preferir a exposição intra-traqueal (através de um laringoscópio) ou a instilação intra-nasal (através de cânula apropriada).

## **e. Patogenicidade/toxicidade intravenosa aguda**

### **Objetivo**

Este teste é exigido para o registro de PT e PF. Os dados obtidos nele fornecem informações sobre possíveis riscos de uma única exposição, sobrepondo-se artificialmente à barreira supostamente oferecida pela pele à entrada do AMC. O objetivo do teste é fornecer informações iniciais sobre a toxicidade, infectividade e patogenicidade de um AMC, usando-se uma dose alta do produto.

### **Características da dosagem do AMC**

1. Dose: uma dose de pelo menos  $10^7$  unidades de AMC por animal-teste deve ser utilizada. Se a dose utilizada for menor, o requerente deve justificar a razão para tal.
2. Volume: o volume máximo de líquido que pode ser administrado via intravenosa, de uma só vez, depende do tamanho do animal-teste. A variação dos volumes utilizados no teste deve ser a menor possível.

### **Administração**

A substância-teste deve ser administrada através de agulha e seringa em uma única dose. Se uma única dose não for possível, a dose pode ser administrada em frações menores em um período máximo de 24 horas.

## **f. Irritação ocular primária**

### **Objetivo**

Este teste é exigido para o registro do PF. Os dados obtidos nele fornecem informações sobre possíveis riscos de uma única exposição dos olhos ao AMC, aos ingredientes inertes de sua formulação e/ou produtos de genes intencionalmente introduzidos no AMC.

## Metodologia

Cada formulação do AMC, conforme descrito a seguir, é aplicada a um olho de cada animal experimental. O olho não-tratado serve como testemunha. O grau de irritação é observado avaliando-se sua extensão e intensidade a intervalos preestabelecidos.

## Substância a ser testada

A formulação não precisa ser testada quando contiver substâncias de propriedades corrosivas e, por exemplo, produzir corrosão ou irritação severa no teste de patogenicidade/toxicidade dermal aguda. Tal fato deve constar do rótulo do produto para alertar os aplicadores na ocasião de sua utilização.

## Animais a serem utilizados

Espécie e linhagem: Deve ser dada preferência ao uso de coelhos albinos.

Número e idade: Pelo menos 6 animais adultos devem ser utilizados, a menos que exista uma justificativa plausível para a utilização de um número menor de animais.

## Grupos-testemunha

1. Não é exigida a manutenção de um grupo separado de animais-testemunha, uma vez que cada animal serve como seu próprio controle;
2. É exigido um grupo-testemunha para a substância-veículo do AMC, quando houver indicação de que o veículo possa causar qualquer reação ocular tóxica ou se o efeito ocular do veículo for desconhecido.

## Características da dosagem do AMC

1. Dose: uma dose de pelo menos  $10^7$  unidades de AMC por animal-teste deve ser utilizada para cada olho tratado. Se a dose utilizada for menor, o requerente deve justificar a razão para tal e o número de unidades de AMC no PF deve ser registrado por ocasião do teste.

2. Volume: um volume de 0,1 ml deve ser usado quando o produto a ser testado corresponde a uma suspensão pouco densa do AMC. Quando o produto a ser testado é um sólido ou uma pasta fluída, deve ser usado 0,1 g, a menos que haja uma justificativa aceitável para o uso de quantidade diferente.

## **Exame dos olhos antes do teste**

Ambos os olhos de cada animal provisoriamente selecionado devem ser examinados durante as 24 horas que precedem o teste. Qualquer animal mostrando irritação ou infecção no olho, defeitos oculares ou sinais de injúrias na córnea não deve ser utilizado.

## **Administração**

A substância-teste deve ser colocada no saco conjuntivo de um olho de cada animal, puxando-se para baixo a pálpebra inferior do olho a ser tratado. As pálpebras são então juntadas por cerca de um segundo para evitar a perda do material. Uma anestesia local para reduzir a dor pode ser utilizada antes da instilação da substância-teste, contanto que se apresentem evidências de que tal anestésico não influencia as reações da substância-teste. O olho-testemunha também deve ser anestesiado.

Os olhos dos animais tratados não devem ser lavados até 24 horas da instilação; após este período, a água morna pode ser utilizada para lavar os olhos.

## **Observação dos animais tratados**

A duração do período de observação não deve ser inflexível, mas suficiente para se assegurar da reversibilidade ou irreversibilidade dos efeitos observados. Normalmente este período não precisa ser maior que 21 dias após a instilação.

## Exame clínico e julgamento dos resultados

Os olhos de todos os animais devem ser examinados para se verificar lesões 1, 24, 48 e 72 horas, e 4 e 7 dias após o tratamento. Caso se observe irritação aos 7 dias, outros exames devem ser feitos a cada 3 dias a partir de então, por um período total de 21 dias. Se não houver evidência de irritação no sétimo dia após o tratamento, o estudo deve ser encerrado. Além das observações da córnea, íris e membrana conjuntiva, qualquer outro tipo de lesão deve ser relatado. A região periocular também deve ser examinada para se observar possíveis lesões. Devem se atribuir notas às lesões oculares de acordo com a Tabela 2 proposta por Draize et al. (1965).

O exame de reações pode ser facilitado pelo uso de instrumentos óticos. Depois da observação realizada 24 horas após o tratamento, os olhos dos animais podem ser examinados com fluorescina.

TABELA 2. Graus de lesões oculares

Córnea	
<b>(A) Opacidade: grau de intensidade (área mais densa usada para leitura)</b>	
Sem ulceração ou opacidade:	0
Áreas de opacidade dispersas ou difusas, detalhes da íris visíveis:	1
Áreas translúcidas facilmente perceptíveis, detalhes da íris levemente obscurecidos:	2
Áreas nacaradas, detalhes da íris invisíveis, tamanho da pupila pouco perceptível:	3
Córnea opaca, íris não-perceptível devido à opacidade:	4
<b>(B) Área afetada da córnea</b>	
Nenhuma	0
0 a 1/4	1
maior que 1/4 e menor que 1/2	2
maior que 1/2 e menor que 3/4	3
maior que 3/4	4

Escore = A X B X 5

Máximo total possível = 80

<b>Íris</b>	
Normal	0
Pregas profundamente marcadas, congestão, inchaço, hiperemia moderada ao redor da córnea, (quaisquer destas alterações ou combinações delas), íris com reação à luz (reação lenta é positiva)	1
Sem reação à luz, hemorragia, destruição total (qualquer uma ou todas)	2

Escore = A X 5

Máximo total possível = 10

<b>Conjuntiva</b>	
<b>(A) Avermelhamento (refere-se à conjuntiva palpebral e bulbar)</b>	
Vasos sangüíneos normais	0
Alguns vasos sangüíneos hiperêmicos	1
Coloração vermelho-difusa, vasos individuais não facilmente perceptíveis	2
Coloração vermelho forte, difusa	3
<b>(B) Quemose (pálpebra e/ou membrana nictitante)</b>	
Sem inchaço	1
Inchaço acima do normal (incluindo membrana nictitante)	2
Inchaço evidente com eversão parcial das pálpebras	3
Inchaço com pálpebras semicerradas	4
Inchaço com pálpebras mais que semicerradas	
<b>(C) Secreção</b>	
sem secreção	0
qualquer quantidade diferente do normal	1
com umedecimento das pálpebras e pêlos adjacentes	2
com umedecimento das pálpebras e pêlos adjacentes, mas com área considerável ao redor dos olhos	3

Escore = (A + B + C) x 2

Máximo total possível = 20

### Total Máximo de Escores

O total máximo dos escores é a soma de todos os escores obtidos para córnea, íris e conjuntiva.

### Relatório

Os dados devem ser apresentados em forma tabular, mostrando para cada animal:

1. O grau de irritação (de acordo com a Tabela 2) a cada observação.
2. A descrição do grau e da natureza da irritação.
3. A presença de lesões severas.
4. Quaisquer outros efeitos além dos efeitos oculares.

O grau de irritação do olho deve ser avaliado em conjunto com a natureza e irreversibilidade das respostas observadas. As notas individuais não representam a determinação absoluta das propriedades irritantes de um material. Elas devem ser vistas como valores de referência e apenas têm significado quando acompanhadas de uma descrição adequada e de uma avaliação das observações.

Os seguintes dados devem ser relatados:

1. Descrição da natureza física da substância-teste.
2. Unidades do AMC na dose de cada formulação testada e o peso da substância-teste em cada dose.
3. Espécie e linhagem do animal testado.
4. Descrição narrativa do grau e da natureza da irritação, corrosão, lesão ou infecção observada.
5. Descrição de qualquer efeito não ocular observado.
6. Descrição do método utilizado para avaliar a irritação.

#### **g. Relato de hipersensibilidade**

Dados sobre a ocorrência de hipersensibilidade, incluindo reações imediatas e retardadas em seres humanos e animais domésticos, durante a produção ou teste do PT ou PF, devem ser relatados para subsidiar a solicitação de registro.

## **Relatório**

Os requisitos para o relatório destes incidentes devem ser os mesmos que aqueles nos protocolos existentes para pesticidas químicos. Se quaisquer incidentes de hipersensibilidade de seres humanos ou animais domésticos forem

observados durante a produção ou realização dos testes, será necessária a realização de testes da fase II. As exigências específicas a serem consideradas na fase II dependerão da natureza das observações e serão determinadas em consulta ao órgão registrante.

Quando disponíveis, as seguintes informações devem ser fornecidas:

1. Uma descrição dos ingredientes (incluindo o AMC ao qual o indivíduo afetado foi exposto).
2. Frequência, via e duração da exposição ao material.
3. Data, horário e local geográfico da exposição ao material.
4. Situação ou circunstâncias sob as quais a exposição ocorreu.
5. Quaisquer observações clínicas.

#### **h. Cultura de células (para vírus como agente de controle)**

### **Objetivo**

Obter informações sobre a habilidade de agente de controle viral em infectar, replicar, transformar ou causar toxicidade em células de mamíferos para o registro de PT ou PF.

### **Definições**

1. Forma mais infectiva (FMI): a forma ou preparação de vírus que produz infecção máxima em cultura de células suscetíveis ou em organismos. Para vírus não oclusos, o FMI pode ser um vírus purificado ou os tecidos purificados obtidos de um hospedeiro infectado. Para vírus oclusos (por exemplo baculovírus, vírus de poliedrose citoplasmática, vírus entomopox), o FMI para cultura de células ou injeção em um organismo é um vírus extracelular encontrado em meio de cultura de célula ou em hemolinfa. A FMI para insetos hospedeiros, suscetíveis através da via natural de infecção (alimentação), é o corpo de inclusão viral.

2. Toxicidade viral: a habilidade de um vírus em causar injúria ou dano em uma célula hospedeira quando a infecção e/ou multiplicação não são necessariamente exigidas. A toxicidade pode ser também a habilidade de componentes não-virais de uma preparação de causar injúria ou dano a uma célula hospedeira.

3. Infectividade viral: a habilidade de um gene viral de se estabelecer em um geneoma celular hospedeiro, ou habilidade de genes virais de serem expressos em uma célula hospedeira (resultando na produção de ácidos nucléicos codificados por vírus).

4. Transformação: a modificação detectável do fenótipo de uma célula hospedeira induzida pela presença de ácido nucléico viral. Células transformadas são consideradas infectadas pelo vírus.

5. Efeito citopático (EC): qualquer dano ou injúria a uma célula hospedeira resultante da infecção de uma célula por vírus. Esses efeitos podem ser morfológicos ou bioquímicos e incluem crescimento celular, fixação, morfologia, tamanho e forma do núcleo, processos celulares (como síntese macromolecular) etc.

## **Substância a ser testada**

Deve ser utilizada a forma mais pura e mais infectiva do vírus. As preparações de vírus de insetos só podem conter hemolinfa nos casos em que esta tenha sido determinada como não-tóxica para a cultura de células utilizada. O inóculo deve ser quantificado pelo ensaio mais sensível possível e pelo sistema hospedeiro mais permissível possível (cultura de células ou, se possível, organismo hospedeiro). É requerido um mínimo de cinco unidades formadoras de placas (UFP) por célula, para testes em sistemas modelo, quando um ensaio de placas for disponível para o trabalho com o vírus. Quando esse ensaio não for possível, torna-se necessário sete vezes o número de unidades correspondente à  $DL_{50}$ . O requerente deverá apresentar uma justificativa convincente para utilizar um número menor de unidades por células.

## Cultura de células

São recomendadas as seguintes células e/ou linhagens: (1) uma linhagem humana, (2) um tipo primário de células, (3) uma linhagem contínua de primata, (4) embrião de hamster sírio (para fornecer dados sobre a transformação celular, descrita abaixo) e (5) uma outra linhagem de células que deve ser selecionada para avaliar possíveis problemas intrínsecos do agente de controle viral específico e outros problemas relacionados a seu uso. Deve-se apresentar a justificativa para a seleção desta última linhagem de células.

## Relatório

As seguintes informações devem ser fornecidas para cada teste:

### 1. Efeito Citopático (EC) em células de camadas individuais:

I. A ocorrência de EC deve ser descrita de forma que a destruição celular causada pelo vírus seja diferenciada de efeitos não-específicos.

II. As culturas devem ser inspecionadas sob microscópio, para fornecer evidências da ocorrência de EC, que devem ser relatadas como:

1 + = sugestivo de modificações morfológicas induzidas pelo vírus;

2 + = modificações morfológicas definitivas;

3 + = degeneração de mais de 50% das células;

4 + = destruição completa das células.

III. O valor da dose que causa o efeito estudado em 50% das células deve ser calculado por um método estatístico apropriado. Para o cômputo dos resultados de infectividade, somente culturas apresentando EC igual ou superior a 2 são consideradas infectadas.

## 2. Avaliação toxicológica

I. Detalhes de todos os procedimentos utilizados, incluindo reagentes e materiais e a sensibilidade e as limitações dos ensaios

II. A eficiência dos dados de plaqueamento de culturas tratadas com o vírus e culturas tratadas com o meio para vertebrados (culturas-testemunha) e invertebrados.

III. Prevenção do processo mitótico ou de interferência com a replicação cromossômica, como indicado, por exemplo, por reduções significativas na eficiência de plaqueamento.

3. Ensaio de fluido de cultura: detalhes dos procedimentos utilizados, incluindo uma discussão de todos os dados que indicarem replicação viral.

4. Dados de ensaio de virose.

I. Detalhes dos procedimentos utilizados para a detecção de antígenos e ácidos nucleicos virais e sua persistência na cultura, incluindo reagentes e materiais apropriados e sensibilidade e limitações do ensaio.

II. Concentração intracelular de antígenos e ácidos nucleicos virais, relatados como uma função do número de células (isto é, o número de genoma viral/célula).

5. Ensaio de transformação celular:

I. Detalhes dos protocolos utilizados no ensaio de transformação celular e referências relativas ao ensaio, se existirem.

II. Dados da testemunha, incluindo os resultados da eficiência de plaqueamento.

III. Dados sobre formação de tumores em animais-teste, caso este estudo seja exigido.

6. Informações gerais sobre todos os testes:

I. A origem de todas as linhagens celulares utilizadas;

II. Evidência da falta de agentes adventícios em linhagens celulares;

III. Informações sobre a estabilidade genética de linhagens celulares contínuas e sobre doadores de células primárias.

Se os dados mostrarem que a preparação do agente viral é tóxica para quaisquer culturas celulares, mas não infecta, se replica ou transforma quaisquer culturas celulares, então:

1. Deverão ser identificados os componentes tóxicos da preparação.
2. É necessário um estudo de toxicidade aguda para os componentes tóxicos (descrito neste protocolo).

Se o agente viral infectar quaisquer culturas celulares, podem ser necessários estudos sobre os efeitos na reprodução e fertilidade, na oncogenicidade, no potencial de causar imunodeficiência e na infectividade/patogenicidade em primatas.

## Testes da Fase II

### Procedimentos gerais para os testes

#### a. Toxicidade Aguda

#### Objetivo

Esta fase fornece informações sobre os riscos à saúde devido a uma única exposição às toxinas ou aos componentes tóxicos derivados ou associados à substância-teste. Os componentes tóxicos da preparação de AMC devem ser isolados e identificados.

Estes dados são exigidos para o registro do PF e do PT quando forem observados sinais significativos e persistentes de toxicidade na Fase I e na ausência de sinais significativos de infectividade ou patogenicidade.

O objetivo de um estudo de toxicidade aguda é a determinação da  $DL_{50}$ , seus limites estatísticos e o ângulo de inclinação, constatados através das observações em um período de 14 dias pós-tratamento.

#### Definições

1. Toxicidade aguda: é o efeito adverso que ocorre da administração de uma única dose de um componente, ou componentes, da substância testada.
2.  $DL_{50}$ : corresponde à dose estatisticamente calculada de uma

substância que causa a morte de 50% dos animais expostos. É expressa em termos de peso das substâncias testadas por unidade de peso do animal e também em termos da proporção (peso/peso) do(s) componente(s) na substância-teste por unidade de peso do animal.

## **Metodologia**

A substância-teste é administrada em doses sucessivas a vários grupos de animais experimentais, usando-se uma dose por grupo, observando-se os possíveis efeitos e mortes ocasionados. Os animais que morrerem durante o teste devem ser necropsiados. Ao final do teste, os animais sobreviventes serão sacrificados e também necropsiados. Os protocolos a serem utilizados são os já existentes para substâncias químicas.

## **Substância-teste**

A substância-teste corresponderá a uma preparação apropriadamente isolada e purificada dos componentes tóxicos. A proporção por peso dos componentes tóxicos na substância-teste deve ser determinada e relatada.

## **Seleção dos animais**

As espécies ou linhagens de animais a serem utilizadas são aquelas para as quais os efeitos tóxicos foram observados nos estudos de toxicidade patogenicidade da Fase I.

## **Vias de exposição**

Devem ser estudadas todas as vias (oral, dermal e pulmonar) nas quais se observou toxicidade nos estudos de toxicidade/patogenicidade aguda na Fase I. São necessários testes separados para cada via de exposição.

## **b. Patogenicidade/toxicidade subcrônica**

### **Objetivo**

Este estudo fornece informações sobre riscos prováveis à saúde devido à exposição subcrônica a uma preparação de AMC.

Esses dados são necessários para o registro dos PT e PF quando for observada infectividade significativa e/ou persistência do AMC nos animais-teste, nos estudos da Fase I, na ausência de patogenicidade ou toxicidade significativa. Esses estudos também podem ser solicitados para fornecer informações sobre efeitos adversos devido a contaminantes microbianos ou subprodutos tóxicos em uma preparação de AMC.

### **Substância-teste**

1. O PT e o PF, se diferentes, devem ser testados.
2. Normalmente, a forma do AMC a ser testada será equivalente à forma utilizada no teste de patogenicidade/toxicidade aguda da Fase I, que demonstrou sinais significativos de infectividade ou persistência, mas não demonstrou sinais de patogenicidade ou toxicidade.

### **Seleção de animais**

**Espécie e linhagem:** as espécies ou linhagens dos animais a serem utilizadas são aquelas nas quais foi observada infectividade/ persistência do AMC nos estudos de toxicidade/patogenicidade aguda da Fase I, e nas quais nenhum sinal significativo de patogenicidade ou toxicidade tenha ocorrido.

**Idade:** devem ser utilizados adultos jovens e a variação de peso entre os animais não deve exceder 20% do peso médio de cada sexo.

**Sexo e número:** pelo menos 10 animais de cada sexo devem ser tratados com o AMC.

## Grupos-testemunha

Deve ser mantida, na medida do possível, a mesma divisão de grupos adotada na Fase I. O mínimo requerido é:

1. Um grupo-testemunha de animais não-tratados.
2. Um grupo-testemunha para a substância-veículo do AMC quando a toxicidade do veículo não for conhecida.
3. Um grupo controle tratado com AMC inativado para avaliação das propriedades tóxicas do AMC. Essa inativação deve ser feita por um meio que permita a manutenção razoável da integridade estrutural do AMC.

## Características da dosagem do AMC

1. Dose: uma única dose de pelo menos  $10^8$  unidades do AMC por animal tratado deve ser administrada diariamente a cada animal. Se a dose utilizada for menor, o requerente deve justificar a razão para tal.
2. Veículo: o veículo mais adequado é qualquer um que permita a manutenção da viabilidade, a capacidade de germinação, a capacidade de evolução do cisto e, em particular para parasitas intracelulares, a capacidade de infecção em um hospedeiro aceitável. O veículo recomendado para o PF é o mesmo material no qual o AMC será distribuído, misturado, suspenso ou diluído para aplicação em campo.

## Metodologia

A substância-teste deve ser administrada diariamente em uma dose alta por um período de pelo menos 90 dias consecutivos. Durante esse período, os animais devem ser observados diariamente para se detectar sinais de toxicidade ou patogenicidade. Os animais que morrerem durante o teste bem como os sobreviventes ao final do teste deverão ser sacrificados e necropsiados, tendo então, os tecidos, os órgãos e os fluídos corpóreos analisados para a quantificação da presença do AMC. Devem ser adotados os mesmos procedimentos da Fase I quanto à observação diária dos animais, à necropsia e ao exame patológico, à

quantificação do AMC em órgãos, tecidos e fluidos corporais, além da elaboração do relatório.

### **Observação dos animais tratados**

Um exame clínico cuidadoso de todos os animais deve ser feito pelo menos uma vez ao dia. Observações adicionais devem ser feitas também diariamente, no sentido de resgatar os dados dos animais que morrerem durante o estudo (isto é, necrópsia e registro do AMC destes), além do isolamento de animais fracos ou moribundos. O momento da morte de cada animal deve ser anotado com a maior precisão possível. O consumo de alimento e água deve ser determinado semanalmente durante o estudo.

### **Registro do AMC em tecidos, órgãos e fluidos corpóreos**

A presença do AMC em tecidos, órgãos e fluidos corpóreos deve ser avaliada utilizando-se técnicas quantitativas sensíveis nos animais que morrerem durante os estudos e, por ocasião da necrópsia, em animais que sobreviverem até o final do experimento. Os limites de sensibilidade do método empregado devem ser relatados.

O AMC deve ser quantificado em rins, fígado, cérebro, pulmões, baço, sangue e nódulos linfáticos representativos. É possível que outros tecidos, órgãos e fluidos corpóreos tenham que ser examinados de acordo com a natureza dos efeitos tóxicos e patogênicos observados.

### **Relatório**

Os seguintes dados devem ser relatados:

1. Número de animais no início do teste.
2. Momento da morte de cada animal.
3. Número de animais mostrando sintomas de toxicidade ou patogenicidade.

4. Descrição de efeitos tóxicos e patogênicos.
5. Unidade do AMC utilizada e número destas unidades administrado por animal.
6. Peso corpóreo dos animais e idade.
7. Consumo de alimento e água.
8. Resultado das necrópsias.
9. Patologias e infectividades encontradas.
10. Quantificação do AMC de tecidos, órgãos e fluidos corpóreos e métodos utilizados, sua sensibilidade e suas limitações de detecção.
11. Verificação de que cada método de quantificação é suficientemente sensível para servir na avaliação do AMC em tecidos, órgãos e fluídos corpóreos.

Deve-se incluir uma avaliação da relação entre a exposição à substância testada e a incidência e severidade de todas as anomalias, incluindo anomalias comportamentais, anomalias clínicas, lesões, alterações de peso corpóreo, mortalidade, intoxicações, infectividade e patogenicidade.

### **Estudos de avaliação de danos em organismos do ambiente aquático**

Um dos compartimentos ambientais mais vulneráveis à entrada de biopesticidas é o ecossistema aquático, sendo portanto importante o estabelecimento de métodos para se avaliar o risco destes agentes em organismos aquáticos não-alvo.

Diferentes aspectos têm sido considerados na execução de ensaios com biopesticidas quanto ao seu potencial de risco para o ambiente aquático, como os relacionados:

- a) ao local de aplicação, aquático ou terrestre, que orientam sobre o número de espécies a serem testadas;
- b) à dose de aplicação em campo, que orientam na escolha do valor da dose de exposição dos tratamentos durante o teste;

c) à capacidade de sobrevivência e replicação do agente biológico na água, que se refere aos testes a serem realizados na Fase II, como veremos neste capítulo.

Na avaliação de risco de sobre organismos aquáticos não-visados são sugeridos estudos com organismos representativos de ecossistemas do Brasil pertencentes a diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, tais como organismos fitoplanctônicos, zooplanctônicos e vertebrados aquáticos. Na escolha das espécies destes organismos para estudos de toxicidade/patogenicidade considera-se a ampla distribuição no território nacional, a facilidade de criação e manipulação em condições laboratoriais.

Na medida do possível, espécies representativas da região geográfica ou do ecossistema em que o agente biológico será aplicado devem ser utilizadas nos testes, principalmente espécies que mais provavelmente irão se alimentar dos organismos visados, quando estes estiverem infectados ou mortos. Um outro critério é a escolha do organismo-teste de espécies que no seu habitat natural sejam hospedeiras de microrganismos patogênicos que estejam filogeneticamente relacionados ao agente microbiano de controle biológico em estudo.

Espécies de peixes pertencentes aos gêneros *Hemigrammus*, *Cheirodon*, *Poecilia* e à família Characidae têm sido utilizadas, e recomendadas pelos órgãos reguladores e instituições de pesquisa do Brasil (CETESB, 1987; Brasil, 1988) para fins de análise de risco de descarga de efluentes industriais ou de contaminação de águas por agrotóxicos.

No Brasil, o órgão federal legislador tem sugerido a utilização de peixes pertencentes à família Characidae na avaliação toxicológica de agentes químicos, por ela possuir grande abrangência geográfica no território nacional. Todas essas espécies poderiam, portanto, serem usadas na avaliação de risco dos biopesticidas.

No caso de invertebrados aquáticos, recomenda-se selecionar um organismo que seja filogeneticamente relacionado à praga-alvo. Assim, quando se avaliar um biopesticida cuja praga-alvo seja um inseto, seria mais apropriada a escolha de um inseto aquático ou ainda de um artrópode como organismo-

teste.

O uso de microcrustáceos do gênero *Daphnia*, um cladocero, tem como vantagem o grande volume de informações disponíveis sobre a biologia e o cultivo desse organismo, assim como seu curto ciclo de vida biológico e alta sensibilidade a fatores externos. Outros invertebrados aquáticos que têm sido recomendados como organismo-teste são os pertencentes às ordens Copepoda, Ephemeroptera e Trichoptera (Pesticide, 1989).

A utilização de algas clorofíceas unicelulares dos gêneros *Selenastrum*, *Scenedesmus*, *Chlorella* e *Ankistrodermus* tem sido proposta para avaliar o risco sobre populações de produtores primários dentro de um sistema aquático.

A metodologia proposta para a avaliação de risco de biopesticidas no sistema aquático segue o esquema de Fases (Figura 1) utilizado pela EPA/USA e descrito na Subdivisão M do manual de Testes de Pesticidas (Pesticide, 1989) no qual o Protocolo se fundamentou. Nesse sistema em fases, os organismos-teste são submetidos inicialmente a uma dose máxima do agente microbiano de controle (Fase 1). Dada a alta concentração de unidades do agente microbiano utilizada na Fase I, supõe-se que dada concentração seja suficiente em ocasionar efeito adverso em organismo não-alvo se o agente possuir potencial em causar infecção ou se ocorrer a presença de toxina. Se os testes iniciais não indicarem danos significativos, então nenhum outro teste é geralmente necessário. Entretanto, se resultados significativos forem encontrados na Fase I, os testes da Fase II são exigidos e assim sucessivamente.

Nos estudos da Fase II se avaliam qualitativa e quantitativamente as condições propícias para o desenvolvimento do agente microbiano de biocontrole, isto é, a sua capacidade de reprodução e sobrevivência no sistema aquático através de variações de temperatura, pH, nutrientes, luz, oxigênio dissolvido e outras características físico-químicas do meio. Nos estudos da Fase III se avaliam mais precisamente e se quantificam os riscos de exposição associados a situações mais próximas da realidade. Por isso, trabalha-se nesses testes com concentrações do biopesticida semelhantes às estimativas a ocorrer em campo. Os tipos de

efeitos observados nos testes da Fase I orientam a determinar qual o teste da Fase III que seria mais conveniente. Se somente efeitos tóxicos ocasionados pela presença de uma toxina forem observados na Fase I, será dada continuação aos estudos, adotando os mesmos procedimentos usados para os produtos químicos. Se efeitos patogênicos e tóxicos forem observados, então se realizarão estudos mais específicos com organismos do compartimento aquático.

Os estudos da Fase IV, realizados em condições de campo, sejam simuladas ou reais, são efetuados quando efeitos patogênicos são registrados na fase anterior resultantes de uma exposição a níveis iguais aos esperados a ocorrer em campo.

Dado que a maior parte dos agentes microbianos de controle biológico submetidos a registro não necessitam estender seus testes além da Fase I e considerando a presente inocuidade da maioria dos biopesticidas frente a organismos não-alvo e a especificidade dos requerimentos dos testes que procedem a Fase I (que deveriam ser estudadas caso-a-caso), nos limitaremos, neste capítulo, a descrever metodologias da Fase I com três organismos aquáticos de uso comum como bioindicadores em estudos de ecotoxicidade.

FASE I. Estudos para avaliar a dose de risco máximo de exposição.

- Testes de patogenicidade/toxicidade em organismos fitoplanctônicos.
- Testes de patogenicidade/toxicidade em organismos zooplanctônicos
- Testes de patogenicidade /toxicidade em vertebrados aquáticos.



FASE II. Estudos para avaliar a capacidade de replicação e sobrevivência do agente biológico no sistema aquático.

- Testes de determinação da expressão ambiental.



FASE III. Estudos mais específicos.

- Testes com outros invertebrados aquáticos.
- Testes de ciclo de vida em peixes.
- Estudo de desequilíbrio do ecossistema



FASE IV. Estudos para se avaliar o risco em condições naturais.

- Estudos simulados ou em campo.

FIGURA 1. Esquema de seqüência de fases para a avaliação de risco de agentes microbianos de controle biológico no meio aquático.

## Estudos da Fase I

### Avaliação da dose de máximo risco de exposição em organismos fitoplanctônicos

Este teste consiste na exposição da microalga aquática *Selenastrum capricornutum* ao AMC em estudo, de modo que se possa avaliar durante 96 horas de exposição o seu potencial de toxicidade/patogenicidade através de observações no crescimento algáceo.

Para o preparo do meio de cultura de algas deve se utilizar reagentes de grau analítico. A água utilizada deve ser originária de um destilador e possuir condutividade igual ou inferior a  $10\mu\text{S}/\text{cm}$ . O preparo do meio de cultura de algas a ser utilizado no ensaio está descrito no manual da OECD (1981).

As suspensões utilizadas no teste são obtidas suspendendo-se um número conhecido de unidades infectantes do AMC em um volume definido de meio de cultura.

A determinação do número de unidades infectantes do agente biológico é realizada pela contagem em câmara de Neubauer, através da microscopia óptica.

O organismo-teste utilizado neste estudo é a microalga *Selenastrum capricornutum*, uma espécie de alga clorofícea mantida em meio preparado segundo o procedimento da OECD (1981), em culturas axênicas e condições controladas de temperatura e luminosidade.

## Procedimento

Quatro ou cinco dias antes do início do teste, a cultura de algas-estoque deve ser inoculada em meio de cultura, de modo a se obter uma suspensão com concentração aproximada de  $5 \times 10^4$  células/ml.

Essa nova cultura deve ser mantida em incubação nas mesmas condições de temperatura, luminosidade e agitação utilizadas no teste, ou seja,  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e 3000-4000lux, respectivamente.

No dia do teste, a nova cultura que deverá estar na fase exponencial de crescimento será utilizada como inóculo nas suspensões-teste. Estas últimas

deverão ser preparadas em frascos erlenmeyers com capacidade de 250ml, colocando-se volumes conhecidos da suspensão-estoque e completando-se o volume para 100ml com meio de cultura, obtendo-se assim uma suspensão com número desejado de unidades infectantes por mililitro.

São avaliados os seguintes tratamentos: controle (organismos-teste cultivados em meio de cultura isento de AMC), controle negativo (organismos-teste cultivados em meio de cultura adicionado do AMC inativo) e exposto (organismos-teste cultivados em meio de cultura adicionado do AMC ativo).

A concentração de unidades infectantes por volume de suspensão deve ser equivalente à concentração obtida pela aplicação de 1 vez ou até de 100 vezes a dose agrônômica de unidades infectantes utilizada em campo, estimando-se em lâmina de água de 15cm de profundidade. No caso dessa dose não estar ainda definida, a concentração mínima a ser utilizada deve ser de  $10^6$  unidades/ml.

O teste deve ser realizado em, no mínimo, réplicas de quatro recipientes e deve ser inteiramente casualizado.

Para a preparação do grupo-teste que funcionará como controle negativo indica-se a autoclavagem durante 20 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ .

A concentração de unidades infectantes inativadas por volume de suspensão a ser utilizada no controle negativo deverá ser a mesma que a utilizada no tratamento com o agente biológico.

Utilizando-se uma câmara de Neubauer e um microscópio óptico, o número de algas por volume de suspensão que servirá como inóculo é calculado. O volume de inóculo adicionado deverá resultar numa concentração inicial de algas de aproximadamente  $5 \times 10^4$  células por mililitro.

Os dados referentes ao logaritmo da concentração algácea em função do tempo permitem a construção da curva de crescimento algácea através da regressão linear. Para isto, no início, e em intervalos de 24 horas durante as 96 horas de exposição, alíquotas são retiradas de cada recipiente para a contagem do número de células e construção da curva de crescimento algácea em função do tempo. Para efeito de análise dos resultados são ajustadas curvas de

crescimento (logaritmo do número de células x tempo) para cada tratamento utilizando a análise de regressão múltipla com variáveis indicadoras (Draper & Smith, 1981). A taxa de crescimento em cada tratamento é estimada pela inclinação da correspondente curva de crescimento ajustada. Os efeitos dos tratamentos sobre as taxas de crescimento são avaliadas pelo teste t de Student

### **Avaliação da dose de máximo risco de exposição em organismos zooplanctônicos**

Este teste consiste na exposição inicialmente de indivíduos jovens do invertebrado aquático *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea) a concentrações elevadas do agente biológico em estudo, de modo que se possa avaliar a longo prazo de exposição o seu potencial de toxicidade/patogenicidade na sobrevivência e taxa de reprodução.

Para o preparo da água reconstituída deve-se utilizar reagentes de grau analítico. A água para o preparo do meio sintético deve ser originária de um destilador e deve possuir condutividade igual a  $10\mu\text{S}/\text{cm}$  ou menor que esse valor.

O preparo da água reconstituída a ser utilizada no ensaio está descrito no manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos (Brasil, 1988).

As suspensões utilizadas no teste, tanto no início do experimento como na renovação, são obtidas suspendendo-se um número conhecido de unidades infectantes do AMC em um volume definido de água de diluição. A determinação do número de unidades infectantes do AMC é realizada pela contagem em câmara de Neubauer através da microscopia óptica.

Devem ser utilizados organismos-teste com idade inferior a 24 horas, originários de culturas mantidas em condições controladas conforme o procedimento descrito para o cultivo de *Daphnia similis* no manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos (Brasil, 1988).

## Procedimento

Em recipientes de vidro com aproximadamente 500ml de capacidade, colocam-se volumes conhecidos da suspensão-estoque e completa-se o volume para 500ml com água reconstituída para se obter a suspensão-teste com o número desejado de unidades/ml. A cada recipiente adicionam-se doze organismos através do uso de pipeta Pasteur de diâmetro adequado com ponta arredondada.

Nesse teste são avaliados três grupos: controle (organismos-teste cultivados em água reconstituída isenta de AMC), controle negativo (organismos-teste cultivados em água reconstituída adicionada do AMC inativo) e exposto (organismos-teste cultivados em água reconstituída adicionada do AMC ativo).

A concentração de unidades infectantes por volume de suspensão a ser utilizada no grupo exposto ao AMC deve ser equivalente à concentração obtida pela aplicação de pelo menos 1000 vezes a dose agrônômica de unidades infectantes utilizadas em campo. Para efeito de cálculo, estima-se a presença de uma lâmina de água de 15cm de profundidade. Em caso de esta dose não estar ainda definida, a concentração mínima a ser utilizada deverá ser de  $10^6$  unidades por mililitro.

O delineamento experimental utilizado é inteiramente casualizado com quatro ou mais réplicas. As unidades experimentais são constituídas de cinco neonatos, alocados nos cristalizadores. É necessário introduzir uma leve aeração no meio através de um minicompressor de ar e uma pedra porosa. Para a preparação da suspensão-teste que funcionará como controle negativo indica-se a utilização do procedimento de autoclavagem a  $121^\circ\text{C}$  durante 20 minutos. A concentração de unidades infectantes inativas por volume de suspensão a ser utilizada no controle negativo deverá ser a mesma utilizada no tratamento com o AMC.

Iniciando-se um teste numa 2ª feira, as suspensões devem ser renovadas nas próximas 4<sup>as</sup>, 6<sup>as</sup> e 2<sup>as</sup> feiras, sendo que nos dias desta renovação o número de organismos vivos inicialmente expostos, ou seja de progenitores, assim como de jovens nascidos, será registrado em cada recipiente. É conveniente também se fazer o registro de jovens mortos, caso exista. Em cada renovação,

os organismos vivos inicialmente expostos são transferidos para recipientes com suspensões recentemente preparadas.

No 21º dia, ou seja, no último dia de exposição, após o registro do número de organismos progenitores remanescentes, estes são lavados em corrente de água esterilizada com auxílio de uma rede de malha fina, colocadas em tubos de ensaio contendo 2-4ml de água esterilizada e trituradas com um bastão de vidro obtendo-se um homogeneizado. A presença ou ausência do AMC no organismo não-alvo, que poderia atuar como agente disseminador, pode ser avaliada fazendo-se plaqueamento do homogeneizado em meios de cultura apropriados e avaliando o crescimento nesses meios. É conveniente também ser realizar tal procedimento nos organismos que morrem durante a exposição com o intuito de se contatar se a mortalidade é causada pelo AMC em estudo. O teste deverá ser realizado em câmara incubadora ou sala aclimatizada com temperatura controlada entre 18 e 22°C.

O registro das condições abióticas deverá ser realizado através de medidas de pH e oxigênio dissolvido na água, pelo menos uma vez por semana, no início e no fim da renovação dos recipientes.

Durante o período de 21 dias deve-se registrar a temperatura máxima e mínima de exposição. A concentração de unidades de agente biológico nas suspensões-teste deve ser determinada analiticamente pelo menos uma vez por semana. A diferença entre a concentração nominal e aquela determinada experimentalmente não deve ser superior a 30%.

Ao final do experimento são calculados para cada réplica a taxa de mortalidade dos adultos e a taxa de natalidade (número de jovens produzidos/adulto/dia).

A taxa diária de natalidade é estimada a partir de taxas parciais, obtidas em cada data de avaliação, correspondente a cada renovação. As taxas parciais são calculadas dividindo-se o número de neonatos produzidos por adulto vivo, no intervalo imediatamente anterior à renovação, pela duração do intervalo.

As taxas de mortalidade dos diferentes tratamentos são comparadas pelo teste exato de Fisher (Zar, 1984). É feita análise de variância da taxa de

natalidade. Se o teste F for significativo, as médias dos tratamentos são comparadas através de algum procedimento de comparações múltiplas.

## **Avaliação da dose de máximo risco de exposição em vertebrados aquáticos**

Este teste consiste na exposição de peixes (família Characidae e outros) a concentrações elevadas do agente biológico em estudo, de modo que se possa avaliar, através de uma exposição prolongada, o seu potencial de toxicidade/patogenicidade.

Águas com uma dureza total entre 50 e 250mg/l  $\text{CaCO}_3$  e com pH entre 6,0 e 8,0 são preferíveis. Pode ser utilizada água da rede pública de abastecimento com a devida remoção do cloro residual, de fontes naturais de boa qualidade ou água reconstituída preparada a partir da água destilada (condutividade  $< 10\mu\text{S/cm}$ ) pela adição de reagentes de grau analítico (Brasil, 1988; OECD, 1981).

As suspensões utilizadas nos testes, tanto no início do experimento como na renovação, são obtidas suspendendo-se um número conhecido de unidades infectantes do AMC em um volume definido de água de diluição.

A determinação do número de unidades infectantes do AMC é realizada pela contagem em câmara de Neubauer através da microscopia óptica. É indicado, preferencialmente, o uso de peixes pertencentes à família Characidae, por serem organismos de ampla distribuição no território nacional, tais como os do gênero *Hyphessobrycon* sp. Sugere-se também o uso de espécies que naturalmente predam o organismo hospedeiro alvo do AMC ou se alimentam dele. Opcionalmente poderão ser utilizadas espécies alóctones, tais como *Brachydanio rerio*, *Poecilia reticulata* ou *Pimephales promelas*.

Os organismos devem ter homogeneidade em tamanho, sendo que o comprimento do peixe maior não deve exceder o dobro do tamanho do menor.

Os peixes devem ser mantidos em aclimação por pelo menos uma semana antes do início do teste nas mesmas condições de exposição a serem utilizadas no experimento.

## Procedimento

Os ensaios deverão ser realizados em recipientes de vidro que comportem um volume de suspensão-teste que permita manter a relação de no máximo 1 grama de peixe por litro de água. Nesses recipientes adicionam-se volumes conhecidos da suspensão-estoque e completa-se com um determinado volume de água de diluição de modo a se obter a suspensão-teste com número desejado de unidades do AMC por mililitro.

Nesse teste são avaliados três grupos: controle (organismos-teste cultivados em água de diluição isenta de AMC), controle negativo (organismos-teste cultivados em água de diluição adicionada do AMC inativo) e exposto (organismos-teste cultivados em água reconstituída adicionada do AMC ativo).

A concentração de unidades infectantes por volume de suspensão a ser utilizada no grupo exposto ao AMC deve ser equivalente à concentração obtida pela aplicação de pelo menos 1000 vezes a dose agrônômica de unidades infectantes utilizada em campo. Para efeito de cálculo de concentração, estima-se a presença de uma lâmina de água de 15cm de profundidade. Em caso desta dose não estar ainda definida, a concentração mínima a ser utilizada deverá ser de  $10^6$  unidades por mililitro.

O delineamento experimental com quatro réplicas é inteiramente casualizado.

Para a preparação da suspensão-teste que funcionará como controle negativo indica-se a autoclavagem durante 20 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ . A inativação pela luz ultravioleta poderá ser utilizada desde que se demonstre, assim como pela autoclavagem, que o agente biológico não apresenta patogenicidade/toxicidade para o organismo-alvo.

A concentração de unidades infectantes inativadas por volume de suspensão a ser utilizada no controle negativo deverá ser a mesma que a utilizada no tratamento com o AMC.

Devido ao acúmulo de detritos e de produtos de metabolismo nos recipientes é conveniente se realizar a renovação das suspensões-teste periodicamente (duas vezes por semana, ou conforme a necessidade).

Poderá ser realizada, adicionalmente, a exposição por via oral, pela incorporação do AMC à dieta ou pela administração, como alimento, de organismos-alvo infectados. O alimento utilizado nessa exposição deverá conter uma concentração microbiana calculada de no mínimo 100 vezes a dose agrônômica em uma lâmina de água de 15cm.

Os peixes devem ser observados diariamente durante um período mínimo de 30 dias quanto à mortalidade, ao comportamento ou aos sintomas de patogenicidade.

Se alguma sintomatologia é apresentada no 30º dia de exposição, as observações devem continuar até a ocorrência de mortalidade ou recuperação do organismo ou ainda até que se certifique que ocorra mortalidade.

No último dia de exposição, os organismos remanescentes podem ser avaliados quanto a presença do AMC nos tecidos. Isto é realizado fazendo-se inicialmente uma assepsia da superfície externa, precedida pela trituração dos tecidos para se obter um homogeneizado que será plaqueado em meios de cultura apropriados. É conveniente se realizar também tal procedimento nos organismos que morrem durante a exposição, com o intuito de constatar se a mortalidade é causada pelo AMC em estudo. A análise histopatológica também é indicada.

O teste deverá ser realizado em recipientes que possuam um sistema de aeração constante de modo a se manter uma concentração de oxigênio dissolvido superior a 40% de saturação. O controle da temperatura da água poderá ser realizado através de sistema de aquecimento com termostato no próprio recipiente ou pela manutenção de temperatura constante em sala aclimatizada.

O registro das condições abióticas deverá ser realizado através de medidas de pH e oxigênio dissolvido na água, pelo menos uma vez por semana, no início e no fim da renovação dos recipientes.

Durante o período do teste deve-se registrar a temperatura máxima e mínima de exposição. A concentração de unidades de AMC nas suspensões-teste deverá ser determinada analiticamente pelo menos uma vez por semana. As mortalidades, em porcentagem, são calculadas diariamente e são construídas

curvas de sobrevivência em cada tratamento. Essas curvas são comparadas pelo teste de Log - Rank (Allison, 1995).

## **Apresentação dos resultados**

Os resultados deverão ser apresentados num relatório final contendo informações sobre metodologia utilizada e demonstrando dados obtidos em gráficos ou em tabelas.

O relatório deve conter:

1. Nome do teste e do pesquisador, assim como os nomes do local e laboratório.

2. As datas de início e término do estudo, assim como as datas de entrada do material-teste no laboratório e de finalização do relatório.

3. Informações sobre o AMC: nome científico, indicando se trata-se de vírus, fungo ou bactéria; categoria (herbicida, inseticida, fungicida etc.); procedência; condições de conservação e nome científico do(s) organismo(s)-alvo(s). Condições de conservação e de manutenção das culturas, número do lote (em caso de formulações), concentração de unidades infectantes na formulação ou material a ser testado, tipo de formulação (pó ou suspensão).

4. Informações sobre o organismo-teste: nome científico, procedência, condições de cultivo, peso e tamanho aproximado (no caso de peixes), idade, condições de manutenção, condições e dados registrados durante o período de aclimação.

5. Informações sobre as características físico-químicas da água de diluição (pH, condutividade e dureza total) e, no caso, o procedimento de preparação desta.

1. Informações sobre o procedimento de preparo do meio para o cultivo do organismo-teste e suas características físico-químicas.

2. Procedimento de preparação das suspensões-teste e suspensões-estoque.

3. Procedimento de inativação do AMC.

4. Descrição do delineamento experimental do teste.

5. Medidas das temperaturas máxima e mínima, do pH, do oxigênio dissolvido e da luminosidade.
6. Dados sobre o crescimento algáceo.
7. Dados de sobrevivência e reprodução dos organismos dos invertebrados aquáticos.
8. Dados de mortalidade dos peixes e de observações comportamentais relevantes.
9. Método estatístico utilizado e resultado da análise.
10. Informações sobre os resultados de um teste de patogenicidade/toxicidade para o organismo-alvo. Esses resultados deverão ser provenientes de estudos realizados com a mesma cultura (ou lote de produto) do AMC a ser utilizado no procedimento aqui descrito.
11. Eventuais modificações introduzidas no procedimento descrito neste protocolo.

## Exemplos de estudos de alguns biopesticidas – Fase I

### 1 - Avaliação de alguns AMCs de uso comercial

#### *Baculovirus* sp.

O baculovirus pode infectar fatalmente uma larva suscetível que ingira o vírus em quantidade suficiente. O vírus se multiplica nos núcleos das células intestinais da larva e ocasionalmente pode produzir os corpos de inclusão ou poliedros. A próxima geração de vírus é liberada quando a larva, após alguns dias, morre e se liquefaz (Levidow, 1995).

Assim, além dos testes realizados em animais de laboratório, os AMCs que são vírus devem ser testados em cultura de células. Os AMCs virais devem ser avaliados quanto a possíveis danos à saúde humana devido à possibilidade de sua replicação no organismo. Hartig et al. (1989 e 1991) padronizaram os testes a serem conduzidos de forma a obterem informações quanto à transformação, toxicidade, infectividade e a infecções persistentes, latentes ou abortivas.

Os primeiros estudos realizados no início da década de 80, que sugeriam que o vírus da *Autographa californica* (AcNPV) selvagem pudesse se

replicar em células de vertebrados, não puderam ser reproduzidos. Estudos posteriores demonstraram a inabilidade do vírus em se replicar em células de vertebrados (Reimann & Miltenburger, 1982; Volkman & Goldsmith, 1983).

A substância a ser testada deve ser a forma mais pura e mais infectiva do vírus e o inóculo deve ser quantificado. São recomendadas as seguintes células e/ou linhagens: (1) uma linhagem humana, (2) uma cultura de células primárias, (3) uma linhagem contínua de primata, (4) embrião de hamster sírio (para fornecer dados sobre transformação celular) e (5) uma outra linhagem de células, que deve ser selecionada para avaliar possíveis problemas intrínsecos do agente de controle viral específico e outros problemas relacionados a seu uso (EPA, 1989). Se os dados mostrarem que a preparação do agente viral é tóxica para quaisquer culturas celulares, mas não infecta, se replica ou transforma quaisquer culturas celulares, então os componentes tóxicos da preparação deverão ser identificados. Se o agente viral infectar quaisquer culturas celulares, podem ser necessários estudos sobre os efeitos na reprodução e fertilidade, na oncogenicidade, no potencial de causar imunodeficiência e na infectividade/patogenicidade em primatas.

Na natureza existem diversas espécies de baculovírus que infectam organismos aquáticos, em particular crustáceos (Spann & Lester, 1996; Groff et al., 1993). O *Baculovirus penaei*, comumente conhecido como BP é uma espécie que tem causado alta mortalidade e redução de crescimento nos estágios larvais e pós-larvais do camarão rosado *Penaeus duorarum* (Stuck & Wang, 1996). Apesar de terem sido relatados alguns resultados que sugerem a mortalidade de organismos aquáticos não-alvo associada a exposição de partículas de inclusão (ativas) de vírus que infectam insetos (Gormly et al., 1996; Savan et al., 1979), a maioria dos estudos realizados para se avaliar o risco de espécies de *Baculovirus* usadas (ou com potencial de uso) na agricultura não tem demonstrado resultados significativos que expressem efeitos deletérios em organismos aquáticos não-alvo. Assim, por exemplo, Lightner et al. (1973) testaram a suscetibilidade de duas espécies de camarão (*Penaeus aztecus* e *P. setiferus*) ao *Baculovirus* de *Autographa californica*. Não ocorreu mortalidade atribuída à infecção viral durante

30 dias de exposição. Também não houve evidência do vírus ocasionar alterações histopatológicas a diversos órgãos dos organismos-teste.

O risco de uma formulação de *Baculovirus anticarsia* foi avaliado quanto à sua capacidade de promover efeitos adversos na taxa de crescimento de três espequeis bioindicadoras aquáticas: a alga *Selenastrum capricornutum*, a macrofita *Lemna valdiviana* e o microcrustáceo *Daphnia similis*. A sobrevivência do peixe *Hyphessobrycon scholzei* exposto durante 28 dias foi também avaliada. Não foram constatados efeitos adversos significativos ( $P > 0,05$ ) nos organismos-teste que foram expostos a 1-1000 vezes a concentração calculada do biopesticida, após uma aplicação direta a 15cm de uma lamina de água (Jonsson et al., 1995).

Kreutzweiser et al. (1997) não observaram infectividade ou efeitos adversos em trutas (*Oncorhynchus mykiss*) jovens nas quais se administrou, através da dieta, o baculovírus de duas importantes pragas (*gypsy moth e spruce bud worm*) de florestas dos Estados Unidos.

### *Bacillus thuringiensis*

Entre as bactérias patogênicas e insetos, o *Bacillus thuringiensis* é com freqüência utilizado como biopesticida no Brasil. O Bt é uma bactéria gram positiva que produz um cristal proteináceo durante a esporulação. O seu ciclo de vida se inicia quando o esporo e o cristal são ingeridos por um inseto suscetível. O cristal é solubilizado em alto pH e é digerido no intestino do inseto, formando a toxina ativa resistente a tripsina. Essa toxina se ligaria às células epiteliais criando um poro que permite o fluxo de íons K, afetando o potencial de membrana e permitindo o influxo de água. A água causa edema e rompimento das células, o que leva à paralisia e morte do inseto. O Bt germina e cresce no inseto morto. Já foram isoladas e identificadas várias proteínas desse cristal. Porém, a sua pequena resistência e conseqüente inativação devido a fatores ambientais, como luz solar, chuva e ventos contribuem para a diminuição de sua eficácia. Ele seria ainda absorvido por partículas do solo e por partículas orgânicas na água. A perda da ação larvicida ocorreria então pela transformação da toxina a uma

forma não acessível à larva (Ohana et al., 1987).

Deve-se lembrar que a toxina proveniente de plantas transgênicas pode permanecer em níveis baixos no solo por muitas semanas ou meses, o que talvez possa afetar, na dependência da quantidade e frequência, animais não-alvo (Palm et al., 1996). O potencial dessa toxina de se movimentar através da cadeia alimentar leva a sérias implicações no controle biológico natural e no agroecossistema. Essa toxina pode ser incorporada ao solo pela queda das folhas, persistindo de 2 a 3 meses além de resistir à degradação por se ligar à argila do solo. Essa toxina presente em solo e água pode provocar impactos negativos no solo, na ciclagem dos nutrientes e nos invertebrados aquáticos (James, 1997). As formulações comerciais com esse AMC têm sido submetidas a testes toxicológicos que mostram a sua segurança. Contudo, as formulações iniciais de Bt continham uma toxina denominada  $\beta$ - exotoxina, que ocasionava efeitos tóxicos em grande número de organismos não-alvo, incluindo mamíferos. Preparações solúveis de cristal exercem efeitos tóxicos em cultura de células de insetos e mamíferos, incluindo eritrócitos, e dependendo da dose podem ser letais para camundongos. O principal componente tóxico seria o polipeptídeo 28k (Mayes et al., 1989).

Atualmente, há necessidade da comparação da ausência dessa toxina na formulação para que o produto seja registrado nos Estados Unidos (McClintock et al., 1995). O grande volume de material gerado com testes toxicológicos em mamíferos pressupõe que o Bt não ocasiona efeitos nem adversos em mamíferos. Contudo, a proximidade taxonômica de outros *Bacillus* patogênicos para mamíferos indica a importância de ao menos uma avaliação toxicopatológica mínima para o registro de novas variedades. Nesse sentido, poderia ser realizada uma avaliação inicial através da via intraperitoneal, a critério do órgão regulamentador.

Entretanto, alguns dos estudos com diferentes linhagens de *Bacillus thuringiensis* (Bt) em camundongos expostos pela via respiratória têm associado mortalidade dos animais à fase vegetativa de crescimento e talvez a proteínas pré-esporulação do Bt, quando os testes eram realizados com formulações

contendo 50% de esporos e 50% de células vegetativas de *Bt subsp. kurstaki*. (Btk). A primeira formulação comercial de Bt a ser avaliada em testes de campo nos Estados Unidos surgiu em 1958. Desde então já foram registradas várias subespécies (McClintock et al., 1995).

Testes toxicopatológicos realizados com ratos, após exposição oral a uma dose de  $1 \times 10^8$  UFC/g, conforme recomendado pelo protocolo, aplicada por animal, indicaram que os animais não apresentaram sintomas ou lesões macroscópicas nos diferentes órgãos. Os animais foram observados quanto ao aparecimento de sinais e sintomas. Foram observados diariamente os seguintes itens: pele e pêlo; olhos e mucosas; sistemas respiratório e circulatório; sistema nervoso periférico e central (tremor, diarréias, convulsão, letargia e salivação); padrão comportamental e tempo de morte, não sendo observadas quaisquer alterações. O esquema de sacrifício para necrópsia e quantificação de esporos de Bt foi realizado imediatamente após a exposição e depois nos dias 1, 3, 7, 14 e 21 após. Recolheram-se 10g de bolo fecal nos dias determinados segundo este esquema. O bolo fecal foi diretamente recolhido do intestino reto, macerado e colocado em um erlenmeyer com 100ml de água estéril e agitado a 200rpm por 5 minutos. Foram então realizadas as diluições e o plaqueamento. Observou-se, contudo, que os animais demoraram de 5 a 7 dias para eliminar completamente o Btk através do clearance das fezes, resultados que indicam a necessidade de realização de testes que simulem as condições de exposição natural, considerando que os microrganismos presentes no biopesticida podem permanecer viáveis (sob a forma de esporos) por um grande período no campo (Castro et al., 1995; 1997).

A exposição de organismos aquáticos a concentrações relativamente elevadas de unidades infectantes de *Bacillus thuringiensis* não parece afetar a viabilidade dos organismos-teste, mas demonstra que alguns organismos aquáticos, como peixes, podem influenciar na disseminação de *Bacillus thuringiensis* e provavelmente de outros agentes de controle biológico, no compartimento aquático. Assim, por exemplo, Snarski (1990) estudou as interações entre *Bacillus thuringiensis* subsp. *isralensis* e o peixe *Pimephales*

*promelas*, utilizando duas formulações comerciais do biopesticida. A mortalidade dos organismos-teste expostos a concentrações que variaram entre  $2 \times 10^6$  e  $6,5 \times 10^6$  unidades infectantes por mililitro foi atribuída a uma depleção severa de oxigênio dissolvido e não à toxicidade direta do cristal. Não foram observados efeitos adversos na concentração de  $6,4 \times 10^5$  unidades infectantes/ml ou menores que esta. A comparação de contagens de esporos no trato gastrointestinal e nas demais partes dos animais e o grande número de esporos nas fezes indicaram que a ingestão é a maior via de exposição. O número de esporos diminuiu rapidamente após a transferência dos peixes para água isenta de esporos, com um decaimento na ordem de três vezes em um dia. Mulla et al. (1982) verificaram a ausência de efeitos adversos em populações dos invertebrados aquáticos *Callibaetis pacifus*, *Erithemis simplicicollis* e *Berosus metalliceus* em experimentos realizados a campo nos quais se aplicaram formulações de *Bacillus thuringiensis* (serotipo H-14) em taxas de aplicação de 0,56 a 2,24kg/ha. Estudos realizados por Brazner & Anderson (1986) com o crustáceo *Gammarus lacustris* (Amphipoda) expostos a suspensões contendo 0,5 e 5,0mg/L de esporos de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) por períodos de 1 ou 24 horas demonstraram que a dose de exposição é altamente da duração da exposição e da concentração, e que períodos de exposição relativamente curtos podem resultar em retenções dos esporos a longo prazo por períodos maiores ou equivalentes a 30 dias. Apesar da bem relatada inocuidade de linhagens de *Bacillus thuringiensis* para a fauna aquática na literatura especializada, Gormly et al. (1996) contataram uma taxa de mortalidade significativamente elevada de moluscos (*Mulinia lateralis*) expostos a uma formulação de Bti, quando comparada com o controle contendo o Bti inativado por aquecimento.

## 2 - Avaliação de outros AMCs de uso potencial

### *Colletotricum gloeosporioides*

O fungo *C. gloeosporioides* apresenta linhagens fitopatogênicas que podem causar fitotoxicidade em folhas ou mesmo frutos de alguns vegetais. Em testes de avaliação toxicopatológica em ratos, foi testada uma linhagem que

controla a cochonilha *Orthezia praelonga*. A linhagem foi administrada a ratos, em suspensões de  $2,14 \times 10^7$  esporos/ml pela via oral. Cada animal recebeu 1,0ml da respectiva suspensão. Foram utilizados três tratamentos para cada via: fungo ativo (AT), fungo inativado (IN) e o veículo de administração do fungo, como controle (CT). Os animais foram observados diariamente, não havendo alterações clínicas ou quaisquer lesões em órgãos internos por ambas as vias de administração. Os animais foram também submetidos à necrópsia nos dias 0, 1, 3, 7 e 14 após a administração da suspensão com a retirada dos rins, fígado, pulmão, estômago e mesentério para verificar a presença do fungo nesses tecidos. Os órgãos, depois de pesados, foram homogeneizados, diluídos e plaqueados em meio sólido de Batata-Dextrose-Ágar (BDA). O fungo só foi encontrado no intestino no dia 0, na quantidade de  $0,22 \times 10^2$  esporos por grama do órgão.

O protocolo utilizado se mostrou também adequado para demonstrar a rápida eliminação do fungo dos tecidos avaliados e analisar a segurança de uso deste produto em relação a mamíferos (Castro et al., 1998).

O *C. gloeosporioides* isolado de *Orthezia* tem recebido especial atenção devido ao seu sucesso no controle de *O. praelonga* em citrus. Uma suspensão de esporos ( $10^6$  esporos/ml) de *C. gloeosporioides* isolado de *Orthezia*, crescida em dois diferentes meios, foi avaliada quanto à sua capacidade de causar patogenicidade em embriões do camarão *Palaemonetes pugio*. O filtrado de meio de cultura e o extrato orgânico seco do fungo foram testados com a finalidade de se avaliar a toxicidade aguda no microcrustáceo *Artemia salina*.

Os resultados obtidos demonstraram a ausência de efeitos adversos associados à capacidade do fungo em provocar infecção ou exercer efeitos tóxicos agudos nas condições experimentais realizadas (Jonsson & Genethner, 1997)

## **Perspectivas em relação a testes com organismos geneticamente modificados (OGM)**

No tocante à segurança ambiental, as políticas devem promover a preservação da biodiversidade, manutenção dos ecossistemas e os padrões de sustentabilidade requeridos. Nesse sentido, o uso de controle biológico tem se

mostrado uma prática efetiva e adequada a esses propósitos.

Observou-se, no Brasil, um incremento significativo entre 1995 e 1998 no número de produtos biológicos avaliados quanto à segurança ambiental e registrados para fins comerciais. Esse aumento pode ser creditado à utilização de protocolos de avaliação e implementação de leis específicas.

Assim, torna-se cada vez mais importante estudar os agentes biológicos com reais possibilidades de sucesso contra pragas e doenças que afligem atualmente a agricultura brasileira, bem como avaliar e sugerir métodos para o estudo de agentes que em um futuro bem próximo podem ser de grande valia como os OGMs.

Alguns dos possíveis efeitos adversos produzidos por um OGM são os danos diretos e indiretos sobre organismos benéficos não-visados da comunidade local, incluindo outros agentes de controle biológico; organismos polinizadores; representantes da flora e fauna de importância econômica, ecológica e ou social; organismos benéficos decompositores de matéria-orgânica; fixadores de nitrogênio e até a saúde humana. A manutenção da biodiversidade e os aspectos socioeconômicos, bem como os problemas advindos da ausência de barreiras políticas ou fronteiras que restrinjam a disseminação de um organismo não desejado, também devem ser avaliados.

Geralmente, só uma pequena proporção de espécies invade satisfatoriamente um determinado habitat. Entre as razões que contribuem para essa pequena taxa está a introdução de organismo em pequenas populações, uma vez que há a necessidade do habitat certo. Contudo, as liberações em sistema agrícolas deverão ser realizados em larga escala, aumentando assim a probabilidade do seu estabelecimento. A história tem mostrado que uma grande área plantada com uma única cultivar é muito vulnerável a novos patógenos ou pragas. Além disso, o uso em larga escala de uma única cultivar leva à perda da diversidade genética. A uniformidade causada pelo aumento do uso dessa cultivar leva a uma diminuição do número de variedades e torna-se uma ameaça para os agricultores devido ao empobrecimentos de ecossistemas marginais (afeta as interações entre as comunidades). Esse empobrecimento e a diminuição da

diversidade dos agroecossistemas ocasionam condições ótimas para o crescimento de plantas daninhas, insetos e doenças, porque muitos nichos ecológicos não estão preenchidos por outros organismos.

Apesar do potencial da área ser enorme, é essencial que a sobrevivência a longo prazo de espécies nativas não seja prejudicada pela falta de cuidado em manter a diversidade genética (Beringer et al., 1994). Neste sentido, o estudo do impacto dos OGMs sobre os organismos não-alvo reveste-se de maior importância, por não se poder prever com exatidão o comportamento desses organismos no campo. Também existe a possibilidade de transferência de material genético entre os organismos ou ainda um desbalanço nas populações de um determinado ecossistema. De igual forma, as plantas transgênicas que expressam toxinas podem aumentar a pressão seletiva em relação aos insetos (Meadows, 1993).

O risco potencial à saúde pública e ambiental a partir de uma liberação de OGM, seja intencional ou acidental, é objeto de múltiplas preocupações. Devem ser respondidas questões quanto à sobrevivência, disseminação, colonização e função da liberação desses organismos em habitats naturais. Além dos efeitos previsíveis, há a possibilidade de ocorrência de efeitos inesperados (Stotzky et al., 1993).

Alguns dos principais efeitos potenciais após liberação de microrganismos geneticamente modificados podem então ser listados como: 1. patogenicidade para plantas, animais e homem; 2. distúrbios do equilíbrio ecológico; 3. ocorrência de reações bioquímicas indesejadas; 4. mobilização de elementos tóxicos; 5. alteração da biodiversidade; 6. dominância sobre outros microrganismos; 7. disseminação de genes heterólogos; e 8. alteração da ciclagem de nutrientes (Smith et al., 1992).

Deve-se, assim, realizar uma avaliação em seqüência, enfocando três pontos principais: (a) avaliar os efeitos decorrentes pela liberação ambiental dos agentes selvagens; (b) revisar os mecanismos de transferência genética e avaliar o que pode acontecer no ambiente e (c) monitorar a dispersão desses organismos e seus possíveis efeitos na fauna (Stephenson e Warnes, 1996).

O propósito e a função do novo gene incorporado devem ser levados em consideração no desenho do novo estudo. Os estudos devem inicialmente ser realizados em laboratório, porque as conseqüências da introdução do gene no ambiente são desconhecidas. Na seqüência, podem ser realizados experimentos em campo, em parcelas controladas, e de acordo com as normas da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio.

Há ainda a necessidade do desenvolvimento de métodos para a sua detecção nos vários compartimentos ambientais. Atualmente, existem alguns métodos disponíveis para tanto. O uso de genes indicadores em bactérias tem se baseado na resistência a alguns antibióticos ou metais pesados. Os genes de resistência têm a vantagem de facilitar o isolamento dos OGMs a partir de amostras ambientais, apesar de algumas dessas características exitirem normalmente devido a estresses nutricionais.

Outra alternativa é a inclusão de genes indicadores que possam ser detectados por métodos fluorimétricos, medidas de bioluminescência, medidas colorimétricas através de ensaios enzimáticos etc. Os genes indicadores devem ser engenheirados para atingir níveis ótimos ou ao menos aceitáveis de expressão, o que pode ser alcançado utilizando-se promotores sabidamente eficientes de origem heteróloga. Para a detecção fenotípica dos produtos genéticos é também necessário que ocorra a translação correta dos sinais para assegurar a correta expressão gênica. Porém, esta pode ser deletéria para seu hospedeiro ou o subseqüente organismo para o qual será transferido por reduzir sua adaptabilidade ao ambiente.

O isolamento de aminoácidos diretamente da bactéria em amostras ambientais provê informação genética sobre a fração cultivável e a não - cultivável. Embora os ácidos nucleicos possam ser rapidamente recuperados de amostras ambientais, o número de moléculas-alvo será pequeno e provavelmente abaixo do nível de detecção das técnicas de hibridização. Por exemplo, um único marcador genético de um OGM pode estar presente em apenas uma a duas cópias por célula. Nesse caso, o método de PCR (*Polymerase chain reaction*) pode ser útil na amplificação dos ácidos nucleicos (Saunders e Saunders, 1993).

Outros métodos de detecção ainda podem ser usados, como os imunológicos com o auxílio de um microscópio de imunofluorescência, em que a bactéria com anticorpos específicos é conjugada a um fluorocromo que permite a detecção direta de determinadas cepas ou espécies. Entretanto, o fato de que a interação dos genes com o ambiente muitas vezes não pode ser prevista mostra a importância de cada organismo candidato a liberação ter seus aspectos individuais ponderados e analisados.

Para o estudo em alguns organismos não-alvo, vêm sendo desenvolvidos alguns modelos matemáticos multiespécies que contemplam as interações entre o hospedeiro, o parasitóide e o OGM, como o Baculovírus (Cory & Hails, 1997). Entretanto, enquanto os efeitos em outros microrganismos ou pequenos animais podem ser avaliados em microcosmos, para outros organismos maiores como peixes e mamíferos, eles podem ser obtidos por analogia com os provenientes de exposição a organismos semelhantes invocando o conceito de familiaridade ou por testes toxicológicos. Deve ser salientado que em relação ao ser humano, no que se refere à liberação planejada de OGM, pode-se levar em conta somente os aspectos relacionados ao gene adicionado, uma vez que os outros dados poderiam ser obtidos em informações a respeito desses organismos selvagens (Smit et al., 1992). As possíveis toxinas expressas são isoladas e avaliadas através da construção de curvas dose-resposta e delineamento experimental dos protocolos descritos para substâncias químicas.

A fim de prever o impacto da adoção da biotecnologia genética e seu impacto na estrutura e desempenho do setor agrícola, através da identificação da forma que ela afeta a produção agrícola, deve ser ainda realizada a avaliação econômica da adoção dos OGMs. Para tanto, é importante a monitoração dos avanços da avaliação de risco e das mudanças da regulamentação (Fleisher, 1989).

Políticas sociais são utilizadas para regular a interação dos membros de uma comunidade e a troca de seus recursos. Se for expandido o senso de comunidade para o ecossistema do qual faz parte a população/comunidade, nota-se que há necessidade de iniciar-se uma ética para essa comunidade/ecossistema.

A ética reconhece que o ecossistema tem valor intrínseco e cada um de nós é responsável por manter sua sustentabilidade. Na avaliação de risco ambiental de novas práticas agrícolas deve-se levar em consideração não somente os ganhos econômicos, mas também a saúde ambiental. Assim, uma melhor compreensão da interação entre organismos transgênicos e ecossistemas torna-se necessária por parte da população e dos órgãos regulamentadores para assegurar decisões que tenham eco na comunidade no que tange ao ambiente (James, 1997).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLISON, P.D. **Survival analysis using the SAS<sup>®</sup> system: a practical guide**. Cary, NC: SAS Institute, 1995. 292p.
- BRASIL. Secretaria do Meio Ambiente. **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. Brasília, 1988. 351p.
- BERINGER, J.; HAYES, P.; LAZARUS, C. Genetic engineering and biodiversity. In: HAWKSWORTH, D. **The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture**. Wallingford: CAB International, 1994. p.221-228.
- BRAZNER, J.C.; ANDERSON, R.L. Ingestion and adsorption of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* by *Gammarus lacustris* in the laboratory. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n.6, p. 1386-1390, 1986.
- CASTRO, V.; CAPALBO, D.; MAIA, A. Toxicity and pathogenicity evaluation of entomopathogenes: trends and challenges. In: NEW studies in ecotoxicology: papers resulting from posters given at the Welsh Pest Management Forum Conference: ecotoxicology, pesticides and beneficial organisms, 1996 Cardiff, UK. Cardiff: University of Wales, 1997. p.13-14.
- CASTRO, V.L.; CESNIK, R.; OLIVEIRA, R.C.A.L., Testes toxicopatológicos em ratos expostos ao *Colletotrichum gloeosporioides*. - Toxicopathological tests in exposed rats to *Colletotrichum gloeosporioides*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., 1998, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1998.
- CASTRO, V.L.S.S.; CAPALBO, D.M.F.; SOARES, C.M.; COSTA, F.P. Avaliação da exposição de pesticidas biológicos (*Bacillus thuringiensis*) em ratos. **Brazilian Journal of Toxicology**, v. 8, n.1, p. 268, 1995.
- CETESB. **Água - Teste de toxicidade aguda com peixes**. São Paulo, 1987. Norma Técnica L5.019-I.
- CORY, J.; HAILS, R. The ecology and biosafety of baculoviroses. **Environmental Biotechnology**, v.8, p.323-327, 1997.
- DRAIZE, J.; WOODWARD, G.; CALVERYM, H. **Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.83, p. 377-390, 1944.
- DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. London: John Wiley & Sons, 1981. p 241-250.
- FLEISCHER, B. The economic risks of deliberately released genetically engineered microorganisms. **American Journal of Agricultural Economics**, v. 72, n.2, p. 480-484, 1989.
- GEORGE, S. E.; KOHAN, M. J.; GILMOUR, M. I. et al. Pulmonary clearance and inflammatory response in C3H/HeJ mice after intranasal exposure to *Pseudomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 3585-3591, 1993.
- GORMLY, N.M.; SINGER, S.; GENETHNER, F.J. Nontarget testing of microbial pest control agents using larvae of the coot clam *Mulinia lateralis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.26, n.3, p.229-235, 1996.
- GROFF, J.M.; McDOWELL, T.; FRIEDMAN, C.S.; HEDRICK, R.P. Detection of a nonoccluded baculovirus in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* in North America. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.5, n.4, p.275-279, 1993.

- HARTIG, P.; CARDON, M.; KAWANISHI, C. Insect virus: assays for viral replication and persistence in mammalian cells. *Journal of Virological Methods*, v.31, p.335-344, 1991.
- HARTIG, P.; CHAPMAN, M.; HATCH, G.; KAWANISHI, C. Insect virus: assays for toxic effects and transformation potential in mammalian cells. *Applied and Environmental Microbiology*, v.55, p.1916-1920, 1989.
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Generic Draft Protocol**: acute dermal testing of a biochemical pesticide. Chicago, s.d. 6p. (IITRI Project Study, 1).
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Generic Draft Protocol**: acute intravenous toxicity/pathogenicity testing of a microbial pesticide. Chicago, s.d. 6p. (IITRI Project Study, 1).
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Generic Draft Protocol**: acute pulmonary toxicity/pathogenicity testing of a microbial pesticide. Chicago, s.d. 6p. (IITRI Project Study, 1).
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Generic protocol**: pulmonary toxicity/pathogenicity testing of following acute intratracheal challenge rats. Chicago, s.d. 8p. (IITRI Project Study, 1).
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Standard Operating Procedure**: dosing or injection of rodents and rabbits by various routes. Chicago, s.d. 6p. (IITRI Project Study, 1).
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Standard Operating Procedure**: limited necropsy procedure - rodent. Chicago, s.d. 6p. (IITRI Project Study, 1).
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Standard Operating Procedure**: method of dose administration for acute dermal toxicity studies in rabbits or rats. Chicago, s.d. 2p. (IITRI Project Study, 1).
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Standard Operating Procedure**: microbial pesticide - method of detection - sensitivity assay. Chicago, s.d. 3p. (IITRI Project Study, 1).
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Standard Operating Procedure**: obtaining and processing animal tissues for microbial quantitation. Chicago, s.d. 8p. (IITRI Project Study, 1).
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Test Article Usage Log**. Chicago, s.d. 12p. (IITRI Project Study, 1).
- JAMES, R. R. Utilizing a social ethic toward the environment in assessing genetically engineered insect-resistance in trees. *Agriculture and Human Values*, v.14, p.237-249, 1997.
- JONSSON, C.M.; GENETHNER, F.J. **Avaliação do potencial de patogenicidade e toxicidade do fungo entomopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Orthezia* em duas espécies de crustáceos**. Jaguariúna:Embrapa-CNPMA, 1997. 27p. (Embrapa-CNPMA. Boletim de Pesquisa, 1).
- JONSSON, C.M.; MAIA, A.H.N.; FERREIRA, C.J.A.; COSTA, F.P. Influence of *Baculovirus anticarsia* on the growth rate and survival of some nontarget aquatic organisms. In: INTERNATIONAL SIMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 7., 1995, Santos, SP. **Abstracts...** São Paulo: USP, 1995. p. 205.
- KREUTZWEISER, D.P.; EBLING, P.M.; HOLMES, S.B. Infectivity and effects of gypsy moth and spruce budworm nuclear polyhedrosis viruses ingested by rainbow trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.38, p.63-70, 1997.
- LEVIDOW, L., The Oxford baculovirus controversy – safely testing safety? *BioScience*, v.45, p. 545-551, 1995.
- LIGHTNER, D.V.; PROCTOR, R.R.; SPARKS, J.R.; ADAMS, J.R.; HEIMPEL, A.M. Testing penaeid shrimp for susceptibility to na insect nuclear polyhedriis virus. *Environmental Entomology*, v.2, n.4, p.611-613, 1973.
- MAYES, M.; HELD, G.; LAU, C.; SEELY, J.; ROE, R.; DAUTERMAN, W.; KAWANISHI, C., Characterization of the mammalian toxicity of the crystal polypeptides of *Bacillus thuringiensis* susp. *Israelensis*. *Fundamental and Applied Toxicology*, v.13, p.310-322, 1989.
- MEADOWS, M. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment In: TWISTLE,P.; CORY, J.; BAILEY, M.; HIGGS, S. *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. Chichester: John Wiley & Sons, 1993. p.193-220.
- McCLINTOCK, J.; SCHAFFER, C.; SJOBLAD, R., A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis* – based pesticides. *Pesticide Science*, v.45, p.95-105, 1995.

- MULLA, M.S.; FEDERICI, B.A.; DARWAZEH, H.A. Larvicidal efficacy of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against stagnant water mosquitoes and its effects on aquatic organisms. **Environmental Entomology**, v.11, n.4, p.788-795, 1982.
- OECD. **Guidelines for testing chemicals**: proc. 201. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development, 1981.
- OHANA, B.; MARGALIT, J.; BARAK, Z., Fate of *Bacillus thuringiensis* susp. *israelensis* under simulated field conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.828-831, 1987.
- PALM, C.; SCHALLER, D.; DONEGAN, K.; SEIDLER, R. Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* d-endotoxin. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.1258-1262, 1996.
- PESTICIDE Assessment Guidelines – Subdivision M. Microbial Pest Control Agents and Biochemical Pest Control Agents. Washington: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, 1989. 192 p.
- REIMANN, R.; MILTENBURGER, H. Cytogenetic studies in mammalian cells after treatment with insect pathogenic viruses (*Baculoviridae*). I. *in vivo* studies with rodents. **Entomophaga**, v.27, p.267-276, 1982.
- SAUNDERS, J. ; SAUNDERS, V., Genotypic and phenotypic methods for the detection of specific released microorganisms. In: EDWARDS, C. **Monitoring genetically manipulated microorganisms in the environment**. Cambridge: J. Wiley, 1993. p.27-59. (Wiley Biotechnology Series).
- SAVAN, M.; BUDD, J.; RENO, P.W.; DARLEY, S. A study of two species of fish inoculated with spruce budworm nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 15, p.331-333, 1979.
- SMITH, E.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VEEN, J.A. Risks associated with the applications of genetically modified microorganisms in terrestrial ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v.88, p.263-278, 1992.
- SNARSKI, V.M. Interactions between *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and fathead minnows, *Pimephales promelas* Rafinesque under laboratory conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.9, p. 2618-2622, 1990.
- SPANN, K.M.; LESTER, R.J.G. Baculovirus of *Metapenaeus bennettiae* from the Moreton Bay region of Australia. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.27, n.1, p.53-58, 1996.
- STEPHENSON, J. R.; WARNES, A. Release of genetically modified micro-organisms into the environment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v.65, p.5-14, 1996.
- STOTZKY, G.; BRODER, M. W.; DOYLE, J. D.; JONES, R. A. Selected methods for the detection and assessment of ecological effects resulting from the release of genetically engineered microorganisms to the terrestrial environment. **Advances in Applied Microbiology**, v.38, p.1-98, 1993.
- STUCK, K.C.; WANG, S.Y. Establishment and persistence of *Baculovirus penaei* infections in cultured pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 68, p.59-64, 1996.
- ZAR, J.H. **Bioestatistical analysis**. London: Prentice-Hall International, 1984. p.391-393.



*Coniothy*

*Ampelolyces quisqualis*

*lus thuringiensis*

EMBRAPA	
FICHA	
AUTOR	MELO, I. ed.
TÍTULO:	Controle
DEVOLVER EM	
10/10/00	ME
23/01/01	ME
23/02/01	m

Itamar Soares de Melo é engenheiro agrônomo, com mestrado e doutorado pela Esalq/USP e pós doutorado pela Universidade de Londres. É pesquisador da Embrapa Meio Ambiente e professor de pós-graduação na USP (Biotecnologia), UNESP (Botucatu e Rio Claro) e UFS Cat.

*Stenocarpium alternatum*

João Lúcio de Azevedo é engenheiro agrônomo, com doutorado na USP e Ph.D pela Universidade de Sheffield, Grã-Bretanha. Tem pós-doutorado pela Universidade de Manchester. É professor de cursos de graduação e pós-graduação na USP, Unicamp, UFG, UFP, Unesp, UFRJ, UFPE, UCS e UMC.

*Agrobacterium*

*tum minutans*



*Beauveria bassiana*

*Paecilomyces farinosus*

*Neozygites spp.*

*Sporobolomyces*

*Nomuraea rileyi*

*B. Sphaericus*

*Metarhizium anisopliae*

*Trichoderma*

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

*radiobacter*

*Talaromyces fla*

ISBN 85-85771-08-9



9 788585 771089

CONCORDIA  
BIBLIOTECA  
FRANCESCO  
CANTON

*a cura*

*Milano*

632.96  
M528c  
2000  
v. 3 ex. 1  
LV-2000