

ISSN 1516-8840

Dezembro, 2012

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Clima Temperado

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Documento 348

Técnicas e Procedimentos de Suporte Laboratorial ao Controle Biológico de Pragas

Glaucia de Figueiredo Nachtigal

Embrapa Clima Temperado

Pelotas, RS

2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado
BR 392 Km 78
Caixa Postal 403, CEP 96010-971 - Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8199
Fax: (53) 3275-8219 – 3275-8221
Home Page: www.cpact.embrapa.br
e-mail: sac@cpact.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Ariano Martins de Magalhães Júnior
Secretária - Executiva: Joseane Mary Lopes Garcia
Membros: Márcia Vizzotto, Ana Paula Schneid Afonso, Giovani Theisen, Luis Antônio Suita de Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Christiane Rodrigues Congro, Regina das Graças Vasconcelos dos Santos.
Suplentes: Isabel Helena Verneti Azambuja e Beatriz Marti Emygdio.

Supervisão editorial: Antônio Luiz Oliveira Heberlê
Revisão de texto: Ana Luiza Barragana Viegas
Normalização bibliográfica: Fábio Lima Cordeiro
Editoração eletrônica e Ilustração da capa: Juliane Nachtigall (estagiária)
Fotos da capa: Max Silva Pinheiro

1ª edição

1ª impressão (2011): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei Nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Clima Temperado

Nachtigal, Glaucia de Figueiredo.

Técnicas e procedimentos de suporte laboratorial ao controle biológico de pragas / Glaucia de Figueiredo Nachtigal. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2012.
50 p. -- (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 348).

ISSN 1516-8840

Planta – Inseto – Praga – Controle biológico . I. Título. II. Série

CDD 632.96

© Embrapa 2012

Autores

Glaucia de Figueiredo Nachtigal

Engenheira-agrônoma, Doutora em
Agronomia, pesquisadora da Embrapa Clima
Temperado, Pelotas, RS,
glaucia.nachtigal@cpact.embrapa.br

Apresentação

O interesse pelo controle biológico como ferramenta para o manejo integrado é cada vez maior, uma vez que os agentes de biocontrole representam papel crucial na regulação de pragas nos ecossistemas. No Brasil, a exploração da biodiversidade tropical para tal fim é ainda bastante incipiente frente às potencialidades existentes e diversos são os fatores que contribuem para isto. As oportunidades para a exploração desta biodiversidade, com a finalidade de desenvolvimento e de aumento da inserção do controle biológico nos sistemas produtivos, certamente demandam um grande esforço de pesquisa de equipes multidisciplinares que promovem o avanço do conhecimento essencial para o desenvolvimento de agentes de biocontrole em suas diferentes fases. Possibilitar a otimização de tempo e de recursos humanos e financeiros é, neste aspecto, basilar para o desenvolvimento tecnológico.

Este documento vem colocar à disposição de estudantes e de profissionais da área de controle biológico um panorama atual sobre algumas ferramentas, destacadas por sua ampla potencialidade

ou utilização, e empregadas, em nível laboratorial, como suporte à geração de tecnologia em controle biológico.

Clenio Nailto Pillon
Chefe-Geral
Embrapa Clima Temperado

Sumário

1. Introdução.....	9
2. Recursos Genéticos de interesse ao controle biológico.....	11
2.1 Prospecção de recursos microbianos.....	
2.2 Coleções Biológicas e Centros de Recursos Microbianos: acesso aos recursos microbianos de interesse ao controle biológico.....	13
2.3 Intercâmbio internacional de inimigos naturais via sistema quarentenário.....	15
2.4 Sistemática como ferramenta.....	17
3. Ecologia microbiana e dinâmica populacional de agentes de biocontrole.....	21
3.1 Análise da variabilidade genética de agentes de biocontrole e seus hospedeiros.....	23
3.2 Dinâmica populacional de comunidades fúngicas	
3.3 Metabólitos secundários.....	24
4. Interação patógeno/hospedeiro/ambiente.....	25

4.1 Ferramentas de <i>screening</i> : avaliação do nível de dano e potencial epidêmico de agentes potenciais de biocontrole.....	27
4.2 Microscopia eletrônica como ferramenta.....	28
4.3 Predição do risco associado aos agentes potenciais de biocontrole.....	29
5. Biogeografia	30
5.1 Modelagem de nicho ecológica.....	30
6. Referências.....	36

Técnicas e Procedimentos de Suporte Laboratorial ao Controle Biológico de Pragas

Glaucia de Figueiredo Nachtigal

Introdução

Muitas pragas, incluindo artrópodes, plantas invasoras e patógenos, afetam adversamente a produção agrícola. O manejo destas pragas ainda está embasado no uso de agrotóxicos sintéticos, o que, não raro, ocasiona danos à saúde do agricultor e ao meio ambiente. Por esta razão, existe potencial para desenvolvimento de métodos mais adequados para o controle de pragas, com ênfase nas táticas biológicas e ecológicas que possam ser empregadas como parte de estratégias de manejo integrado.

Os inimigos naturais são de enorme valor para a agricultura sustentável e podem substituir ou reduzir a necessidade de utilização dos agrotóxicos, de modo a existir uma tendência para o aumento do controle biológico, atendendo às demandas internacionais para uso de práticas agrícolas menos agressivas ao meio ambiente no manejo de pragas exóticas e nativas.

No Brasil, apesar desta realidade ainda estar longe do ideal, o controle biológico de pragas vem sendo utilizado regularmente em culturas como soja, cana-de-açúcar, algodão e fruteiras, de modo a reduzir a demanda por controle químico, especialmente de

insetos-praga e doenças, em diversos sistemas de manejo, com impacto positivo para o meio ambiente, a qualidade de vida dos trabalhadores rurais e para a segurança e qualidade dos produtos que chegam ao consumidor (LOPES et al., 2005). Vislumbram-se significantes oportunidades para a disponibilidade e o aumento da inserção do controle biológico clássico e inundativo nos sistemas produtivos demandantes, o que tem gerado um esforço de pesquisa para o desenvolvimento de agentes de biocontrole em suas diferentes fases. Nesse ínterim, gerir adequadamente este esforço é basilar e desafiador para os pesquisadores atuantes na área, já que diferentes são as ferramentas que podem otimizar a condução e o desenvolvimento das ações de pesquisa.

As distintas abordagens do presente trabalho tiveram sua origem no âmbito do XV MET, Encontro Nacional sobre Metodologias e Gestão de Laboratórios da Embrapa e II Simpósio sobre Metodologias de Laboratório de Pesquisa Agropecuária, cujo tema foi “A pesquisa agropecuária como instrumento para a competitividade e o desenvolvimento sustentável”, uma realização da Embrapa Clima Temperado, com o intuito de colocar à disposição de interessados no controle biológico um panorama geral sobre algumas técnicas e procedimentos empregados no desenvolvimento de agentes de biocontrole, destacados por sua ampla utilização ou potencialidade.

2. Recursos Genéticos de interesse ao controle biológico

2.1 Prospeção de recursos microbianos

O controle biológico de pragas envolve a ação de organismos vivos em seus ecossistemas nativos, ou em outros ecossistemas, quando introduzidos na expectativa de que se estabeleçam e promovam efetivo controle das pragas. Sua utilização requer intercâmbio contínuo, responsável e seguro de inimigos naturais entre países, como também a conservação ex situ das espécies de inimigos naturais nativos (SÁ, 2003).

Embora, em seu território, o Brasil reúna entre 15% e 20% de toda a biodiversidade mundial, estimada entre 10 e 15 milhões de espécies de insetos e desconhecida riqueza de microrganismos, com abrangência de imensa diversidade de populações dentro de cada espécie, além de grande diversidade de interações em cada ecossistema (LOPES et al., 2005), esta biodiversidade é quase desconhecida.

Os microrganismos constituem a maior parte da biodiversidade do planeta, estimada em 3,1 milhões de espécies, mas somente cerca de 5% foram descritas (MENDONÇA-HAGLER, 2001) e uma pequena porcentagem, do total estimado de 1,5 milhões de fungos (HAWKSWORTH; ROSSMAN, 1997), está sendo cultivada. A biodiversidade tropical encerra, desta forma, um imenso potencial para o desenvolvimento tecnológico e a implementação do controle

biológico no manejo integrado de pragas nos sistemas produtivos brasileiros e, também, de outros países.

As estratégias mais elaboradas de prospecção visam a exploração de microrganismos provenientes da maior diversidade de habitats possível e, tradicionalmente, a atividade biológica destes microrganismos tem sido acessada por métodos envolvendo isolamento, cultivo e manutenção do organismo em cultura axênica para a sua preservação e experimentação *in vivo* e *in vitro*. Apesar da natureza fastidiosa (de crescimento lento e necessidade de meios e condições específicas de cultivo) de alguns fungos (FILION et al., 2003) e do fato de que as técnicas de cultivo possam predispor os microrganismos à seletividade do meio escolhido e à ruptura de células durante a amostragem e subsequente processamento, microrganismos cultiváveis são, do ponto de vista histórico, uma fonte inestimável de agentes de biocontrole.

Metodologias moleculares desenvolvidas nas últimas décadas e impulsionadas pelos avanços em biologia molecular, genômica (área da ciência que pesquisa e desenvolve tecnologia para a investigação da estrutura e organização dos genes de um determinado organismo), metagenômica (designação coletiva dos genomas da microbiota total encontrada em uma comunidade) e bioinformática (coleta e armazenamento de informações em bases de dados, análise e síntese da informação visando a geração do conhecimento) foram otimizadas e adaptadas para superar as

limitações impostas pela abordagem clássica nos estudos de populações microbianas, evitando o isolamento e o cultivo dos microrganismos (OLIVEIRA et al., 2006). Tal abordagem envolve a lise de células microbianas na matriz do solo, a extração dos ácidos nucleicos e a análise de sequências-alvo nas amostras mistas de DNA de organismos diversos (metagenoma), utilizando para isso hibridização com sondas ou primers grupo-específicos. Esta estratégia foi adotada como ferramenta para a detecção e identificação de espécies de *Trichoderma* (HAGN et al., 2007), um fungo que não só responde por uma grande porção da biomassa fúngica existente nos diferentes tipos de solos, mas também por isolados que são potentes no controle de uma ampla gama de fitopatógenos (PAPAVIZAS, 1985, MISHRA et al., 2000, LEWIS; LUMDSEN, 2001), nematoides (MEYER et al., 2001) e plantas invasoras (HUTCHINSON, 1999).

Inventários de diversidade taxonômica determinam a extensão da diversidade de organismos presentes em uma amostra e a forma como tal potencial pode ser explorado. A estratégia de prospecção, direcionada por informações de sistemática e dados geoecológicos, deve nortear a busca de inimigos naturais de espécies-alvo.

2.2 Coleções Biológicas e Centros de Recursos Microbianos: acesso aos recursos microbianos de interesse ao controle biológico

Nos programas de controle biológico, os recursos microbianos

representam a grande base biológica, atual ou potencial, para a geração de tecnologia, de modo que assegurar a devida caracterização e a preservação dos mesmos é fundamental para o desenvolvimento do controle biológico no século XXI. Neste contexto, as coleções biológicas ou centros de recursos biológicos desempenham papel na conservação da biodiversidade e são responsáveis pela aquisição, caracterização, autenticação, preservação e distribuição de material biológico com conformidade assegurada (SETTE, 2005).

A procura por material biológico em coleções reconhecidas se deve, principalmente, ao fato de que estas coleções possuem, como procedimentos de rotina, a realização de testes de controle de qualidade e autenticação do material (SETTE, 2005). Vislumbra-se que as dificuldades impostas ao trânsito de material biológico, como ação global para preservação da biodiversidade, com certeza resultarão numa maior procura por coleções de serviço e/ou centros de recursos biológicos como forma de acesso aos recursos microbianos relevantes para o País (OLIVEIRA et al., 2006).

No Brasil, o sistema existente de coleções de serviço é ainda bastante incipiente, em razão da falta de uma política adequada para tal fim (CANHOS; VAZOLLER, 2005).

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária abriga uma diversidade microbiana significativa em coleções de culturas de interesse ao controle biológico. Essas coleções são mantidas nas diversas unidades da empresa e, enquanto algumas apresentam bom nível de organização e intensa atividade de intercâmbio e serviços, outras são coleções de trabalho (LOPES; MELLO, 2005).

Inseridas no contexto da Rede Microbiana da Embrapa encontram-se as coleções de microrganismos para o controle biológico de fitopatógenos e plantas daninhas, de vírus, fungos e bactérias de invertebrados, que respondem pela manutenção de um fluxo contínuo de coleta, isolamento, caracterização e avaliação de agentes de biocontrole, notoriamente cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner, estirpes de Baculovirus, entomopatógenos e fungos agentes de biocontrole de plantas invasoras e de doenças de plantas, bem como de documentação dos acessos e disponibilização de organismos de interesse ao controle biológico à comunidade científica. Embora tais coleções suportem um nível considerável de organização e prestação de serviços, têm ainda um papel central a cumprir quanto à avaliação da conformidade do material biológico a fim de atingirem o status de coleções de serviço (MELLO, informação pessoal).

2.3 Intercâmbio internacional de inimigos naturais via sistema quarentenário

Todo projeto de controle biológico clássico, para ter êxito, necessita de cooperação internacional para a exploração e prospecção de inimigos naturais no exterior. O sucesso depende, substancialmente, do bom relacionamento dessa cooperação entre os parceiros.

O Brasil, como signatário da Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) e com o compromisso de buscar formas de contraposição ao problema global causado pela perda acelerada

da biodiversidade, definiu os arcabouços legais e normativos para a coleta e a regulação ao acesso, compartilhamento e uso sustentável da biodiversidade nacional (BRASIL, 2008). A legislação dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição justa e equitativa dos benefícios derivados da sua utilização, sendo o acesso regulado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), pertencente ao Ministério do Meio Ambiente.

A tendência de aumento do uso do controle biológico clássico tem motivado grande debate e mobilização, individual e coletiva, em torno das ameaças concretas ao trânsito de material biológico devido ao estabelecimento de um regime global de compartilhamento de benefícios oriundos da exploração de agentes clássicos de biocontrole entre países, o que dificulta a exportação e a introdução de espécies potencialmente úteis. Países como a Índia e vários na América Latina introduziram leis quanto ao acesso e compartilhamento de benefícios que tornaram problemática a exportação deste tipo de material (COCK, 2010). No Brasil, o trânsito de material biológico para fins de intercâmbio de organismos vivos para pesquisa em controle biológico de pragas é efetuado pelo Laboratório Costa Lima (LQCL), em Jaguariúna, SP. Desde seu credenciamento, em 1991, o laboratório vem atendendo a uma série de programas de controle biológico clássico em desenvolvimento no país, envolvendo procedimentos quarentenários, criação de organismos, análise de risco de pragas e limpeza do material em área de máxima segurança (SÁ, 2003). Com relação à cooperação internacional, atende aos pedidos

de exportação de agentes de controle biológico, colaborando com outros órgãos públicos federais, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) do Ministério do Meio Ambiente (MMA), por meio da emissão de pareceres técnico-científicos quanto à conveniência ou não da exportação desses organismos (MORAES et al., 1996; SÁ, 1997).

2.4 Sistemática como ferramenta

O enorme potencial que reside na exploração dos recursos microbianos tem incentivado o interesse pelos estudos relacionados à sistemática e à filogenia desses organismos (BILLS, 1995; PFENNING, 2001). Por sistemática entende-se a ciência dedicada a inventariar e descrever a biodiversidade e a compreender as relações filogenéticas entre os organismos. Inclui a taxonomia, que trata da descoberta, descrição e classificação das espécies e grupo de espécies, com suas normas e princípios, e também a filogenia, que estuda as relações evolutivas entre os organismos (WIKIPÉDIA, 2010).

A gradual introdução de dados moleculares na sistemática fúngica tem impulsionado a pesquisa sobre a diversidade e especiação daqueles grupos de fungos estudados há séculos.

O caso do gênero *Trichoderma*, fungo mitospórico adotado como agente de biocontrole de vários fungos fitopatogênicos, serve para ilustrar a tendência atual em taxonomia fúngica, baseada em dados moleculares. Com a disponibilidade de análise de DNA para a sistemática fúngica, pesquisadores do gênero rapidamente incorporaram RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e, posteriormente, análise sequencial para o desenvolvimento da taxonomia de *Trichoderma* (LIECKFELDT et al., 1998). A partir de 2000, as regiões ITS (internal transcribed spacer) dos genes do RNA-ribossômico passaram a ser consideradas, de modo que nas duas últimas décadas, um número muito grande de espécies de *Trichoderma* foram reconhecidas. A abundante homoplasia dos caracteres morfológicos é, provavelmente, a razão pela qual o número de espécies morfológicamente distintas é significativamente menor do que o número de espécies filogeneticamente reconhecidas usando-se métodos de análise de sequência gênica (DRUZHININA et al., 2006).

Enquanto a região ITS é usada principalmente para comparar espécies intimamente relacionadas ou mesmo strains de uma mesma espécie, a comparação de pequenas subunidades de rDNA ribossômico (18S) pode prover uma percepção sobre a diversidade de taxa fúngicos distantes ou não relacionados (HAGN et al., 2003). Empregando RAPD, estes autores puderam promover a diferenciação de ecotipos de *Trichoderma* em solos submetidos a diferentes sistemas de manejo, sendo possível identificar

Trichoderma viride Pers. Ex S.F. Gray, *Trichoderma atroviride* Karsten e, pela primeira vez, *Trichoderma piluliferum* Webster & Rifai, além de uma espécie nova.

Os esforços recentes no desenvolvimento de ferramentas modernas para a identificação de espécies de *Trichoderma* colocaram-no em posição privilegiada que permite a identificação de todas as espécies conhecidas pela aplicação da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), sequenciamento de DNA e ferramentas de bioinformática.

Esta situação não é a mesma para outros gêneros fúngicos de interesse ao controle biológico, a exemplo do fungo *Cercospora caricis* Oudem que, no Brasil, tem sido estudado como agente de biocontrole para tiririca-roxa (*Cyperus rotundus* L.), uma planta invasora de difícil controle e encontrada em diversos tipos de solo, clima e sistemas de produção. As diferenças quanto aos aspectos morfológicos entre espécimes de *C. caricis* podem estar associadas a variações ambientais, levando Blaney e Van Dike (1988) a sugerirem que algumas características tradicionalmente usadas para identificação de espécies de *Cercospora* não são necessariamente estáveis. Por outro lado, estudos conduzidos por Inglis et al. (2001), utilizando marcadores moleculares, possibilitaram distinguir o grupo de isolados procedentes da região do cerrado, com alta similaridade genética. Em contraste, os isolados de outras áreas geográficas brasileiras mostraram-se menos relacionados aos isolados daquele grupo, pelas

estimativas de similaridade obtidas nas análises de RAPD e RFLP. Entretanto, as análises de sequências ITS não confirmaram essa divisão dos isolados brasileiros, indicando a necessidade de um extensivo levantamento de espécies de *Cercospora* associadas com *Cyperaceae*, utilizando esses marcadores moleculares para o estabelecimento de uma metodologia que possa auxiliar na taxonomia de isolados de *C. caricis*. Os fungos deste gênero carecem de critérios taxonômicos (de classificação e identificação) bem estabelecidos, que venham a auxiliar no subsequente monitoramento e controle da qualidade de isolados de *C. caricis* selecionados para desenvolvimento como bio-herbicidas (uma das estratégias de controle biológico de plantas invasoras que utiliza patógenos à semelhança dos herbicidas químicos sintéticos).

Embora a diagnose com base no DNA seja mais efetiva na detecção da variabilidade do que técnicas baseadas em proteínas, estudos bioquímicos envolvendo proteínas solúveis têm demonstrado que várias espécies de nematoides-das-galhas (*Meloidogyne*) podem ser diferenciadas por meio de fenótipos enzimáticos, obtidos pela eletroforese em géis de poliacrilamida (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001). Na Embrapa Clima Temperado, a eletroforese tem sido empregada como ferramenta para a identificação de espécies de *Meloidogyne* com foco na avaliação de agentes de biocontrole desta praga e para a avaliação de enzimas de resistência induzidas em plantas associadas aos agentes de biocontrole de fitonematóides (BAUER, informação pessoal). Adicionalmente, é possível detectar espécies atípicas e populações com misturas de espécies, efetuar levantamentos das espécies no campo, determinar a frequência e

a distribuição relativa das diferentes espécies, bem como purificar essas populações antes da condução de avaliação de resistência de plantas ou especificidade de hospedeiros.

3. Ecologia microbiana e dinâmica populacional de agentes de biocontrole

3.1 Análise da variabilidade genética de agentes de biocontrole e seus hospedeiros

A existência de variações genéticas em populações de patógenos permite a seleção de isolados mais virulentos e/ou adaptados para propósitos especiais, de modo que o conhecimento da variabilidade da população do agente de biocontrole é um requerimento básico quando se deseja implementar um programa de controle biológico. Por outro lado, a existência de biotipos diferenciados de uma mesma espécie de invasora-alvo pode vir a se constituir em empecilho para o uso de um único isolado do agente de biocontrole.

Neste contexto, os métodos moleculares tornaram-se indispensáveis para fazer inferências sobre a estrutura de populações e as relações genéticas entre os organismos. A técnica de RAPD é a mais fácil de usar de todas as técnicas baseadas em DNA e os perfis dos produtos de uma amplificação revelam polimorfismos grupo-específicos que podem ser usados como marcadores para o mapeamento genético.

A habilidade em distinguir genótipos de tiririca-roxa e tiririca-amarela (*Cyperus esculentus* L.) e de diferentes isolados de ferrugem [*Puccinia canaliculata* (Schw.) Lagerh], por exemplo, mostrou-se crítica para o desenvolvimento de estratégias para o controle biológico destas espécies invasoras (OKOLI et al., 1997). A análise de RAPD foi empregada para estudar a diversidade genética em ambas as espécies de tiririca, coletadas em diferentes localizações geográficas, e os autores puderam explicar a suscetibilidade diferencial dos biotipos de tiririca à *P. canaliculata*, um fungo que incita ferrugem nas espécies-alvo e que aparentava ser um candidato promissor a bio-herbicida. Se todas as plantas tivessem a mesma base genética, deveriam reagir ao inóculo da ferrugem do mesmo modo, a menos que diferenças nas condições ambientais favorecessem a rápida disseminação da infecção em uma localidade e não em outra. Por outro lado, a ferrugem deveria causar infecção em todos os membros das espécies alvo e sua efetividade não deveria ficar limitada a certas localidades. Diferentes estratégias foram, contudo, apontadas como necessárias para o controle biológico das espécies de tiririca com base nos resultados alcançados. A tiririca-roxa mostrou ser passível de controle por meio de parasitas obrigatórios como a ferrugem, já que formava extensos clones regionais, mas, diferentemente, a tiririca-amarela mostrou-se geneticamente diversa dentro de uma pequena área geográfica, indicando que poderia ser difícil encontrar parasita obrigatório capaz de controlar a espécie em grandes áreas. Uma estratégia mais racional apontada consistiu na exploração de populações de tiririca-amarela na busca de parasitas facultativos

infectivos de um grande número de genótipos da espécie-alvo. Também no Brasil, a existência de suscetibilidade diferenciada a isolados de *C. caricis* em acessos de tiririca-roxa (TEIXEIRA et al., 2001) demonstrou a importância de se conhecer a variabilidade da espécie alvo e do patógeno, inter e intraespecífica, a ser levada em conta na implementação de estratégias para o controle biológico desta planta invasora.

3.2 Dinâmica populacional de comunidades fúngicas

Pouco é conhecido quanto à sobrevivência, disseminação e dinâmica populacional de agentes de biocontrole uma vez aplicados a campo. Este conhecimento pode levar ao desenvolvimento de formulações e estratégias de aplicação mais eficientes, dois fatores que têm influenciado grandemente o nível de controle alcançado em sistemas de biocontrole baseados em microrganismos (COSTA et al., 2000, KRAUSS; SOBERANIS, 2002).

Algumas vezes, o biocontrole fracassa, mesmo já tendo sido empregado com sucesso anteriormente. Isto pode ocorrer, dentre outros fatores, devido à perda de competência ecológica do agente, de modo que monitorar o grau de sobrevivência, crescimento e disseminação do agente no campo é essencial.

Estudos de populações isolado-específicas requer a habilidade para distinguir os isolados introduzidos daqueles da população natural já presente. As técnicas avançadas à base de sondas moleculares

tornaram possível o monitoramento de agentes de biocontrole ao nível de espécie, raça ou isolado específico (ABBASI et al., 1999, LECLERC-POTVIN et al., 1999).

Dodd et al. (2004) empregaram marcadores endógenos, sequências únicas de DNA que distinguem e detectam, no solo, um isolado específico de *Trichoderma virens* Miller, Giddens & Foster dos demais, por meio do emprego do método SCAR (sequence-characterised amplified regions). A contribuição deste estudo foi desenvolver um método rápido e eficaz que possibilitou a detecção de *T. virens* nos solos, de modo a facilitar o monitoramento de sua sobrevivência e disseminação em estudos de campo.

3.3 Metabólitos secundários

Dentre as diversas abordagens na exploração de microrganismos do solo para controle de plantas invasoras, há a perspectiva de utilização de metabólitos secundários tóxicos produzidos por esses organismos (MELLO et al., 2003). Estes metabólitos podem exercer papel fundamental como fator de patogenicidade ou virulência do patógeno e podem ser explorados em diferentes caminhos: (1) pela manipulação genética do organismo agente de biocontrole, de modo a potencializar a produção destes compostos, aumentando sua patogenicidade à planta alvo e, por conseguinte, sua eficiência; (2) pela purificação e utilização direta dos mesmos, como herbicidas naturais; e (3) por meio da incorporação do fungo em substrato que suporte o crescimento do agente de biocontrole

e a produção de metabólitos secundários tóxicos à espécie alvo (HUTCHINSON et al., 1999).

Metabólitos produzidos pelos agentes de biocontrole podem ser mais limitados em efeito do que os químicos sintéticos. É desejável que a quantificação em um bioensaio seja efetuada por meio de um índice que inclua um termo descrevendo o efeito da concentração do composto inibidor e um termo que expresse a duração que o composto inibidor permanece ativo (MISCHKE, 1997). O desenvolvimento de um bioensaio quantitativo para medir a atividade de compostos inibidores de fungos filamentosos foi proposto pelo autor para determinar diferenças na produção de atividade metabólica extracelular por *T. virens* e fungos de biocontrole relacionados. Por meio do índice de inibição, um único valor que incorpora a resposta às concentrações dos compostos inibitórios e a persistência da inibição, a eficácia antagonista dos metabólitos produzidos pelos isolados de *Trichoderma* spp., como glioviridina, viridiana e viridiol, dos quais viridiol é fortemente fitotóxico (JONES et al., 1988), pode ser medidos com base na inibição a um organismo indicador.

4. Interação patógeno/hospedeiro/ambiente

4.1 Ferramentas de screening: avaliação do nível de dano e potencial epidêmico de agentes potenciais de biocontrole

A ocorrência de doença em plantas não deve ser considerada uma ação isolada de um patógeno sobre o hospedeiro, mas o resultado

de uma complexa rede de interações ecológicas e ambientais que torna o hospedeiro particularmente vulnerável ao fitopatógeno e este apto a infectar e a colonizar o hospedeiro. O sucesso da introdução de um agente de biocontrole depende, em muito, dentre outros fatores, das condições do ambiente e do manejo agrícola utilizado.

Estudos sobre as interações patógeno-hospedeiro, em ambientes controlados e em condições de campo, tentam determinar as condições sob as quais os organismos seriam mais efetivos como agentes de biocontrole (TEBEEST; TEMPLETON, 1985). Assim, a idade em que a planta hospedeira se torna mais suscetível, a faixa de temperatura e o período de umidificação, bem como a concentração de inóculo adequada para o estabelecimento de altos níveis de doença devem ser definidos, para cada associação patógeno/hospedeiro, nas etapas iniciais de um programa de controle biológico.

Observações sobre o desenvolvimento da doença, em diferentes condições do ambiente, são de importância fundamental para o estabelecimento de técnicas e procedimentos que favoreçam o desenvolvimento do patógeno e, conseqüentemente, o controle da espécie alvo (CHARUDATTAN; WALKER, 1982; TEBEEST, 1991). Em geral, estes experimentos levam em conta a letalidade do agente à espécie-alvo após pulverização, com base, respectivamente, na determinação do índice de mortalidade ou na incidência da doença, na porcentagem de área foliar afetada e/ou

na redução da matéria seca (parte aérea e do sistema radicular). A avaliação da influência da idade da planta, período de umidificação e concentração de inóculo no desenvolvimento dos sintomas causados pelo fungo *C. caricis* em plantas de tiririca-roxa (BORGES NETO et al., 2000) possibilitou identificar variáveis que, uma vez alteradas (modificação da forma ou do momento de liberação do agente causal), poderiam contribuir para maior eficiência deste organismo como agente de biocontrole.

4.2 Microscopia eletrônica como ferramenta

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um instrumento importante para avaliação, exame e análise das características microestruturais de amostras biológicas e não biológicas (CASTRO, 2001). O estudo de materiais biológicos envolve, na grande maioria dos casos, informações de topografia da superfície; para este tipo de imagem usam-se elétrons secundários (baixa energia), provenientes da interação do feixe primário com a camada de ouro que recobre o espécime.

Em geral, a utilização do MEV pela comunidade científica é ainda restrita, mas este panorama tem sido modificado pela aquisição destes equipamentos por muitas instituições de ensino e pesquisa. O equipamento possui alta resolução e grande profundidade de foco (distância na qual o plano da imagem-plano focal- pode ser deslocado enquanto um único plano do objeto permanece em foco aceitável durante a observação), o que permite o levantamento

e exame de um grande número de caracteres, a exemplo de superfícies mais rugosas em magnificações muito mais altas.

O processo de infecção de *C. caricis* em plantas de tiririca-roxa, inoculadas com micélio do fungo, foi estudado por meio de microscopia eletrônica de varredura por Borges Neto et al. (1998). As observações sobre o processo de infecção de *C. caricis* em tecidos foliares de tiririca são importantes para o desenvolvimento de metodologia de aplicação do fungo. Tornou-se evidente com esse estudo, por exemplo, que as formulações fúngicas deveriam promover a redistribuição e a adesão das partículas na superfície foliar, de modo a atingir os sítios de penetração (estômatos) na superfície abaxial e, ao mesmo tempo, proteger o fungo contra as adversidades ambientais durante a fase pré-penetração (MELLO et al., 2003). Adicionalmente, identificou-se a maior suscetibilidade de plantas mais velhas à infecção (BORGES NETO et al., 2000) e um aumento da eficácia do patógeno em controlar a espécie-alvo por meio de aplicações sucessivas do fungo (TEIXEIRA et al., 2001).

A microscopia eletrônica também possibilitou visualizar as estruturas que caracterizam o fungo *Darluca filum* (Biv. Bem. Ex Fr.) Berk., um hiperparasita do fungo *Tranzschelia discolor* (Funckel) Tranz & Livt, que incita a ferrugem da folha da ameixeira, de modo a contribuir para o conhecimento da relação existente entre ambos e a implementação do controle biológico do agente causal (CASTRO et al., 2004).

4.3 Predição do risco associado aos agentes potenciais de biocontrole

No controle biológico clássico, agentes exóticos de biocontrole, usualmente selecionados com base em parasitoides, predadores e patógenos que coevoluíram com as pragas, são introduzidos na área onde se pretende efetuar o controle.

Controle biológico seguro requer mais do que simplesmente coletar agentes de um habitat, multiplicá-los e colocá-los em um novo habitat esperando que algo positivo aconteça. Isto deve ser complementado com o conhecimento da biodiversidade na área, anteriormente à liberação do agente, e monitoramento, detalhado e de longo prazo, pós-liberação.

A participação da especificidade de hospedeiro e de outras estratégias para avaliar o risco tem sido extensivamente relatada na literatura pertinente ao controle biológico de plantas invasoras (LOUDA et al., 2003; SHEPPARD et al., 2003).

O teste de especificidade de hospedeiro começa com a seleção de plantas a serem testadas e esta seleção é única para cada espécie de planta e para cada país. O método centrífugo filogenético tradicional, baseado em hierarquias taxonômicas oriundas da similaridade morfológica (WAPSHERE, 1974), vem sendo substituído devido aos avanços relacionados ao conhecimento das relações filogenéticas entre plantas e ao comportamento e evolução na escolha do hospedeiro por parte do agente de

biocontrole (KELCH; McCLAY, 2004).

Briese (1996, 2003 e 2005) explicou, em detalhes, o significado dos avanços recentes em filogenia de plantas e como estes podem levar à melhoria na listagem das plantas-teste. Este método seleciona plantas primariamente com base em suas relações filogenéticas com a planta invasora-alvo, contemplando aspectos biogeográficos e ecológicos para garantir que as plantas a serem testadas incluam espécies com maior risco associado. Procedimentos atuais de seleção incluem espécies que ocorrem no mesmo habitat da espécie-alvo, com composição química similar e infectadas por parentes próximos dos agentes potenciais de biocontrole, bem como espécies raras ou em perigo de extinção (BRIESE, 2004).

Especificidade de hospedeiro e segurança são sinônimos para liberações de inimigos naturais exóticos pela estratégia clássica de biocontrole, mas não em relação aos bio-herbicidas. Na estratégia do bio-herbicida, os patógenos são nativos nas áreas em que se pretende utilizá-los e, desta forma, os riscos de efeitos à flora local são menores.

5. Biogeografia

5.1 Modelagem de nicho ecológico

Para ser bem sucedido, um agente selecionado para o controle

biológico precisa ser capaz de persistir e desenvolver-se no clima da região na qual o controle é pretendido. Agentes de controle biológico com ampla tolerância climática necessitam ser escolhidos cuidadosamente, pois herbívoros e fitopatógenos especialistas, que apresentem distribuições restritas em sua região de origem, podem ter tolerância climática estreita, o que limita sua habilidade em controlar a espécie alvo em toda sua distribuição espacial. Agentes de biocontrole selecionados de áreas com condições climáticas similares são considerados mais adequados para garantir controle efetivo (HOELMER; KIRK, 2005) e a incompatibilidade climática entre as áreas de origem e de introdução é considerada uma das principais razões pelas quais os agentes de biocontrole não se estabelecem ou não formam populações (BYRNE et al., 2002; HOELMER; KIRK, 2005).

A seleção de agentes de biocontrole que sejam adaptados às áreas onde se pretende as liberações requer uma análise do clima da região de origem e dos locais de liberação, de modo a estreitar a área pesquisada e reduzir a incompatibilidade climática como um potencial complicador no estabelecimento do agente no campo.

A modelagem de nicho ecológico, neste sentido, é um componente importante nos programas de controle biológico de pragas. Os modelos geram associações entre as variáveis ambientais e os registros de ocorrência de espécies para identificar as condições do ambiente dentro das quais as populações podem ser mantidas, permitindo estimar a distribuição espacial do ambiente favorável a

uma determinada espécie para uma área de estudo. A ferramenta tem sido amplamente usada para predizer o estabelecimento potencial e a distribuição de plantas invasoras em sua região de introdução (DUNLOP et al., 2006; RAIMUNDO et al., 2007), para identificar áreas climáticas similares à região de introdução para a liberação de agentes de biocontrole (PALMER; SERENATE, 2007; PALMER et al., 2007) e, algumas vezes, para identificar áreas na região nativa para explorar agentes que sejam climaticamente adaptados àquelas pretendidas para a liberação (SERENATE et al., 2006).

Em relação aos fundamentos teóricos, o resultado da modelagem de nicho ecológico não representa a distribuição real da espécie e sim a distribuição das áreas onde a espécie tem potencial de estar. Isto ocorre por se utilizar, no processo de modelagem, a distribuição real (registro de ocorrência dos dados bióticos) e variáveis ambientais (dados abióticos), sem considerar a atuação de outras influências bióticas, como interação entre espécies tais como competição e predação, e das barreiras geográficas. Desta forma, no processo de modelagem, a área de distribuição geográfica potencial é sempre maior, representando o nicho fundamental e não o nicho realizado (PHILLIPS et al., 2006; AUSTIN, 2002).

A modelagem de nicho ecológico é realizada com base nos dados bióticos, que resumem as coordenadas geográficas do registro de ocorrência da espécie, e nos dados abióticos, que resumem as camadas ambientais utilizadas no processo de modelagem.

Os registros de ocorrência da espécie e variáveis ambientais informadas são inscritos no algoritmo matemático com vistas a identificar as condições ambientais associadas com a ocorrência geográfica da espécie, pressupondo que as condições climáticas que uma espécie pode tolerar pode ser inferida a partir do conhecimento acerca de sua distribuição (PEARSON, 2007).

O padrão de distribuição geográfica espacial potencial do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees), considerada a pior espécie invasora vegetal do Bioma Pampa, e do agente etiológico da ferrugem (*Uromyces* sp.) (NACHTIGAL; COSTA, 2010), um agente potencial de biocontrole, preditos com base na modelagem de nicho ecológico e no esforço amostral das espécies na região de Fronteira da Metade Sul do Rio Grande do Sul, ilustram o emprego desta ferramenta. Tanto o capim-annoni-2 quanto a ferrugem ficaram delimitados ao domínio climático muito peculiar da região Sul do Brasil (clima subtropical), muito embora se saiba que o capim-annoni-2 encontra-se presente em uma área consideravelmente maior, envolvendo os estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia e o Distrito Federal (INSTITUTO HÓRUS, 2008). Foram utilizados dois tipos de planos de informação bióticos para subsidiar, calibrar e avaliar os modelos de distribuição de espécies, sendo que os registros de presença correspondentes à ocorrência da espécie levantada no campo, com o auxílio de receptor GPS (sistema de posicionamento global) de navegação, e os de ausência, por nem sempre refletirem uma ausência real ou inadequação do ambiente para a ocorrência da espécie, foram considerados como pseudo-ausências (pontos escolhidos aleatoriamente na área de estudo

e usados como ausências durante a modelagem). Este tipo de conduta levou à seleção de algoritmos híbridos ou intermediários, dos quais o algoritmo genético para predição de regras - GARP (genetic algorithm for rule-set production) (STOCKWELL; PETERS, 1999) - presente no ambiente de modelagem do software OpenModeller (2009) e o algoritmo de máxima entropia Maxent (PHILLIPS et al., 2006) do ambiente de modelagem do software Maxent (2009) foram as opções.

A análise comparativa entre os dois algoritmos avaliados indicou que o algoritmo Maxent apresentou um maior ajuste aos pontos amostrados, resultando em uma distribuição geográfica potencial mais restritiva, diferentemente do algoritmo GARP. Entretanto, embora o agente etiológico da ferrugem do capim-annoni-2 seja um fungo biotrófico e, portanto, bastante dependente do seu hospedeiro, o modelo gerado por meio do algoritmo GARP do software de modelagem OpenModeller, considerando os registros de ocorrência de *Uromyces* sp. na região de fronteira da Metade Sul do Rio Grande do Sul, mostrou-se bastante restritivo, prevendo-se notoriamente a região da Serra do Sudeste e da Campanha como sendo climaticamente adequadas para o patógeno, muito embora o capim-annoni-2 apresente potencial de adaptação climática a uma região mais abrangente no Sul do País (NACHTIGAL; COSTA, 2010).

Por meio da modelagem para a comparação da similaridade climática entre as regiões de ocorrência do capim-annoni-2 no

continente africano e no Brasil, efetuada com o emprego do software Maxent, foram identificadas áreas com maior similaridade em relação à região nativa da espécie nos estados do Sudeste (SP, MG, ES, RJ), Centro-Oeste (GO, MT e MS) e Nordeste (BA). Por outro lado, a predição de distribuição do capim-annoni-2 no Rio Grande do Sul, tomada com base na compatibilidade climática entre os locais invadidos na região nativa e no Brasil, indica que a espécie alvo tem uma ampla capacidade de adaptação, o que, provavelmente, fez com que alcançasse um alto nível de invasão mesmo em condições climáticas desfavoráveis para seu desenvolvimento. Este fato explica, pelo menos parcialmente, o potencial invasivo que a espécie detém, com comprometimento de diferentes biomas brasileiros e, inclusive, de importantes polos de produção pecuária de leite e de corte, como é o caso dos estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás, onde a invasão tem causado, ou poderá vir a causar, impactos sócio-econômicos e ambientais consideráveis. Em relação à prospecção de agentes de biocontrole no continente africano, Nachtigal e Costa (2010) verificaram que inimigos naturais daquela região teriam um baixo potencial de adaptação às áreas invadidas, à exceção da região Sudeste do Brasil. Este conhecimento tem importância fundamental na delimitação da área de abrangência dos levantamentos de inimigos naturais em países africanos, de modo a resultar na otimização de tempo e recursos financeiros pela busca direcionada de inimigos naturais para o estabelecimento de agentes de biocontrole nas referidas áreas invadidas no Brasil.

6. Referências

ABBASI, P.A., MILLER, S., MEULIA, T., HOITINK, H.A.J., KIM, J. Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes by using molecular markers. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington , v. 65, p.5421-5426. 1999.

AUSTIN, M. Spatial prediction of species distribution: an interface between ecological theory and statistical modeling. *Ecological Modelling*, Amsterdam, v. 157, p. 101-118, 2002.

BILLS, G.F. Analyses of microfungal diversity from a users perspective. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa , v. 73, p. 533-534, 1995.

BLANEY, C.L., VAN DIKE, C.G. *Cercospora caricis* from *Cyperus esculentus* (yellow nutsedge): morphology and cercosporin production. *Mycologia*, New York, v. 80, p. 418-421, 1988.

BORGES NETO, C.R., MELLO, S.C.M., RIBEIRO, Z.M.A., ÁVILA, Z.R., MALTY, J.S., FONTES, E.M.G. Influência da idade da planta, período de umidificação e concentração de inóculo no desenvolvimento de sintomas provocados por *Cercospora caricis* em tiririca. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v. 25, p. 138-142, 2000.

BORGES NETO, C.R., SILVEIRA, E.B., MELLO, S.C.M., FONTES, E.M.G. Scanning electron microscopy of the infection process of *Cercospora caricis* on purple nutsedge. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v. 23, p. 169-172, 1998.

BRASIL. Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001. Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e transferência de tecnologia para sua conservação e utilização, e dá outras providências. Presidência da República Federativa do Brasil, Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/MPV/2186-16.htm>. Acesso em: 14 maio 2008.

BRIESE, D.T. Phylogeny: can it help us to understand host-choice by biological control agents? In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS, 9., 1996, Cape Town. Proceedings... Cape Town: University of Cape Town, 1996. p. 63-70.

BRIESE, D.T. The centrifugal phylogenetic method used to select plants for host-specificity testing of weed biological control agents: can and should it be modernized? In: BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS SYMPOSIUM AND WORKSHOP, 2002, Perth. Improving the selection, testing and evaluation of weed biological control agents. Proceedings... Adelaide: CRC for Australia Weed Management: University of Adelaide, 2003. p. 23-33.

BRIESE, D.T. Translating host-specificity test results into the real world: the need to harmonise the yin and yang of current testing procedures. *Biological Control*, San Diego, v. 35, p. 208-214, 2005.

BRIESE, D.T. Weed biological control: applying the science to solve seemingly intractable problems. *Australian Journal of Entomology*, Canberra, n. 43, p. 304-317, 2004.

BYRNE, M.J., CURRIN, S., HILL, M.P. The influence of climate on the establishment and success of the biocontrol agent *Gratiana spadicea*, released on *Solanum sisymbriifolium* in South Africa. *Biological Control*, San Diego, v. 24, p.128-134, 2002.

CANHOS, V.P., VAZOLLER, R.F. Coleções de culturas de serviços e centros de recursos biológicos. Brasília, DF: Centro de Referência em Informação Ambiental, 2005. Disponível em: < <http://www.cria.org.br/cgee/col/> > . Acesso: 07 dez. 2010.

CARNEIRO, R.M.D., ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, v. 25, p. 35-44, 2001.

CASTRO, L. A. S. de. Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura. Pelotas: Embrapa Clima Temperado,

2001. 37 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 93).

CASTRO, L.A.S., ROXA, N.E.M., ABRANTES, V.L. Procedimento de visualização e avaliação do fungo *Darluca filum* em folhas de ameixeira utilizando microscopia eletrônica. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 3 p. (Embrapa Clima Temperado. Comunicado técnico, 109).

CHARUDATTAN, R.; WALKER, H. L. Biological control of weeds with plant pathogens. New York: J. Wiley, 1982. 293 p.

COCK, M. Biopiracy rules should not block biological control. *Nature*, London, v. 467, p. 369. Disponível em: < <http://www.nature.com/news/2010/100922/full/467369a.html> > Acesso: 29 set. 2010.

COSTA, J.L.D., MENGE, J.A., CASALE, W.L. Biological control of *Phytophthora* root rot of avocado with microorganisms grown in organical mulches. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 31, p. 239-246, 2000.

DODD, S.L., HILL, R.A., STEWART, A. A duplex-PCR bioassay to detect a *Trichoderma virens* biocontrol isolate in non-sterile soil. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 36, p.1955-1965, 2004.

DRUZHININA, I.S., KOPCHINSKIY, A.G., KUBICEK, C.P. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data.

Mycoscience, v. 47, p. 55-64, 2006.

Disponível em: <<http://link.periodicos.capes.gov.br/ez103.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=infofi/fmt:kev:mtx:ctx&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_ver=Z39.88-2004&rft_id=info:sid/sfxit.com:azlist&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=110978976781983&svc.fulltext=yes>. Acesso em: 29 set. 2010.

DUNLOP, E.A., WILSON, J.C., MACKEY, A.P. The potential geographic distribution of the invasive weed *Senna obtusifolia* in australia. Weed Research, Oxford, v. 46, p. 404-413, 2006.

FILION, M.; ST-ARNAUD, M.; JABAHI-HARE, S.H. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v. 53, p. 67-76. 2003.

HAGN, A., PRITSCH, K., SCHLOTER, M., MUNCH, J.C. Fungal diversity in agricultural soil under different farming management systems, with special reference to biocontrol strains of *Trichoderma* spp. Biology and Fertility and Soils, Berlin, v. 38, p. 236-244, 2003.

HAGN, A., WALLISCH, S., RADL, V., MUNCH, J.C., SCHLOTER, M. A new cultivation independent approach to detect and monitor common *Trichoderma* species in soils. Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v. 69, p. 86-92, 2007.

HAWKSWORTH, D. L.; ROSSMAN, A. Y. Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology*, St.Paul, v. 87, p. 888-891, 1997.

HOELMER, K.A.; KIRK, A.A. Selecting arthropod biological control agents against arthropod pests: Can the science be improved to decrease the risk of releasing ineffective agents? *Biological Control*, San Diego, v. 34, p. 255–264, 2005.

HUTCHINSON, C.M. *Trichoderma virens* – inoculated composted chicken manure for biological weed control. *Biological Control*, San Diego , v. 16, p. 217-222,1999.

INGLIS, P.W., TEIXEIRA, E.A., RIBEIRO, D.M., VALADARES-INGLIS, M.C., TIGANO, M.S., MELLO, S.C.M. Molecular markers for the characterization of brasilian *Cercospora caricis* isolates. *Current Microbiology*, New York , v. 42, p.194-198, 2001.

INSTITUTO HÓRUS DE DESENVOLVIMENTO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL. Espécies exóticas invasoras: fichas técnicas. Disponível em: <www.institutohorus.org.br>. Acesso em: 11 mar. 2008.

JONES, R.W., LANINI, W.T., HANCOCK, J.G. Plant growth response to the phytotoxin viridiol produced by the fungus *Gliocladium virens*. *Weed Science*, Ithaca, v. 36, p. 683-687,

1988.

KELCH, D.G.; McCLAY, A. Putting phylogeny into the central phylogenetic method. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS, 11., 2003, Canberra. Proceedings... Canberra: CSIRO Entomology, 2004. p. 287-291.

KRAUSS, U., SOBERANIS, W. Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. *Biological Control*, San Diego, v. 24, p. 82-89, 2002.

LECLERC-POTVIN, C., BALMAS, V., CHAREST, P.M., JABAJI-HARE, S. Development of reliable molecular markers to detect non-pathogenic binucleate *Rhizoctonia* isolates (AG-G) using PCR. *Mycological Research*, Cambridge, v. 103, p. 1165-1172, 1999.

LEWIS, J.A., LUMDSEN, R.D. Biocontrol of damping-off of greenhouse grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. *Crop Protection*, Surrey, v. 20, p. 49-56, 2001.

LIECKFELDT, E., KUHLS, K., MUTHUMEENAKSHI, M. Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and their teleomorphs. In: KUBICEK, C.P., HARMAN, G.E. (Ed.). *Trichoderma and Gliocladium. Basic biology, taxonomy and genetics*. London: Taylor & Francis, 1998. v. 1, p. 35-74.

LOPES, M.A., MELLO, S.C.M. de. Estratégias para melhoria, manutenção e dinamização do uso dos bancos de germoplasma relevantes para a agricultura brasileira. In: WORKSHOP DIRETRIZES E ESTRATÉGIAS PARA A MODERNIZAÇÃO DE COLEÇÕES BIOLÓGICAS BRASILEIRAS E A CONSOLIDAÇÃO DE SISTEMAS INTEGRADOS DE INFORMAÇÃO SOBRE BIODIVERSIDADE, 2005, Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.cria.org.br>>. Acesso em: 07 dez. 2010.

LOPES, M.A., NASS, L.L., MELO, I.S. de. Bioprospecção. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Uberlandia, v. 34, p. 29-35, 2005.

LOUDA, S.M.; PEMBERTON, R.W.; JOHNSON, M.T.; FOLLET, P.A. Nontarget effects – the Achilles’ heel of biological control? Retrospective analysis to reduce risk associated with biocontrol introductions. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 48, p. 65-396, 2003.

MAXENT. Maxent software for species habitat modeling . Versão 3.2.19. Disponível em <<http://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent/>>. Acesso em: 5 mai 2009.

MELLO, S. C. M. de., TEIXEIRA, E. A., BORGES NETO, C. R. Fungos e seus metabólitos no controle da tiririca. Brasília,DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 55 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 104).

MENDONÇA-HAGLER, L.C.S. Biodiversidade e Biossegurança. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Uberlandia, v.18, p.16-22, 2001.

MEYER, S.L.F., ROBERTS, D.P., CHITWOOD, D.J., CARTA, L.K., LUMDSEN, R.D., MAO, W.L. Application of *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma virens*, alone and in combinations, against *Meloidogyne incognita* on bell pepper. *Nematropica*, Auburn, v. 31, p. 75-86, 2001.

MISCHKE, S. A quantitative bioassay for extracellular metabolites that antagonize growth of filamentous fungi, and its use with biocontrol fungi. *Mycopathologia*, The Hague , v. 137, p. 45-52, 1997.

MISHRA, P.K., MUKHOPADHYAY, A.N., FOX, R.T.V. Integrated and biological control of gladiolus corn rot and wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*. *Annals of Applied Biology*, Cambridge , v. 137, p. 361-364, 2000.

MORAES, G.J. de; SÁ, L.A.N. de; TAMBASCO, F.J. Legislação brasileira sobre intercâmbio de agentes de controle biológico. Jaguariúna: Embrapa - CNPMA, 1996. 16 p. (EMBRAPA -CNPMA. Documentos, 3).

NACHTIGAL, G. de F., COSTA, F.A. da. Modelagem de nicho

ecológico: implicações na priorização de áreas para exploração e liberação de agentes de biocontrole do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) no Brasil. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 34 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 292).

OKOLI, C.A.N., SHILLING, D.G., SMITH, R.L., BEWICK, T.A. Genetic diversity in purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) and yellow nutsedge (*Cyperus esculentus* L.). *Biological Control*, San Diego, v. 8, p.111-118, 1997.

OLIVEIRA, V. M. de, SETTE, L.D., FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. *MultiCiência*, São Carlos, n. 7, out. 2006.

Disponível em:

<http://link.periodicos.capes.gov.br/ez103.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:ctx&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_ver=Z39.88-2004&rft_id=info:sid/sfxit.com:azlist&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=1000000000489779&svc.fulltext=yes>. Acesso em: 2 jun. 2009.

OPENMODELLER. Open modeller desktop. Version 1.0.9. Source forge. 2009. Disponível em: <https://sourceforge.net/project/showfiles.php?group_id=101808&package_id=142057> Acesso em: 2 jun. 2009.

PALMER, W.A.; LOCKETT, C.J.; SERENATE, K.A.D.W.;

McLENNAN, A. The introduction and release of *Chiasmia inconspicua* and *C. assimilis* (Lepidoptera: Geometridae) for biological control of *Acacia nilotica* in Australia. *Biological Control*, San Diego, v. 41, p. 368-378, 2007.

PALMER, W.A.; SERENATE, K.A.D.W. The host range and biology of *Cometarser pyrula*; a biocontrol agent for *Acacia nilotica* subsp. *indica* in Australia. *BioControl*, Dordrecht, v. 52, p.129-143, 2007.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.23, p. 23-54. 1985.

PEARSON, R.G. Species' distribution modelling for conservation educators and practitioners:synthesis. American Museum of Natural History, 2007. Disponível em: <<http://ncep.amnh.org> >. Acesso em: 10 nov. 2008.

PFENNING, L.H. Potencial de uma rede de coleções de microrganismos: fungos de interesse agroindustrial e biotecnológico. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina. Anais... Londrina: IAPAR, 2001. p. 159-162.

PHILLIPS, S.J.; ANDERSON, R.P.; SCHAPIRE, R.E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological*

Modelling, Amsterdam, v. 190, p. 231-259, 2006.

RAIMUNDO, R.L.G.; FONSECA, R.L.; SCHACHETTI PEREIRA, R.; PETERSON, A.T.; LEWINSOHN, T.M. Native and exotic distribution of siam weed (*Chromolaena odorata*) modelled using the genetic algorithm for rule-set production. *Weed Science*, Ithaca, v. 55, p. 41-48, 2007.

SÁ, L.A.N. de. Legislação brasileira sobre coleta, importação e exportação de organismos. Informativo da Sociedade Entomológica do Brasil, Brasília, DF, v. 23, n. 1, p. 4, 1997.

SÁ, L.A.N.de. Intercâmbio de inimigos naturais benéficos via sistema quarentenário em programas de controle biológico de pragas no cone sul. In: ENCONTRO NACIONAL DA ECOECO, 5., 2003, Caxias do Sul. Encontros... Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Economia Ecológica, 2003. Disponível em: <<http://www.ecoeco.org.br/publicacoes/encontros/109-v-encontro-nacional-da-ecoeco-caxias-do-sul-rs-2003>>. Acesso em: 07 dez. 2010.

SERENATE, K. A. D. W.; PALMER, W. A.; SUTHERST, R. W. Use of CLIMEX modelling to identify prospective areas for exploration to find new biological control agents for prickly acacia. *Australian Journal of Entomology*, Canberra, v. 45, p. 298-302, 2006.

SETTE, L. D. Recursos humanos e infra-estrutura para coleções microbiológicas. In: WORKSHOP DIRETRIZES E ESTRATÉGIAS

PARA A MODERNIZAÇÃO DE COLEÇÕES BIOLÓGICAS BRASILEIRAS E A CONSOLIDAÇÃO DE SISTEMAS INTEGRADOS DE INFORMAÇÃO SOBRE BIODIVERSIDADE, 2005, Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.cria.org.br>>. Acesso em: 07 dez. 2010.

SHEPPARD, A.W.; HILL, R.; DeCLERCK-FLOATE, R.A; McCLAY, A; OLCKERS, T.; QUIMBY JR., P.C.; ZIMMERMANN, H.G. A global review of risk-benefit-cost analysis for the introduction of classical biological control agents against weeds: a crisis in the making? *Biocontrol News and Information*, London, v. 24, p. 91-108, 2003. Disponível em: <<http://www.pestscience.com/PDF/BNIra66.PDF>>. Acesso em: 22 fev. 2009.

STOCKWELL, D. R. B., PETERS, D. The GARP modelling system: Problems and solutions to automated spatial prediction. *International Journal of Geographical Information Systems*, London, v.13, p.143-158, 1999.

TEBEEST, D. O. Ecology and epidemiology of fungal plant pathogens studied as biological microbial control of weeds. New York: Chapman & Hall, 199. p. 97-114.

TEBEEST, D.O.; TEMPLETON, G. E. Mycoherbicides: progress in the biological control of weeds. *Plant Disease*, St.Paul , v. 69, p. 6-10, 1985.

TEIXEIRA, E.A., MELLO, S.C.M., PEREIRA, W.C., CORDEIRO, C.M.T. Suscetibilidade de acessos de tiririca a dois isolados de *Cercospora caricis*, visando o seu uso no controle biológico. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 16 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 10).

WAPSHERE, A. J. A strategy for evaluating the safety of organisms for biological weed control. *Annals of Applied Biology*, Cambridge, v. 77, p. 201-211, 1974.

WIKIPÉDIA. Sistemática. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Sistem%C3%A1tica>>. Acesso em: 26 out. 2010.

