

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Metarhizium anisopliae* s.l. PARA O
CONTROLE BIOLÓGICO DE *Rhipicephalus microplus* A PARTIR DA
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR E TESTES DE
PATOGENICIDADE**

Simone Quinelato Bezerra

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Metarhizium anisopliae* s.l.
PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Rhipicephalus microplus* A
PARTIR DA CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR E
TESTES DE PATOGENICIDADE**

SIMONE QUINELATO BEZERRA

Sob a Orientação da Professora
Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

e Co-orientação das Professoras
Dra. Aurea Maria Lage de Moraes e Dra. Viviane Zahner

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Ciências**, no Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias, Área de
Concentração em Parasitologia
Veterinária

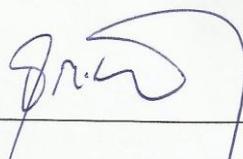
Seropédica, RJ
Março de 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

SIMONE QUINELATO BEZERRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

TESE APROVADA EM 30/03/2012



Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. PhD. UFRRJ
(Orientadora)



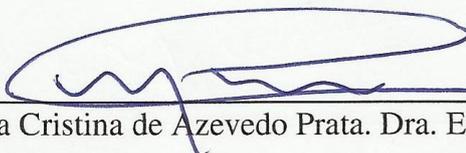
Cintia de Moraes Borba. Dra. FIOCRUZ-RJ



Éverton Kort Kamp Fernandes. Dr. UFG



Gisela Lara da Costa. Dra. FIOCRUZ-RJ



Márcia Cristina de Azevedo Prata. Dra. EMBRAPA-MG

591.65

B574s

T

Bezerra, Simone Quinelato, 1980-

Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. para o controle biológico de *Rhipicephalus microplus* a partir da caracterização morfológica e molecular e testes de patogenicidade / Simone Quinelato Bezerra – 2012.

84 f. : il.

Orientador: Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 64-83.

1. Pragas – Controle biológico - Teses. 2. *Metarhizium anisopliae* - Teses. 3. Carrapato - Controle – Teses. 4. Genética – Pesquisa – Teses. I. Bittencourt, Vânia Rita Elias Pinheiro, 1959-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

Dedico este trabalho,

A Deus, pois está escrito...
“...sem Mim, nada podeis fazer.”(João 15:5);

Aos meus pais, Jorge (in memoriam) e Ana,
pelo amor incondicional, apoio e preciosos ensinamentos;

A tia Maria José,
por acreditar e sempre me incentivar.

“Pessoas que sabem soluções já dadas são mendigos permanentes. Pessoas que aprendem a inventar soluções novas são aquelas que abrem portas até então fechadas e descobrem novas trilhas. A questão não é saber uma solução já dada, mas ser capaz de aprender maneiras novas de sobreviver.”

(Rubem Alves)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre presente em minha vida, me dando coragem e conforto para prosseguir, sempre me colocando ao lado de pessoas especiais e guiando meus passos para o caminho da felicidade;

À minha mãe Ana, pelo amor, amizade, por lutar sempre ao meu lado e acreditar nos meus sonhos;

À Tia Maria José, pela amizade e incentivo, fundamentais para que eu trilhasse o caminho acadêmico;

Ao meu namorado Anderson, pelo amor, compreensão e companheirismo;

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela educação de qualidade, inigualável experiência de vida e belos entardeceres;

À professora Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt, pela orientação, ensinamentos, críticas, por acreditar no meu potencial, mesmo quando eu duvidei e pela amizade que compartilhamos. Ressalto o meu respeito e admiração pela sua serenidade, capacidade de análise do perfil de seus alunos, inibindo sempre a vaidade em prol da simplicidade e eficiência;

À Dra. Aurea Maria Lage de Moraes, pela co-orientação, ensinamentos, críticas e incentivos, pela confiança, apoio incondicional e amizade;

À Dra. Viviane Zahner, pela co-orientação e experiências compartilhadas;

Ao professor Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes, sempre atencioso e disposto a contribuir;

Ao professor Dr. Carlos Luiz Massard, pelo apoio e fundamental disponibilização do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores e seus equipamentos;

Ao professor Dr. Huarrisson Azevedo Santos, pela confiança, por compartilhar suas experiências e conhecimentos, pela amizade e apoio constantes;

Aos amigos do Laboratório de Controle Microbiano (UFRRJ), Isabele da C. Angelo, Wendell M. de S. Perinotto, Patrícia S. Gôlo, Mariana G. Camargo, Fillipe A. de Sá, Jôsie Marcelle Albuquerque, Ana Paula R. Moraes, Caio J. B. Rodrigues, Allan F. Marciano, Jéssica Fiorotti, Sabrina Rezende e Caio Monteiro, pelo apoio incondicional, amizade verdadeira e inesquecíveis momentos compartilhados;

Aos amigos do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores (UFRRJ), Marcus S. Pires, Maristela Peckle, Cláudia B. da Silva e Joice A. R. Vilela pela acolhida, amizade e experiências compartilhadas;

As “meninas” do Departamento de Micologia (IOC/FIOCRUZ-RJ), Érica Ziehe, Camila Ferreira, Cíntia Alves, Roberta Heringer, Mônica Guedelha, Marcelly M. dos S. Brito e Cláudia Melo, pela ajuda, torcida e amizade;

À amiga Melissa Chambarelli, pelo apoio, bom-humor e por estar sempre ao meu lado me incentivando;

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela oportunidade de aperfeiçoar minha formação;

À FAPERJ pelo auxílio financeiro, fundamental para o desenvolvimento deste estudo;

Ao assistente administrativo Arthur Santiago Jr., demais funcionários da secretaria do CPGCV e aos técnicos de laboratório Ivan e Maurício, sempre atenciosos e prestativos;

À todos os professores do CPGCV, pelos conhecimentos transmitidos;

À todos os funcionários, técnicos e alunos do CPGCV, por contribuírem direta ou indiretamente para este estudo;

Aos amigos (as) verdadeiros, que mesmo distantes, sempre torceram por mim e compreenderam minha ausência;

À todos os meus familiares, que mesmo de longe, sempre me apoiaram e torceram por mim;

E a todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram nessa conquista.

BIOGRAFIA

Simone Quinelato Bezerra, filha de Jorge Luiz Bezerra e Ana Quinelato, nasceu no dia 31 de dezembro de 1980 na cidade de Nova Iguaçu-RJ. Em 1994 concluiu o ensino fundamental no Colégio Novo Horizonte em Nova Iguaçu-RJ e, em 1997 o ensino médio pelo Colégio EME, no mesmo município.

Ingressou no Curso de Medicina Veterinária em 2001, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde obteve o grau de Bacharel em 2006. Ainda na graduação, foi contemplada com bolsa de Iniciação Científica pelo CNPq, no período de agosto de 2003 a março de 2006, participando de projetos de pesquisa no laboratório de Helminologia sob orientação da Professora Dra. Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues.

Em março de 2006, iniciou o Mestrado, sob orientação da Professora Dra. Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias com Área de concentração em Parasitologia Veterinária, sendo bolsista pela CAPES. O Mestrado foi concluído em fevereiro de 2008.

No mês de março de 2008, iniciou o Doutorado no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias com Área de concentração em Parasitologia Veterinária, sob orientação da Professora Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt e co-orientação das pesquisadoras da FIOCRUZ/RJ, Dra. Aurea Maria Lage de Moraes e Dra. Viviane Zahner, sendo inicialmente bolsista pela CAPES e posteriormente beneficiada pelo programa bolsa nota dez da FAPERJ.

Durante o período acadêmico participou de Congressos e eventos científicos, publicando artigos em periódicos indexados nacionais e internacionais. E nesta data, apresenta e defende esta tese como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

RESUMO

QUINELATO, Simone. **Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. para o controle biológico de *Rhipicephalus microplus* a partir da caracterização morfológica e molecular e testes de patogenicidade.** 2012. 84p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2012.

Na tentativa de diminuir a utilização de produtos químicos e os danos por eles causados, novas alternativas para o controle de carrapatos vem sendo estudadas. O fungo *Metarhizium anisopliae* é um dos mais estudados em programas agropecuários de manejo de pragas, pois apresenta grande potencial acaricida. Baseado nisso, o presente estudo objetivou a caracterização morfológica, molecular e a avaliação da virulência de 30 isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. provenientes de diferentes regiões geográficas, hospedeiros ou substratos, com a finalidade de selecionar isolados mais virulentos para utilização em futuros programas de biocontrole de carrapatos. Inicialmente os isolados foram caracterizados morfolologicamente para confirmação de sua identificação, também sendo avaliado o potencial de produção de conídios de cada isolado. As colônias estudadas apresentaram características morfológicas compatíveis com as descritas na literatura. O tamanho das colônias variou entre 29,66 mm e 51,33 mm de diâmetro. Houve variação no comprimento e na largura de conídios e fiáldes num mesmo isolado, assim como a presença de fiáldes agrupadas e solitárias. O potencial de produção de conídios foi variável entre os isolados, porém tanto o tamanho dos conídios quanto o diâmetro das colônias não influenciaram a produção de conídios. Numa segunda etapa do estudo, foi avaliada a virulência destes isolados sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com uma das quatro diferentes concentrações de conídios (10^5 , 10^6 , 10^7 ou 10^8 conídios/mL). Foi confirmada a ação letal dos isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. sobre larvas de *R. microplus*, geralmente ocorrendo de forma diretamente proporcional a concentração conidial dos tratamentos. A maioria dos isolados ocasionou a morte de metade da população de larvas com a concentração de 10^7 conídios/mL; os isolados mais virulentos apresentaram esta concentração letal com 10^6 conídios/mL, com percentuais médios de mortalidade de larvas próximos de 100% ao 20º dia após tratamento. Além disso, buscou-se avaliar a variabilidade genética destes isolados e sua relação com outras espécies do gênero *Metarhizium* através da análise de RFLP-PCR e do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA. Não foi observado um padrão de especificidade para o agrupamento entre isolados oriundos de mesma região, hospedeiro ou substrato. Foi observada variabilidade genética entre os isolados que basicamente se agruparam em dois grupos. O isolado CG 344 mostrou-se geneticamente distante de todos os outros, mas de acordo com a comparação com sequências obtidas do “GenBank” mostrou-se relacionado ao gênero *Metarhizium*. Esta variação pode ser devido ao fato deste isolado ter sido poupado de processos que gerassem alterações morfológicas e moleculares, o que possivelmente contribuiu para a pequena variabilidade genética observada. O presente estudo possibilitou a detecção de isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. com elevada virulência para larvas de *R. microplus*, podendo ser considerados potenciais agentes no biocontrole desta espécie de carrapato, ressaltando a importância da utilização de ferramentas moleculares para identificação e caracterização destes isolados, contribuindo para a qualidade do produto, o sucesso de sua aplicação e o monitoramento de um isolado introduzido no ambiente com finalidade de controle biológico.

Palavras-Chave: Controle biológico, *Metarhizium anisopliae*, *Rhipicephalus microplus*, variabilidade genética.

ABSTRACT

Quinelato, Simone. **Selection of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates for biological control of *Rhipicephalus microplus* from morphological and molecular characterization and pathogenicity tests.** 84p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Aiming to decrease the chemicals acaricide use and their damages, new alternatives for ticks control has been studied. *Metarhizium anisopliae* s.l. is one of the most studied fungi in agricultural pest management programs, since it has great acaricide potential. Therefore, this study aimed to characterize molecular and morphologically, as well as evaluate the virulent potential of 30 *M. anisopliae* s.l. isolates from different geographical regions, hosts or substrates allowing the selection of virulent isolates in order to be further investigated for field programs of microbial control of pests. Initially, the analyses of morphological characterizations of the isolates were made to confirm their identification. Each isolate had its conidial potential production evaluated. The colonies studied showed morphological characteristics consistent with those described in the literature. The colonies diameter varied between 29.66 mm and 51.33 mm among isolates. There was both length and width variation in the conidia and phialides in the same isolate, as well as the presence of grouped and solitary phialides. The conidial production potential was variable among isolates, but both conidial size and colonies diameter did not influence the conidial production; isolates with low conidial production showed similar colony size in comparison to isolates with high potential. In a second stage of the study, the virulence of these isolates was evaluated to *Rhipicephalus microplus* larvae treated with one of the four different conidial concentrations (10^5 , 10^6 , 10^7 or 10^8 conidia.mL⁻¹). The lethal action of Brazilian *M. anisopliae* s.l. isolates to *R. microplus* larvae were confirmed with high mortality among the isolates, which in general was proportional to the conidia concentration of the treatments. Most isolates killed larvae population with 10^7 conidia.mL⁻¹ concentration, however the most virulent isolates presented lethal concentration of 10^6 conidia.mL⁻¹ with main percentages of mortality nearly 100% at day 20 after treatment. In addition, the genetic variability of these isolates was performed to evaluate their relationship with other species of *Metarhizium* sp. through RFLP-PCR analysis and ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequencing. No specificity pattern was observed when isolates from the same region, host or substrate were grouped. Low genetic variability was observed among isolates, which were basically grouped into two groups. The CG 344 isolate was shown to be genetically distant from the remaining Brazilian isolates studied, but according to the “GenBank” sequences comparison, it was related to the *Metarhizium* genus. It is suggested that this variation occurred owing the lack of procedures that could generate morphological and molecular changes, which probably contribute to this low genetic variability. The present study allowed the detection of *M. anisopliae* s.l. isolates with highly virulence to *R. microplus* larvae, that may be considered potential biocontrol agents for this tick species, emphasizing the importance of molecular tools for identification and characterization of fungal isolates, ensuring the product quality, their success implement and the environmental track of the fungi at field biological control programs.

Key words: Biological control, *Metarhizium anisopliae*, *Rhipicephalus microplus*, genetic variation.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. com seus respectivos hospedeiros ou substrato e origens..... **21**

Tabela 2. Diâmetro médio das colônias (mm) e médias das dimensões de conídios e fiáldes (µm) de isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l.....**23**

CAPÍTULO II

Tabela 1. Isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. com seus respectivos hospedeiros ou substrato e origens.....**34**

Tabela 2. Percentual médio \pm desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 10 dias após a exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e Umidade Relativa $\geq 80\%$..**37**

Tabela 3. Percentual médio \pm desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 20 dias após a exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e Umidade Relativa $\geq 80\%$..**38**

Tabela 4. Percentual médio \pm desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 30 dias após a exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e Umidade Relativa $\geq 80\%$..**39**

Tabela 5. Concentração letal (CL 50 e CL 90) dos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. obtida no bioensaio de larvas de *Rhipicephalus microplus* 30 dias após o tratamento, Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e Umidade Relativa $\geq 80\%$**39**

CAPÍTULO III

Tabela 1. Isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. e *Beauveria bassiana* com seus respectivos hospedeiros ou substrato e origens.....**49**

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) utilizados no estudo.....**50**

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Colônias de isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. A=CG 148-colônia característica da maioria dos isolados estudados, verde oliva, lisa e zonada. B=IBCB 116-variação da tonalidade de verde oliva da colônia. C=CG 37-região central de coloração amarela evidente com presença de micélio aéreo. D=CG 49- presença de micélio aéreo na região periférica da colônia e centro com coloração amarela. E= CG 347- colônia com centro e borda periférica amarelas. F=IBCB 156-Colônia sulcada. G=ampliação do centro da colônia CG 49-notar produção de exsudato hialino (seta).....**25**

Figura 2. Isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. **A** (IBCB 116), **B** (CG 148) e **C** (CG 347) - conidióforo com fiálides justapostas e cilíndricas; **D** (CG 148), **E** (CG 37) e **F** (CG 87) - fiálides solitárias e conídios cilíndricos. Foto de microscopia óptica a magnitude de 1000 X, barras equivalentes a 10 µm.....**26**

Figura 3. Médias e desvio padrão da produção de conídios de 30 isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. cultivados em meio BDA a 25 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ durante 14 dias. O número de conídios expressa a produção média dos isolados em uma área de 0,589 cm²dacultura.....**27**

CAPÍTULO II

Figura 1. Percentual e desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidos após tratamento com isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. nas concentrações de 10^7 conídios/mL e 10^8 conídios/mL após 20 e 30 dias de tratamento. **A**=Percentuais médios e desvio padrão de mortalidade de larvas a concentração de 10^7 conídios/mL ao 20º dia após tratamento; **B**= Percentuais médios e desvio padrão de mortalidade de larvas a concentração de 10^7 conídios/mL ao 30º dia após tratamento; **C**= Percentuais médios e desvio padrão de mortalidade de larvas a concentração de 10^8 conídios/mL ao 20º dia após tratamento; **D**=Percentuais médios e desvio padrão de mortalidade de larvas a concentração de 10^8 conídios/mL ao 30º dia após tratamento.....**42**

CAPÍTULO III

Figura 1. Digestão da região ITS1-5.8S-ITS2 pela enzima de restrição *AluI*. PM=Marcador de peso molecular de 50pb (Ludwig Biotec). (1)=CG 629; (2)=IBCB 353; (3) CG 489; (4)=IBCB 384; (5)=CG 148; (6)=CG 312; (7)=IBCB 167; (8)=CG 668; (9)= CG 191; (10)=CG 49; (11)= CG 627; (12)=CG 580; (13)=IBCB 116; (14)=CG 626; (15)=CG 37; (16)=CG 347; (17)=CG 87; (18)= CG 420; (19)= CG 153; (20)= CG 112; (21)=CG 32; (22)=CG 579, (23)=IBCB 481; (24)= CG 578; (25)= IBCB 383; (26)=CG 344; (27)= IBCB 410; (28)= ESALQ 986 ("outgrup").....**53**

Figura 2. Digestão da região ITS1-5.8S-ITS2 pela enzima de restrição *DdeI*. PM=marcador de peso molecular de 50pb (Ludwig Biotec). (1)=CG 629; (2)=IBCB 353; (3) CG 489; (4)=IBCB 384; (5)=CG 148; (6)=CG 312; (7)=IBCB 167; (8)=CG 668; (9)= CG 191; (10)=CG 49; (11)= CG 627; (12)=CG 580; (13)=IBCB 116; (14)=CG 626; (15)=CG 37; (16)=CG 347; (17)=CG 87; (18)= CG 420; (19)= CG 153; (20)= CG 112; (21)=CG 32;

(22)=CG 579, (23)=IBCB 481; (24)= CG 578; (25)= IBCB 383; (26)=CG 344; (27)= IBCB 410; (28)= ESALQ 986 ("outgrup").....53

Figura 3. Digestão da região ITS1-5.8S-ITS2 pela enzima de restrição *HaeIII*. PM=marcador de peso molecular de 50pb (Ludwig Biotec). (1)=CG 629; (2)=IBCB 353; (3) CG 489; (4)=IBCB 384; (5)=CG 148; (6)=CG 312; (7)=IBCB 167; (8)=CG 668; (9)= CG 191; (10)=CG 49; (11)= CG 627; (12)=CG 580; (13)=IBCB 116; (14)=CG 626; (15)=CG 37; (16)=CG 347; (17)=CG 87; (18)= CG 420; (19)= CG 153; (20)= CG 112; (21)=CG 32; (22)=CG 579, (23)=IBCB 481; (24)= CG 578; (25)= IBCB 383; (26)=CG 344; (27)= IBCB 410; (28)= ESALQ 986 ("outgrup").....54

Figura 4. Digestão da região ITS1-5.8S-ITS2 pela enzima de restrição *HpaII*. PM=marcador de peso molecular de 50pb (Ludwig Biotec). (1)=CG 629; (2)=IBCB 353; (3) CG 489; (4)=IBCB 384; (5)=CG 148; (6)=CG 312; (7)=IBCB 167; (8)=CG 668; (9)= CG 191; (10)=CG 49; (11)= CG 627; (12)=CG 580; (13)=IBCB 116; (14)=CG 626; (15)=CG 37; (16)=CG 347; (17)=CG 87; (18)= CG 420; (19)= CG 153; (20)= CG 112; (21)=CG 32; (22)=CG 579, (23)=IBCB 481; (24)= CG 578; (25)= IBCB 383; (26)=CG 344; (27)= IBCB 410; (28)= ESALQ 986 ("outgrup").....54

Figura 5. Digestão da região ITS1-5.8S-ITS2 pela enzima de restrição *Sau3AI*. (PM)=marcador de peso molecular de 50pb (Ludwig Biotec); (1)=CG 629; (2)=IBCB 353; (3) CG 489; (4)=IBCB 384; (5)=CG 148; (6)=CG 312; (7)=IBCB 167; (8)=CG 668; (9)= CG 191; (10)=CG 49; (11)= CG 627; (12)=CG 580; (13)=IBCB 116; (14)=CG 626; (15)=CG 37; (16)=CG 347; (17)=CG 87; (18)= CG 420; (19)= CG 153; (20)= CG 112; (21)=CG 32; (22)=CG 579, (23)=IBCB 481; (24)= CG 578; (25)= IBCB 383; (26)=CG 344; (27)= IBCB 410; (28)= ESALQ 986 ("outgrup").....55

Figura 6. Dendrograma baseado nos perfis de restrição pela análise de RFLP-PCR de 27 isolados brasileiros de *M.anisopliae* s.l. utilizando-se o coeficiente SM ("Simple Matching") e o algoritmo de agrupamento UPGMA. O isolado ESALQ 986-*Beauveria bassiana* foi utilizado como "outgroup".....55

Figura 7. Dendrograma de "Neighbour-joining" dos dados do sequenciamento da região ITS do rDNA de 21 isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. gerado através do método de "Jukes-Cantor" e análise de "bootstrap" com 1000 replicações O isolado ESALQ 986-*Beauveria bassiana* foi utilizado como "outgroup".....57

Figura 8. Dendrograma de "Neighbour-joining" obtido através dos dados de sequenciamento da região ITS do rDNA de 21 isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. e de 15 seqüências de *Metarhizium* spp. obtidas do "GenBank" gerado através do método de "Jukes-Cantor" e análise de "bootstrap" com 1000 replicações O isolado ESALQ 986-*Beauveria bassiana* foi utilizado como "outgroup".....58

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
CAPÍTULO I	
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE ISOLADOS ASILEIROS DE <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l	17
Resumo	18
Abstract	19
1 Introdução	20
2 Material e Métodos	20
2.1 Delineamento experimental	20
2.2 Local	21
2.3 Obtenção e manutenção dos isolados	21
2.4 Caracterização morfológica	22
2.5 Avaliação da produção de conídios	22
3 Resultados	23
3.1 Caracterização morfológica	23
3.2 Avaliação da produção de conídios	26
4 Discussão	27
CAPÍTULO II	
AÇÃO DE ISOLADOS BRASILEIROS DE <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. SOBRE LARVAS DE <i>Rhipicephalus microplus</i>	30
Resumo	31
Abstract	32
1 Introdução	33
2 Material e Métodos	33
2.1 Local e período de execução dos bioensaios	33
2.2 Obtenção de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	34
2.3 Origem dos isolados	34
2.4 Elaboração e quantificação das suspensões	35
2.5 Viabilidade dos conídios	35
2.6 Delineamento experimental	35
2.7 Bioensaios	35
2.8 Reisolamento dos fungos	36
2.9 Análise estatística	36
3 Resultados	36
3.1 Viabilidade dos conídios	36
3.2 Percentual de mortalidade de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratadas com <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	36
3.3 Reisolamento fúngico	43
4 Discussão	43
CAPÍTULO III	
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS BRASILEIROS DE <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	45
Resumo	46
Abstract	47
1 Introdução	48
2 Material e Métodos	48
2.1 Localização	48
2.2 Origem dos isolados	49
2.3 Extração de DNA	50
2.4 Amplificação do DNA por PCR	50
2.5 Digestão dos produtos de PCR por enzimas de restrição (RFLP-PCR)	51
2.6 Análise dos perfis obtidos por RFLP-PCR	51
2.7 Purificação dos produtos de PCR	51
2.8 Sequenciamento da região ITS.1-5.85-ITS2 do rDNA	51
3 Resultados	52
3.1 Análise de RFLP-PCR da região ITS1-5.8S-ITS2	52

3.2. Sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de isolados brasileiros de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	56
4 Discussão	59
CONCLUSÕES GERAIS	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	84
A. Protocolo da reação de restrição pela enzima <i>AluI</i> (1000 u)	84
B. Protocolo da reação de restrição pela enzima <i>DdeI</i> (1000 u)	84
C. Protocolo da reação de restrição pela enzima <i>HaeIII</i> (1000 u)	84
D. Protocolo da reação de restrição pela enzima <i>HpaII</i> (1000 u)	84
E. Protocolo da reação de restrição pela enzima <i>Sau3AI</i> (500 u)	84

INTRODUÇÃO GERAL

Os carrapatos são ectoparasitos hematófagos capazes de infestar variadas espécies de animais, inclusive os seres humanos. *Rhipicephalus microplus* Canestrini, 1888 (Murrel e Barker, 2003) é um importante ectoparasito de bovinos, conhecido popularmente como o carrapato do boi, também pode ser encontrado parasitando outros mamíferos, utilizando-os como hospedeiros alternativos. Possui ampla distribuição mundial e parasita raças européias, taurinas e seus cruzamentos, causando grandes perdas econômicas, principalmente em rebanhos de regiões tropicais e subtropicais do mundo. Os prejuízos vão desde a diminuição do ganho de peso, queda na produção de leite, carne e couro, até a morte dos animais. Além dos elevados gastos com acaricidas e a transmissão de agentes patogênicos causadores da babesiose e anaplasmoze.

As práticas atuais de controle de carrapatos são baseadas principalmente no uso de agentes químicos, aumentando a incidência de casos de populações resistentes às diversas bases químicas utilizadas. A resistência é promovida por pressão seletiva, onde um percentual cada vez maior de indivíduos necessita de doses elevadas do carrapaticida para que seja controlado. O uso intensivo e inadequado de acaricidas e o aumento da frequência das aplicações aumentam progressivamente os casos de resistência.

A habilidade de *R. microplus* em desenvolver resistência aos diferentes acaricidas, a demanda cada vez maior por alimentos livres de resíduos químicos e os efeitos ambientais negativos causados pelos acaricidas vêm acarretando o desenvolvimento de estratégias de controle alternativo, que minimizem o uso de agentes químicos, como a seleção de bovinos resistentes aos carrapatos, o cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das larvas, a rotação de pastagens, o manejo de predadores naturais, o desenvolvimento de vacinas contra o carrapato e o controle microbiano de artrópodes.

A utilização de fungos entomopatogênicos com finalidade de controle biológico tem sido alvo de diversas pesquisas científicas, pois estes são importantes inimigos naturais de um grande número de artrópodes. O fungo *Metarhizium anisopliae* s.l. (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 foi um dos primeiros agentes a ser reconhecido como potencial candidato ao controle biológico de pragas agrícolas. É um fungo filamentosos de cultivo simples, necessitando quase que exclusivamente de uma fonte nutricional à base de amido, é cosmopolita, ocorrendo em diferentes regiões, desde ambientes de clima temperado até clima tropical.

É um dos fungos mais estudados em programas de manejo de pragas, uma vez que representa grande potencialidade como entomopatógeno. O desenvolvimento da doença em insetos está relacionado com a germinação do conídio, penetração através da cutícula por ação mecânico-enzimática, invasão, colonização do corpo do inseto e produção de toxinas. No Brasil, *M. anisopliae* é o fungo mais estudado no controle de pragas de plantações de cana-de-açúcar e do carrapato *R. microplus*.

Na maioria dos fungos assexuados, como *M. anisopliae*, a classificação e tipagem são normalmente baseadas em características morfológicas. Entretanto, este parâmetro tem se mostrado potencialmente limitado para a distinção entre espécies de *M. anisopliae*, devendo ser complementados com novos critérios para a diferenciação das espécies.

O estudo da região ITS (“Internal Transcribed Spacers”) do rDNA por PCR (“Polymerase Chain Reaction”) é muito utilizado na taxonomia de fungos. A região ITS está localizada entre os genes 18S, 5.8S e 28S rDNA e pode ser amplificada por oligonucleotídeos

iniciadores específicos. As regiões dos genes ribossomais são altamente conservadas dentro da espécie, porém as regiões dos espaçadores ITS acumulam maior variabilidade, podendo variar intraespecificamente na sequência de bases e no comprimento, sendo utilizadas na diferenciação de espécies ou entre linhagens da mesma espécie.

Embora diversos estudos no Brasil já tenham confirmado o potencial entomopatogênico de *M. anisopliae* para diversos artrópodes, inclusive *R. microplus*, são necessárias maiores informações sobre a variabilidade genética dos isolados pertencentes as diferentes regiões do país, diferentes hospedeiros ou substratos, associadas a variações em sua virulência.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi contribuir com informações relevantes ao controle microbiano de *R. microplus*, através da caracterização morfológica, análise da variabilidade genética de diferentes isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l.e avaliação da ação *in vitro* destes isolados sobre larvas de *R. microplus*.

REVISÃO DE LITERATURA

O carrapato *Rhipicephalus microplus*

O carrapato *Rhipicephalus microplus* pertence ao Filo Artropoda, Classe Aracnida, Subclasse Acari, Ordem Ixodida, Subordem Metastigmata e Família Ixodidae. É um ectoparasita obrigatório, necessitando passar uma fase de sua vida sobre o hospedeiro, ingerindo linfa, substratos teciduais e sangue (ROCHA, 1997).

O hospedeiro preferencial de *R. microplus* é o bovino, sendo maiores as infestações em *Bos taurus* e menores em *Bos indicus*, pois quanto maior o grau de sangue zebuino, maior a resistência ao carrapato (VILLARES, 1941; WHARTON et al., 1970; UTECH et al., 1978; LEE, 1979; MORAES et al., 1986; OLIVEIRA; ALENCAR et al., 1990, SILVA et al., 2010). Porém, em fases de grande infestação da pastagem, pode parasitar outros animais, incluindo o homem (GONZÁLES, 1974). Fatores como a idade, sexo e estado nutricional estão relacionados com a sensibilidade do bovino ao carrapato (SUTHERST et al., 1979, 1983; STEAR et al., 1984;).

Sua origem é asiática, especialmente da Índia e da Ilha de Java (WHARTON, 1974). Em função das expedições exploradoras e da importação de gado do continente asiático, ocorreu a sua expansão e introdução na maioria das regiões tropicais e subtropicais, como a Austrália, América Central, América do Sul e África (GONZÁLES, 2002), tendo se estabelecido dentro dos climas demarcados pelos paralelos 32° Norte e 32° Sul, com alguns focos no 35° Sul (NUÑEZ et al., 1982).

Adaptou-se perfeitamente ao clima dos países tropicais, onde o calor e a umidade propiciaram condições favoráveis à sobrevivência e manutenção da espécie (POWEL; REID, 1982). Atualmente encontra-se distribuído em todo o Brasil, variando de intensidade de acordo com as condições climáticas e os tipos raciais de bovinos explorados (GONZÁLES, 2002).

Estudos recentes, baseados em técnicas morfológicas e moleculares, revisaram os gêneros *Boophilus* e *Rhipicephalus*, permitindo caracterizar e determinar grande similaridade entre estes gêneros, propondo que as cinco espécies descritas anteriormente como pertencentes ao gênero *Boophilus* fossem transferidas para o gênero *Rhipicephalus*. Desta forma, alterou-se a classificação e o gênero *Boophilus* foi reclassificado como subgênero de *Rhipicephalus* (BEATI; KEIRANS, 2001; MURREL; BARKER, 2003).

Seu ciclo biológico divide-se em duas fases, uma de vida livre e uma parasitária. A fase de vida livre começa com o desprendimento da fêmea ingurgitada do hospedeiro. Após a queda da fêmea, inicia-se a fase de pré-postura, com duração de dois a três dias, seguida da postura dos ovos que dura em torno de três a seis semanas. A fase de eclosão ocorre entre cinco a dez dias. Após a eclosão das larvas, é necessário um período de dois a três dias para que se tornem larvas infestantes, estando aptas a subirem nos bovinos e iniciarem a fase parasitária, que dura em média, de 18 a 26 dias. Esta fase tem início com a fixação da larva no hospedeiro, ocorrendo em seguida a alimentação, a troca da cutícula, o desenvolvimento para os estágios de ninfa e adulto, o acasalamento, o ingurgitamento e a queda da fêmea ao solo para a postura. O macho permanece por mais tempo no hospedeiro e copula com outras fêmeas (PEREIRA, 1982; FURLONG, 1993).

A fase de vida livre é influenciada por variáveis climáticas, alterando a duração de seus períodos. No período seco, entre os meses de abril a setembro, a umidade relativa do ar e as temperaturas mais baixas prejudicam o desenvolvimento desta fase, fazendo com que o ciclo se alongue (FURLONG, 1993). Diversos estudos relataram esta influência,

demonstrando que na região sudeste os carrapatos se desenvolveram por todo ano, tendo seu ciclo de vida mais curto no período chuvoso, de setembro a março, com médias de infestações variáveis ao longo das estações do ano, fortemente influenciados pelas diferentes temperaturas, umidade relativa e índice pluviométrico. (MORENO, 1984; GUARAGNA et al., 1988; MAGALHÃES, 1989; OLIVEIRA et al. 1989; SILVA et al., 2010). Dessa forma, como sugere Furlong e Massard (1994) são necessárias estratégias de controle diferenciadas para o Brasil, de acordo com as variáveis climáticas de cada região.

O parasitismo causa desconforto aos animais, com perda de sangue devido ao hematofagismo, causando anemia, imunossupressão, redução da ingestão de alimentos (JONSSON, 2006) e influenciando o ganho de peso, estado nutricional, crescimento e a produção do gado bovino (HORN, 1983). A lesão causada na pele dos animais pode favorecer o aparecimento de infecções secundárias como miíases cutâneas, com consequentes prejuízos na produção de couro (GONZÁLES; SERRA-FREIRE, 1992).

Este artrópode é responsável também pela transmissão de microrganismos presentes na saliva, inoculados durante o repasto sanguíneo, entre eles os agentes do complexo da tristeza parasitária, com elevado grau de morbidade e mortalidade (ALMEIDA et al., 2006), gerando gastos com controle e profilaxia deste ectoparasito (GONÇALVES, 2000; GRISI et al., 2002; BARROS et al., 2005). Além disso, acarreta ao produtor consequentes prejuízos relacionados à mão-de-obra, despesas com instalações, aquisição de carrapaticidas e equipamentos (PENNA, 1990).

O Brasil apresenta o maior rebanho de gado bovino comercial do mundo, com aproximadamente 185 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2009). Segundo estimativas realizada no país, a produtividade do setor é reduzida pelo parasitismo por *R. microplus*, que é responsável por prejuízos anuais de mais de dois bilhões de dólares (GRISI et al., 2002), não existindo atualmente no país um programa oficial de controle em vigor, ficando a cargo dos produtores os critérios e estratégias de controle.

Os métodos convencionais de controle de carrapatos são baseados principalmente no uso de acaricidas químicos, apesar de seus altos custos (NOLAN et al., 1985), sendo compostos principalmente por organofosforados, amidinas, piretróides, avermectinas, reguladores do crescimento e inibidores de muda. A utilização inadequada destes produtos tem levado ao desenvolvimento de linhagens resistentes de carrapatos frente a diversas gerações de acaricidas, ao aparecimento de resíduos químicos nos produtos de origem animal e a poluição ambiental proveniente do uso dos acaricidas no controle do parasito (BULLMAN et al., 1996; MENDES et al., 2007).

Os primeiros registros de resistência de *R. microplus* a compostos químicos no país datam do início da década de 50 (FREIRE, 1953). A resistência do carrapato aos agentes químicos, após seu uso contínuo, é consequência de alterações no sítio de ação destes agentes e do desenvolvimento de mecanismos adaptativos resultantes de mutações em alguns indivíduos da população (LEITE et al., 1995; FURLONG et al., 2004; FREITAS et al., 2005). Furlong e Martins (2000) descreveram o processo como estabelecimento do alelo resistente, onde o uso contínuo do produto, leva ao aumento de indivíduos com a característica de resistência, propagando o alelo resistente por pressão de seleção.

A presença de resíduos químicos na carne e no leite enfatiza a necessidade de novos métodos de controle (KUNZ; KEMP, 1994). Desta forma, o momento atual caracteriza-se pela crise no desenvolvimento de novas moléculas carrapaticidas e pelo desenvolvimento de pesquisas em estratégias de controle alternativo (WILLADSEN et al., 1989; RIDING et al., 1994; LOGULLO et al., 1998; FRAZZON et al., 2000; WILLADSEN, 2006), através da utilização racional dos agentes químicos associados as demais alternativas de controle, levando à manutenção das populações parasitárias abaixo do seu limiar econômico e com mínimo impacto ambiental (FAO, 2003).

Controle biológico utilizando fungos com ação entomopatogênica e acaricida

O termo controle biológico foi empregado pela primeira vez por H.S. Smith em 1919, para designar o uso de inimigos naturais para o controle de insetos praga (WILSON; HUFFAKER, 1976). Atualmente define todas as formas de controle que utilizam métodos biológicos como alternativa à utilização de agentes químicos, abrangendo diversos métodos de combate a organismos considerados nocivos aos sistemas sanitários e agropecuários (MATA, 2007).

Segundo Van Den Bosch et al. (1982) o controle biológico trata-se de um fenômeno dinâmico fortemente influenciado por fatores climáticos, disponibilidade de alimentos, pela competição e de aspectos ligados a densidade populacional. Está dividido em três principais métodos aplicados: uso de inimigos naturais, de substâncias semioquímicas e repelentes/inseticidas naturais (MATA, 2007).

Berti Filho (1990) define como inimigos naturais os predadores, parasitos ou parasitóides, chamados de entomófagos, assim como os microrganismos patogênicos, denominados de entomopatógenos. Esse método consiste em introduzir no ecossistema um inimigo natural da espécie nociva, para manter a densidade populacional dessa espécie em níveis compatíveis com os recursos do meio ambiente (PARRA et al., 2002).

Os semioquímicos são substâncias de características odoríficas que promovem a comunicação intra ou interespecíficas entre os indivíduos, sendo importantes tanto para a ecologia química como para o controle de insetos praga (VILELA; PALLINI, 2002). Um exemplo é a utilização de feromônios sexuais em armadilhas para o monitoramento populacional de insetos praga como *Migdolus fryanus*, besouro da cana-de-açúcar (LEAL et al., 1994) ou para orientação de determinado parasitóide durante o processo de procura da presa/hospedeiro (PARRA et al., 2002).

As plantas são capazes de produzir compostos secundários, que ao serem isolados possuem propriedades repelentes e inseticidas. A utilização de inseticidas botânicos tem se mostrado um eficiente método de controle. Entre eles destaca-se o uso de extratos de *Azadiracta indica*, conhecida como nin, com comprovado efeito inseticida para mais de 400 espécies de insetos em todo mundo (MORDUE; BLACKWELL, 1993; MARTINEZ, 2002).

O controle microbiano, com o uso de microrganismos patogênicos, é outro ramo do controle biológico. Nas últimas décadas houve um grande avanço nesta área, tendo como principal objetivo o estabelecimento do patógeno no agroecossistema, a fim da manutenção da praga a níveis de danos não econômicos (ALVES, 1998).

Os primeiros relatos científicos de microrganismos infectando insetos datam do século XVIII. Réaumur em 1776 relatou a presença do fungo *Cordyceps* sp. infectando larvas de lepidópteros (Lepidoptera-Noctuidae) (MARANHÃO; MARANHÃO, 2009). Um século depois, estudos sobre patologias de insetos e sua aplicação no controle microbiano de insetos praga, foram impulsionados por Agostino Bassi e Ilya Metchnikoff, respectivamente. Bassi em 1835, descobriu que um fungo parasitário, *Beauveria bassiana*, é o agente causal da muscardine branca, moléstia do bicho-da-seda, comprovando a natureza infecciosa de um agente microbiano para um inseto (ALVES, 1998). Metchnikoff em 1879, realizou os primeiros testes para o controle do besouro *Anisoplia austriaca*, através da utilização de conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* (MARANHÃO; MARANHÃO, 2009).

No Brasil, os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem relatados (ALVES, 1992). Os estudos com fungos entomopatogênicos no país começaram em 1923, quando Pestana identificou duas espécies de cigarrinhas infectadas por *M. anisopliae*, que naquela ocasião foi denominado de *Penicillium anisopliae*. Esta espécie também foi utilizada

no primeiro trabalho de pulverização realizado no país, no combate a cigarrinha *Tomaspis liturata* (ALVES; FARIA, 2003).

Entre os vírus, bactérias, nematóides, protozoários e fungos aplicáveis no controle de pragas, os últimos são os mais estudados e amplamente utilizados. Entre as razões estão sua eficiência em infectar e matar os hospedeiros, sua capacidade em agir sobre todos os estágios evolutivos do hospedeiro, sua grande variabilidade genética, permitindo encontrar o isolado mais virulento para o controle de um grande número de pragas e sua relativa segurança ambiental (ALVES, 1998; SAMISH et al., 2004; THOMAS; READ, 2007).

O controle microbiano de artrópodes possui importantes vantagens, como: especificidade e seletividade do patógeno em relação ao artrópode-alvo; alta virulência apresentada por alguns agentes de controle; capacidade de multiplicação e dispersão no ambiente; facilidade de produção do agente patogênico em condições laboratoriais; compatibilidade do entomopatógeno com inseticidas químicos; facilidade de aplicação; segurança em relação à poluição ambiental e à saúde de seres humanos e animais; efeitos secundários, ou seja, além de causar a mortalidade do artrópode, o patógeno tem ação sobre as gerações subsequentes (ALVES, 1998).

Os fungos entomopatogênicos dividem-se em mais de 700 espécies, pertencentes a quase 90 gêneros (FREIMOSER et al., 2003). Destacam-se aproximadamente 25 espécies que são importantes no controle de pragas economicamente preocupantes na agropecuária brasileira (McCOY; TIGANO-MILANI, 1992; ALVES, 1998).

Os gêneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* e *Isaria* estão entre os mais estudados no controle de artrópodes (CHANDLER et al., 2000). Dentre estes, *Metarhizium* e *Beauveria* estão mundialmente distribuídos e são utilizados como modelo experimental para o estudo da patogênese fúngica aos artrópodes (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

O desenvolvimento da doença nos artrópodes está relacionado com a germinação do conídio, penetração através da cutícula por ação mecânico-enzimática (CHARNLEY; ST. LEGER, 1991; WANG et al. 2002) invasão, colonização do corpo do artrópode e produção de micotoxinas que contribuem para a morte do hospedeiro (PINTO et al., 1997; BITTENCOURT et al., 1999a). Este processo de infecção via tegumento, coloca os fungos entomopatogênicos em vantagem, quando comparados a outros patógenos, pois possibilita a infecção do hospedeiro independente da sua atividade alimentar (BITTENCOURT et al., 1995a, b; 1999a; TIAGO; FURLANETO, 2003).

O fato de atuarem nas diversas fases de desenvolvimento dos artrópodes, com unidades infectantes com altas taxas de crescimento, sobrevivência, infecção, colonização e dispersão (ALVES, 1998), contribui para classificá-los como promissores pesticidas biológicos (ST LEGER, et al., 1996). Um número significativo de micoinseticidas e micoacaricidas foi desenvolvido a partir da década de 60. Pelo menos 12 espécies ou subespécies são empregadas como ingredientes ativos de micoinseticidas e micoacaricidas visando o controle de pragas, embora algumas não estejam atualmente disponíveis no mercado. Produtos a base de *B. bassiana* (34,1%), *M. anisopliae* (33,5%), *Isaria fumosorosea* (5,9%) ou *B. brongniartii* (4,1%) são os mais comuns dentre os 170 produtos desenvolvidos em escala global (FARIA; WRAIGHT, 2007), apresentando porém, baixa participação no mercado mundial, 1% do volume de defensivos agrícolas, em relação aos inseticidas e acaricidas químicos que correspondem a 30% (ALMEIDA; BATISTA FILHO, 2001).

Segundo Alves (1998), o sinergismo entre produtos químicos e biológicos pode aumentar a eficácia do tratamento de artrópodes resistentes ou menos susceptíveis aos agentes químicos. Algumas pesquisas têm concentrado seus estudos na compatibilidade entre as bases químicas e os entomopatógenos, visando aumentar a eficiência de ambos (MOINO; ALVES, 1998). Bahiense e Bittencourt (2004) e Bahiense et al. (2006) em estudos sobre a

compatibilidade dos fungos *M. anisopliae* s.l. ou *B. bassiana* com a deutametrina no controle de larvas de *R. micropus* resistentes a piretróides, concluíram que a associação entre estes agentes, biológico e químico, pode ser usada como ferramenta para o controle integrado deste carrapato, comprovando o sinergismo e a compatibilidade entre estes métodos de controle.

Os fungos entomopatogênicos sofrem intensa ação de fatores bióticos e abióticos, influenciando sua sobrevivência, distribuição e a sua habilidade de causar doenças (INGLIS et al., 2001). Os estudos com formulações utilizadas a campo devem considerar fatores abióticos, como temperatura, umidade relativa e radiação UV, pois estes podem alterar o crescimento vegetativo, a produção de conídios e sua germinação, interferindo na sua capacidade invasiva no artrópode e conseqüentemente na sua virulência (ROBERTS; YENDOL, 1971; THOMAS; JENKINS, 1997; GOETTEL et al., 2000).

A temperatura pode afetar a germinação e o crescimento, bem como a viabilidade de um fungo, tanto em condições de laboratório quanto a campo, alterando seu metabolismo, os processos de produção de toxinas e enzimas, a germinação de conídios, o desenvolvimento do tubo germinativo, sua penetração, colonização e reprodução (ALVES, 1998).

Temperaturas elevadas podem promover a inativação de fungos entomopatogênicos antes do contato com o hospedeiro, além de reduzir ou acelerar seu crescimento no interior do mesmo. Já as baixas temperaturas, podem reduzir ou inviabilizar a germinação e o crescimento fúngico, desta forma, prejudicando ou prolongando a infecção (ZIMMERMANN, 2007a).

Metarhizium anisopliae é um fungo mesofílico com uma faixa de temperatura em geral entre 15 e 35°C, e ótima para a germinação e o crescimento entre 25 e 30°C (EKESI et al., 1999; MILNER et al., 2003). Yip et al. (1992) demonstraram que a temperatura de germinação e crescimento varia entre diferentes isolados de *M. anisopliae* s.l., pois isolados que apresentaram crescimento a 5 °C não cresceram a 37 °C e aqueles que cresceram a 37 °C não cresceram a baixas temperaturas. Além de outros isolados que somente apresentaram crescimento a temperatura mais branda de 25°C.

A temperatura de 25°C foi considerada ótima para a germinação e crescimento micelial de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* (DIMBI et al., 2004; DEVI et al., 2005), embora tenham sido observados isolados com atividade no frio e tolerância ao calor (DIMBI et al., 2004). Variações de temperatura acima ou abaixo do ótimo podem alterar a patogenicidade dos fungos entomopatogênicos (ROBERTS; CAMPBELL, 1977).

Fernandes et al. (2010) avaliaram a tolerância ao calor ($45 \pm 0,2^\circ\text{C}$) e a atividade ao frio (5°C) de diferentes espécies e isolados de *Metarhizium*, observando que após oito horas de exposição a elevadas temperaturas, os isolados de *M. anisopliae* s.l. e de *Metarhizium* do complexo *flavoviride* apresentaram germinação conidial relativa (GR) igual a zero. Já os isolados de *M. acridum* demonstraram alta tolerância a temperatura testada. Após 15 dias de exposição à baixa temperatura, as GRs dos isolados de *M. anisopliae* s.l. e *M. acridum* foram igual a zero, porém os isolados de *Metarhizium* do complexo *flavoviride* apresentaram alta atividade ao frio.

Segundo De Croos e Bidochka (2001) geralmente não há relação entre taxa de crescimento do fungo e latitude, porém estes afirmam em seu estudo que todos os isolados de *M. anisopliae* s.l. que apresentaram atividade ao frio eram originários de altas latitudes e que nenhum isolado de origem inferior a latitude de 43.58 apresentou tal atividade.

Fernandes et al. (2008) observaram variabilidade na tolerância ao calor e atividade ao frio de diferentes isolados de *Beauveria* spp. e na atividade ao frio de isolados de *M. anisopliae* s.l.. A maioria dos isolados de *B. bassiana* germinaram bem a temperatura de 5 °C, ao contrário dos isolados de *M. anisopliae* s.l., com apenas um apresentando atividade ao frio. Os isolados de *B. bassiana* oriundos de latitudes mais elevadas foram mais ativos ao frio

quando comparados aos isolados de regiões próximas a linha do Equador, porém não houve correlação semelhante para tolerância ao calor.

Rath et al. (1995) demonstraram que os esporos do isolado DAT F-001 de *M. anisopliae* s.l. foram capazes de crescer em variações de temperatura entre 2-25°C. Mas, existem isolados de *M. anisopliaei* s.l., em grande parte de regiões tropicais, que são capazes de crescer em temperaturas acima de 35°C (ZIMMERMANN, 2007b). Ouedraogo et al. (1997) relataram que dos 22 isolados de *M. anisopliae* e 14 de *M. flavoviride* estudados, a maior parte cresceu em temperaturas entre 11-32°C, podendo chegar a 37°C, porém nenhum isolado apresentou crescimento a 40°C.

A umidade é outro fator ambiental muito importante, que afeta a eficácia e a sobrevivência dos fungos entomopatogênicos, que geralmente necessitam de alta umidade relativa (UR), entre 80-90%, para a germinação de seus conídios. A germinação dos conídios sobre a cutícula do carrapato e a exteriorização do fungo após a morte do artrópode exigem alta umidade, porém alta ou baixa umidade associada a elevadas temperaturas pode causar a inviabilidade dos conídios (ZIMMERMANN, 2007a).

Isolados de *Metarhizium* sp. necessitam de alta UR para germinar, sendo o melhor percentual de germinação dos conídios observado a 100% de UR (WALSTAD et al., 1970). Entretanto, Ribeiro et al. (1992) observaram viabilidade de conídios de *M. anisopliae* s.l. em folhas de cana-de-açúcar por 14 dias a 28,3°C e 65% de umidade. Bateman et al. (1993), em estudos a campo, obtiveram sucesso na infecção de gafanhotos do deserto, usando formulações oleosas de *M. flavoviride*, com taxas de UR entre 20-30%.

Guerra et al. (2009) ao avaliarem a persistência de *Metarhizium* spp. no solo sob diferentes condições de temperatura e umidade, observaram que *M. anisopliae* s.l. apresentou maior recuperação ao tratamento de 28°C e 75% de umidade aos 30 dias e persistiu viável no solo durante os 120 dias do experimento.

Ment et al. (2010) relataram a influência da temperatura e umidade relativa na formação de clamidosporos do fungo *M. anisopliae* em ovos de carrapato, observando que o fungo emergiu dos ovos, formando conidióforos e conídios sob umidades relativas elevadas, 100%, e temperatura moderada de 25°C. Mas, em temperaturas mais elevadas, 30°C, e umidades relativas entre 55-75% a formação de clamidosporos ocorreu no interior dos ovos, não havendo conidiogênese. Quando as condições ideais, 25°C e 100% UR, foram retomadas, a conidiogênese ocorreu de forma normal.

A radiação solar pela emissão de raios ultravioleta (UV) é descrita como o principal fator limitante para a eficiência do fungo no campo (BRAGA et al., 2001a, b; CAGAN; SVERCEL, 2001), inativando o conídio, promovendo danos e mutações ao DNA (NICHOLSON et al., 2000).

Existem muitos estudos sobre a suscetibilidade de conídios de *Metarhizium* spp. à incidência de radiação UV artificial e natural, com ou sem protetor solar. Todos os resultados demonstraram que a radiação UV-B (280 a 320 nm) e UV-A (320 a 400 nm) são os componentes mais nocivos da luz solar, causando inativação dos conídios em poucas horas de exposição (ALVES et al., 1998; SHAH et al., 1998; BRAGA et al., 2001a,b; RANGEL et al., 2004).

Braga et al. (2001a) relataram que a exposição à radiação UV por uma hora, causou um atraso de várias horas na germinação de conídios de *M. anisopliae* s.l. sobreviventes. Embora ao início da germinação tenha se observado aumento a tolerância a radiação UV, esta foi decrescendo quando a exposição atingiu a sexta hora de exposição. Em um segundo estudo, Braga et al. (2001b) demonstraram que os isolados ARSEF 324 e ARSEF 23, quando expostos por um período de quatro horas a radiação solar natural, tiveram redução de sua capacidade de desenvolvimento de 30% e 100%, respectivamente. Sob condições artificiais,

quando estes mesmos isolados foram expostos por quatro horas a radiação UV-A, seu desenvolvimento foi reduzido em 10% e 40%, respectivamente.

Fernandes et al. (2007) executando testes com isolados de *B. bassiana* observaram que 2 h de irradiação UV-B permitiram a separação de isolados com baixa, média ou alta tolerância, também constatando que os conídios de *B. bassiana* expostos à radiação UV-B demonstraram atraso na sua germinação, características relevantes para seleção de isolados com maior potencial de eficácia para atuarem em estudos de controle de artrópodes em condições de campo.

Metarhizium anisopliae

Metarhizium anisopliae (Hypocreales: Clavicipitaceae) é um fungo filamentosos, encontrado no solo, na rizosfera de plantas ou em cadáveres de artrópodes (ZIMMERMANN, 2007b; SCHARANK; VAINSTEIN, 2010). Foi descrito pela primeira vez na Rússia em 1879 por Metschnikoff, classificando-o primeiramente como *Entomophora anisopliae*. Em 1883, Sorokin descreve o fungo como *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (TULLOCH, 1976), denominando a infecção de muscardine verde, pois ao final da conidiogênese os cadáveres apresentavam tons de verde, que variavam de claro a escuro, acinzentado e as vezes esbranquiçado (WANG, et al., 2002; ZIMMERMANN, 2007b). Em 1976, Tulloch revisou a taxonomia do gênero baseado nas suas características morfológicas, porém anteriormente a revisão, 13 espécies e duas variedades já haviam sido propostas para o gênero. A autora rejeitou as descrições anteriores e reconhece apenas duas espécies do gênero em seu trabalho, *M. anisopliae* e *M. flavoviride*, incluindo as variedades *M. anisopliae* var *anisopliae* e *M. anisopliae* var *major*.

Rombach et al. (1986, 1987) promoveram nova revisão, também baseada nas características morfológicas, restaurando a espécie *M. album*, considerando-a diferente de *M. anisopliae*, promove nova nomenclatura para *M. anisopliae* var *major*, agora denominada de variedade *majus* e também incluíram as espécies *M. brunneum*, *M. flavoviride* var *flavoviride* e *M. flavoviride* var *minus*. Guo et al. (1986) baseando-se nas características morfológicas e de coloração das colônias, descreveram as espécies *M. cylindrospora* e *M. pingshaense*.

Liang et al. (1991) descrevem a forma teleomorfa do gênero, tido por muito tempo como assexuado, relacionando *Cordyceps taii* como teleomorfo de *M. taii*, anteriormente descrito como *M. anisopliae* var *anisopliae*. Tais descobertas foram confirmadas por estudos moleculares filogenéticos (LIU et al., 2002; HUANG et al., 2005). Posteriormente, *C. brittlebankisoides* foi descrito (LIU, et al., 2001) e identificado como teleomorfo de *M. anisopliae* var *majus* (LIU et al., 2002).

Yip et al. (1992) ao estudarem o tamanho de conídios, a sua capacidade de germinação a baixas temperaturas (5°C) e a patogenicidade para larvas de besouros observaram que embora todos os isolados de *M. anisopliae* var *anisopliae* fossem morfológicamente semelhantes, apenas alguns possuíam atividade ao frio. Rath et al. (1995) associaram estes resultados a dados de padrões de carboidratos, e também identificaram isolados particulares com atividade ao frio, denominando-os de *M. anisopliae* var *frigidum*.

De acordo com a revisão taxonômica, baseada no sequenciamento da região ITS do rDNA, proposta por Driver et al. (2000) foram reconhecidos dez clades ou linhagens distintas, divididas em três espécies, *M. album*, *M. anisopliae* e *M. flavoviride*, representando nove variedades, *M. flavoviride* tipo E, *M. flavoviride* var *flavoviride*, *M. flavoviride* var *minus*, *M. flavoviride* var *novazealandicum*, *M. flavoviride* var *pemphigum*, *M. anisopliae* var *anisopliae*, *M. anisopliae* var *majus*, *M. anisopliae* var *acridum* e *M. anisopliae* var *lepidiotum*.

Sung et al. (2007), através de estudos filogenéticos, transferiram a nomenclatura da forma sexuada do gênero *Metarhizium* de *Cordyceps* para *Metacordyceps*. Porém Bischoff et al. (2009) concluíram que *M. taii* é sinonímia de *M. guizhouense*, que passa a ser a fase anamorfa de *Metacordyceps taii*.

Bischoff et al. (2009) empregando uma abordagem filogenética multigênica, avaliaram as relações filogenéticas dentro do que classificaram como complexo *Metarhizium anisopliae*. Segundo os autores as evidências filogenéticas e morfológicas afirmam o caráter monofilético dos nove táxons terminais do complexo *M. anisopliae*. Logo, reconhecendo como espécies *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. majus* e *M. brunneum*, descrevendo também duas novas espécies, *M. globosum* e *M. robertsii*. Desta forma, a espécie ainda não reclassificada de acordo com a metodologia de Bischoff et al. (2009), deve ser considerada pertencentes ao complexo *M. anisopliae* e referenciada como *M. anisopliae* sensu lato (s.l.).

Metarhizium anisopliae s.l. geralmente apresenta micélio hialino e septado, com conidióforos característicos sob os quais surgem conídios normalmente uninucleados e cilíndricos. Apresenta fiálides cilíndricas, sustentando cadeias de conídios de coloração normalmente verde (DRIVER; MILNER, 1998). Segundo Bischoff et al. (2009), a coloração da colônia dos isolados do complexo *M. anisopliae* é inicialmente branca e normalmente fica amarela durante as fases iniciais de desenvolvimento dos conídios, tornando-se verde quando o conídio encontra-se maduro. Sendo a coloração dessas colônias descrita como olivácea ou ligeira variação de oliva.

St Leger et al. (1996) descreveram o processo de infecção do hospedeiro como uma importante etapa na patogenicidade do fungo. Esse processo é dependente de uma sucessão de eventos mecânicos e bioquímicos, que se iniciam pela deposição do conídio sobre a cutícula do hospedeiro, seguida da germinação do conídio, penetração através da cutícula por ação mecânico-enzimática, invasão, colonização e produção de micotoxinas, com exteriorização das estruturas fúngicas e produção de conídios sobre o corpo do hospedeiro.

No Brasil, Bittencourt et al. (1995a, b; 1999a) em estudos sobre o mecanismo de infecção de *M. anisopliae* s.l. no carrapato *R. microplus* verificaram a infecção do carrapato pelo entomopatógeno através da cutícula, indicando que as outras vias de penetração (oral e espiráculos respiratórios) não ocorrem em *R. microplus*.

De forma detalhada, o processo de infecção pode ser dividido em fases que se iniciam pela adesão, onde os conídios encontram-se envolvidos por muco rico em aminopeptidases, criando condições favoráveis para a ação de enzimas extracelulares; germinação, que ocorre em condições apropriadas de umidade, temperatura, pH e nutrição; formação do apressório, extremidade dilatada da hifa com elevada atividade enzimática, que permite a penetração pela cutícula; penetração na pró-cutícula, através de processo físico, caracterizado pela pressão da hifa terminal rompendo as áreas membranosas e esclerosadas, e de processo químico, que ocorre pela ação de enzimas, como proteases, lipases e quitinases que atuam sinergicamente para penetração na cutícula do hospedeiro que é convertida em nutrientes, (ROBERTS et al., 1992) chegando na hemolinfa (WANG, et al., 2002), onde há síntese de células ricas em nutrientes, importantes na manutenção da viabilidade do fungo no corpo do hospedeiro por período prolongado, até a produção de conídios na sua superfície, que podem se disseminar infectando outros indivíduos ou permanecerem no solo (ALVES, 1998). Após a penetração inicia-se o processo de colonização, com a proliferação das hifas nas cavidades do corpo e liberação de toxinas, destruxinas, citocalasinas e suainsoninas, que desempenham importante papel na patogenicidade do fungo, apresentando atividade inseticida, acaricida e fungicida (CHEN et al., 1999, ZIMMERMAN, 2007b).

É um fungo de cultivo simples, necessitando quase que exclusivamente de uma fonte nutricional à base de amido. É cosmopolita, sendo descrito desde o ártico aos trópicos, isolado

a partir do solo, assim como de artrópodes (DOMSCH et al., 1980, ZIMMERMAN, 2007b; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010) e sem dúvida é um dos fungos mais estudados em programas de manejo de pragas, uma vez que apresenta grande potencial entomopatogênico (ONOFRE et al., 2001).

Segundo Goettel et al. (1990) a gama de hospedeiros de *M. anisopliae* s.l. abrange os Symphyla, Orthoptera, Dermaptera, Isoptera, Homoptera, Heteroptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Siphonaptera, Lepidoptera, Acari, Ephemeroptera, Dermaptera e Heteroptera. Polar et al. (2008) relata que *M. anisopliae* s.l. apresenta mais de 200 espécies de hospedeiros, incluindo insetos e ácaros pertencentes a diversos gêneros. Também descreveram sua eficiência sobre diversas espécies de carrapatos, entre eles, *Amblyoma americanum*, *A. maculatum*, *A. cajennense*, *A. variegatum*, *Rhipicephalus annulatus*, *R. microplus*, *R. appendiculatus*, *R. sanguineus*, *Hyalomma excavatum* e *Ixodes scapularis*.

Metarhizium anisopliae s.l. foi o primeiro agente a ser reconhecido como potencial candidato ao controle biológico de pragas agrícolas. Entre as principais pesquisas de controle de pragas envolvendo este fungo entomopatogênico no país, destacam-se o controle da cigarrinha-da-pastagem (*Deois flavopicta*, *Zulia entreriana*), cigarrinha-da-cana (*Mahanarva posticata*, *M. fimbriolata*), cupim-das-pastagens (*Cornitermes cumulans*), cupim da cana-de-açúcar (Gênero *Heterotermes*), broca-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus*), broca-dos-citros (*Diploschema rotundicolle*), broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) e do percevejo-do-colmo do arroz (*Tibraca limbativentris*) (ALVES, 1998). Atualmente, é um dos mais importantes fungos entomopatogênicos pesquisados ou com utilização efetiva contra muitos artrópodes pragas, sendo sua eficácia comprovada entre diversas pragas-alvo como cupins, gafanhotos, grilos, baratas, cigarrinhas e outros hemípteros, noctuídeos, várias espécies de besouros, bem como mosquitos e carrapatos (FRAZZON et al, 2000; ZIMMERMANN, 2007b).

No Brasil, já foram encontrados isolados de *M. anisopliae* s.l. infectando naturalmente fêmeas de *R. microplus* (COSTA et al., 2002).

Seus efeitos no controle biológico de carrapatos foram relatados em experimentos “in vitro” em testes de estábulo, com fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas do carrapato, observando-se elevada mortalidade, ocorrendo o desenvolvimento do fungo na hemolinfa do carrapato e alterações nos períodos de postura, índice de produção de ovos, período de incubação, período e percentual de eclosão de ovos (BITTENCOURT et al., 1992; BITTENCOURT et al., 1994a, b, 1995a, b; BAHIENSE, 2007; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008).

Monteiro et al. (1998) relataram em seus estudos sobre a patogenicidade de diferentes isolados de *M. anisopliae* s.l. para *R. microplus*, em condições de laboratório, a redução da oviposição e a elevada mortalidade de fêmeas do carrapato infectadas pelo fungo.

Correia et al. (1998) em estudos sobre os efeitos de diferentes concentrações do isolado E9 de *M. anisopliae* s.l. sobre *R. microplus* de bovinos estabulados, observaram infecção de 97,7% das fêmeas coletadas um dia após o tratamento, constatando que o fungo apresentou potencial para o controle biológico de *R. microplus*, sendo aconselhável sua utilização em métodos de controle do carrapato.

Frazzon et al. (2000) analisaram os efeitos *in vitro* de 12 isolados de *M. anisopliae* s.l. em fêmeas ingurgitadas *R. microplus* e constataram que o isolado mais patogênico (E6S1) causou mortalidade de 100%, na concentração de 10^7 conídios/mL, 14 dias após o tratamento. Samish et al. (2001), estudaram a patogenicidade de quatro espécies de fungos entomopatogênicos, *Beauveria bassiana*, *M. anisopliae* s.l., *M. flavoviride* s.l. e *Isaria fumosorosea* para larvas, ninfas e fêmeas não alimentadas e ingurgitadas de *R. sanguineus*. Verificaram que larvas e ninfas não alimentadas foram mais sensíveis à infecção fúngica do que as ingurgitadas, porém, as fêmeas não alimentadas foram mais resistentes do que as ingurgitadas.

Bittencourt et al. (2003) ao avaliarem a ação “in vivo” de *M. anisopliae* s.l. aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *R. microplus*, observaram que o isolado estudado apresentou efeito deletério sobre as larvas nas condições de pastagem avaliadas. Relatando que apesar desta eficácia ter apresentado baixa ação controladora sobre o carrapato quando pulverizado no campo, o fungo *M. anisopliae* s.l. poderá, em breve, ser utilizado em programas estratégicos de controle deste ectoparasita.

Angel-Sahagún et al. (2005) demonstraram a eficácia “in vitro” do fungo *M. anisopliae* s.l. no controle de adultos, ovos, pupas e larvas da mosca *Haematobia irritans*. Mohanty et al. (2008) relataram alta eficácia, “in vitro”, do isolado 892 de *M. anisopliae* s.l. sobre os estágios larvais dos mosquitos *Anopheles stephes* e *Culex quinquefasciatus*.

A utilização de *M. anisopliae* s.l. tem se mostrado eficaz no controle de mosquitos (Culicidae) vetores de malária. Estudos recentes estimam que aplicações deste entomopatógeno são capazes de reduzir a intensidade da transmissão de malária em 75% (SCHOLTE et al., 2005; KANZOK; JACOBS-LORENA, 2006). Segundo Fang et al. (2011) *M. anisopliae* s.l. infecta os mosquitos através da cutícula, proliferando-se pela hemolinfa. Através de modificações genéticas induzidas, este fungo é capaz de produzir os peptídeos escorpina e SM1. A escorpina é uma potente toxina antimicrobiana, enquanto o SM1 inibe a entrada dos protozoários nas glândulas salivares dos mosquitos. A produção concomitante destes dois peptídeos promove a redução da contagem de esporozoítos em 98%, reduzindo, desta forma a reprodução de *Plasmodium* s.p. praticamente a sua totalidade. Sugerindo que a inibição do desenvolvimento de *Plasmodium* s.p. mediada por *Metarhizium* sp. pode ser uma poderosa arma no combate a malária. Além disso, estudos relataram que a escorpina inibe o vírus da dengue, transmitido por *Aedes aegypti*, também suscetível a infecção por *M. anisopliae* s.l., confirmando o grande potencial deste fungo como biopesticida com ação sobre diversos artrópodes (FANG et al., 2011).

Lubeck et al. (2008) estudaram o potencial de diferentes isolados de *M. anisopliae* s.l. para o controle biológico do carrapato *R. microplus* e da praga do algodão, *Dysdercus peruvianus*. Seis isolados de *M. anisopliae* s.l. foram patogênicos às fêmeas ingurgitadas do carrapato. Os isolados E6, GC47 e CG97 foram os mais virulentos para ambos os modelos de artrópodes. A taxa de mortalidade dos carrapatos infectados pelo fungo foi de 9-10% no quarto dia pós-infecção e os isolados mais virulentos para *D. peruvianus* causaram mortalidade de 50% do terceiro ao quarto dia pós-infecção.

Segundo Faria e Wraight (2007) dentre as centenas de micopesticidas destinadas ao controle de artrópodes, 33,9% são à base de *M. anisopliae* s.l. Além disso, pode ser considerado um produto seguro, com riscos mínimos a vertebrados, humanos e ao meio ambiente (ZIMMERMANN, 2007b).

Variabilidade genética de *Metarhizium anisopliae* s.l.

Metarhizium anisopliae s.l. é um fungo cosmopolita, isolado a partir de uma variedade de habitats, localizações geográficas e hospedeiros, embora, alguns isolados possuam considerável especialização em relação ao hospedeiro. Diferenças na patogenicidade, aliadas a estas características indicam que naturalmente ocorre variação genética (ST. LEGER et al., 1992). Levando em consideração esta variabilidade natural, diversos estudos vêm sendo realizados com a finalidade de investigar variações genéticas entre os isolados e suas características de distribuição, persistência e a capacidade de realizar permuta gênica dentro de uma população ou com outras, favorecendo o monitoramento de um isolado introduzido no ambiente com finalidade de controle (ST. LEGER, 1992; BIDOCHKA et al., 1994; TIGANO-MILANE et al., 1995; BIDOCHKA et al., 2001; ENKERLI et al., 2005; WANG et al., 2005;

INGLIS et al., 2008; FERNANDES et al., 2010; TANGTHIRASUNUM et al., 2010; FREED et al., 2011).

Segundo Yip et al. (1992) para o registro e patente dos micopesticidas comerciais é necessária a identificação precisa dos isolados de *Metarhizium* spp., garantindo a liberação de fungos entomopatogênicos no ambiente de forma segura e de fácil monitoramento (FEGAN et al., 1993; DESTÉFANO et al., 2004). Assim sendo, outros métodos devem ser empregados a fim de se complementar os critérios morfológicos e bioquímicos, pois esses apresentam limitado potencial na distinção entre espécies de *Metarhizium*, fato evidenciado quando ferramentas moleculares são empregadas para avaliar a variabilidade genética inter e intraespecífica (DRIVER et al., 2000). Desta forma, a aplicação de técnicas moleculares na micologia emitiu uma nova luz sobre a sistemática, bioquímica e ecologia de fungos entomopatogênicos (ENTZ et al., 2005).

Até o início da década de 80, antes do advento da descoberta da tecnologia biomolecular, os processos de identificação de microrganismos baseavam-se em análises de características morfológicas, como a morfologia do conídio e da colônia, avaliação da patogenicidade e virulência, da resistência a drogas, requerimentos nutricionais, entre outras (ST LEGER et al., 1992). Porém a variação de características morfológicas é fortemente influenciada por fatores ambientais, o que pode comprometer a eficiência da identificação. A utilização de técnicas bioquímicas e moleculares possibilitou o aumento do conhecimento da variabilidade inter e intra-específica dos microrganismos. Todos os métodos apresentam vantagens e limitações, sendo a escolha dependente dos objetivos, das circunstâncias de trabalho e do custo da técnica (SOSA-GÓMEZ et al., 1998).

As técnicas de diagnóstico molecular foram inicialmente utilizadas na taxonomia de microrganismos e tiveram como objetivo revelar a variabilidade ao nível de DNA e consequentemente detectar diferenças entre indivíduos (MARQUES et al., 2002). Nas últimas décadas, vários estudos vêm empregando diferentes técnicas, como análise de isoenzimas, polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), DNA polimórfico amplificado randomicamente (RAPD), polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado (AFLP), marcadores microssatélites, sequências de DNA ribossomal-rDNA e sequências de DNA mitocondrial-mtDNA. Estes métodos foram desenvolvidos e têm sido utilizados com a finalidade de se estabelecer a variabilidade e diversidade genética, além de esclarecer conflitos de identificação e classificação (ST LEGER et al., 1992; BRIDGE et al., 1993; FEGAN et al., 1993; LEAL et al., 1994; PIPE et al., 1995; LEAL et al., 1997; MAVRIDOU; TYPAS, 1998; DRIVER et al., 2000; PANTOU et al., 2003; HUGHES et al., 2004; VELÁSQUEZ et al., 2007; INGLIS et al., 2008; YANAKA-SCHAFFER et al., 2008; BISCHOFF et al., 2009, FERNANDES et al., 2010; TANGTHIRASUNUN et al., 2010; FREED et al., 2011).

A técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) caracteriza-se pela síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA através da enzima DNA polimerase. A PCR baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos sintéticos (“primers”) que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo na amplificação (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Métodos tradicionais de análise de marcadores moleculares foram acelerados pelo uso de derivações desta técnica. Pesquisas científicas que utilizam esta técnica ou técnicas dela derivadas têm permitido avanços significativos na identificação de genótipos, diagnóstico de doenças, estudos filogenéticos e melhoramento genético.

A técnica de RAPD é uma variação da PCR que envolve a amplificação simultânea de vários “loci” anônimos no genoma utilizando iniciadores de sequência arbitrária. Desta forma, baseia-se na utilização de apenas um único oligonucleotídeo iniciador, de sequências mais curtas e arbitrárias para dirigir a reação de amplificação. Assim, uma sequência arbitrária de

nucleotídeos pode amplificar a sequência de DNA genômico sem a necessidade de prévio conhecimento da sequência de bases do DNA alvo (BAUMANN et al., 2003), sendo essa a mais importante de suas vantagens.

Esta técnica tem sido utilizada por muitos autores para identificação de espécies e isolados de fungos entomopatogênicos e análise da variabilidade genética (COBB; CLARKSON, 1993; FEGAN et al, 1993; BIDOCHKA et al, 1994; LEAL et al, 1994; TIGANO-MILANI et al, 1995; DRIVER et al., 2000; FREIRE et al., 2001), entretanto, mostra desvantagem em alguns aspectos por ser de repetibilidade baixa e pouco consistente de um laboratório para o outro, o que dificulta a comparação de dados obtidos em diferentes locais e também ao que se refere a sua alta susceptibilidade a contaminação por DNA não alvo, só podendo ser realizada de modo seguro com DNA de culturas puras (LEAL et al., 1997; THOMSEN; JENSEN, 2002).

Tigano-Milani et al. (1995) em seu estudo sobre variabilidade genética entre isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. relataram elevada similaridade (>86,7%) entre isolados originários da mesma espécie hospedeira, *Deois* sp. Afirmando que isolados genotipicamente semelhantes estão mais relacionados a espécie hospedeira do que com a região geográfica. Seus resultados também demonstraram que o solo constitui uma grande fonte de variabilidade genética.

Leal et al. (1994) fizeram a caracterização de 20 isolados do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* s.l., provenientes de quatro países, através da técnica de RAPD-PCR, relatando que foram observados distintos perfis de polimorfismo na maioria dos isolados. Maiores similaridades foram observadas entre isolados de mesmo país do que de países diferentes. Freire et al. (2001) através da técnica de RAPD, estudaram a linhagem selvagem de *M. anisopliae* s.l. e os cinco mutantes por ela originada através de radiação gama, observando diferenças entre a linhagem selvagem e seus mutantes, com um coeficiente médio de similaridade de 75%.

A análise de seqüências por meio de RFLP é uma ferramenta muito utilizada nas análises de DNA. A técnica de RFLP-PCR baseia-se no polimorfismo do comprimento de fragmentos, obtidos pela amplificação da região, seguida da restrição dos fragmentos amplificados por corte da fita dupla de DNA. Tal polimorfismo é evidenciado pela fragmentação do DNA através do uso de enzimas de restrição, com posterior análise eletroforética e observado por hibridização destes fragmentos com seqüências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência. Para que o polimorfismo seja detectado, é necessário que as seqüências de nucleotídeos nas fitas de DNA de dois ou mais indivíduos comparados sejam distintas (MARQUES et al., 2002).

A análise de RFLP do complexo genético do rDNA e do mtDNA foi utilizada como excelente ferramenta para determinação da variabilidade genética de isolados de *M. anisopliae* s.l. (ZIMMERMANN, 2007b). Mavridou e Typas (1998) ao analisarem a variação intraespecífica de 25 isolados de *M. anisopliae* s.l. obtidos de diferentes hospedeiros e regiões geográficas relataram que as duplas digestões com as endonucleases Kpn I e Sac I, conduziram a uma máxima capacidade de diferenciação entre os isolados, produzindo padrões únicos para 16 isolados e subdividindo os demais em quatro grupos de dois a três isolados. Este resultado mostra o potencial da análise de RFLP do mtDNA como excelente ferramenta para a determinação do polimorfismo genético entre isolados de *M. anisopliae* s.l..

Leal et al. (1997) avaliaram 40 isolados de *Metarhizium* spp. através da técnica de RFLP-PCR baseada na amplificação da porção do gene que codifica a protease Pr1, relatando a produção de 15 perfis de restrição distintos, agrupados em quatro diferentes grupos, sendo observadas correlações entre perfis de restrição e origem geográfica em determinados grupos de isolados. Enkerli et al. (2009) utilizaram a técnica de RFLP-PCR

para analisar a eficiência dos genes de quitinase (Chit1, Chi 2 e Chi 4), que estão estritamente ligados ao processo de patogenicidade do fungo ao inseto hospedeiro, como marcadores moleculares na identificação de diferentes isolados de *M. anisopliae* s.l. Um total de 14 genótipos foram detectados entre os 22 isolados de *M. anisopliae* s.l., sendo cinco destes genótipos detectados em vários isolados. Isolados que apresentaram o mesmo genótipo foram originários dos mesmos países. Estas análises provaram elevada capacidade em separar isolados de *M. anisopliae* s.l. e os dados sugerem sua aplicabilidade para as demais espécies de *Metarhizium*.

Embora técnicas como, AFLP ou análises de marcador microssatélite sejam consideradas de alta eficiência de genotipagem, são metodológica e tecnicamente exigentes. Em contraste, a técnica de RFLP-PCR é menos complexa, utilizando equipamentos básicos comumente presentes em laboratórios de diagnóstico molecular (ENKERLI et al., 2007). O sequenciamento, com a posterior comparação das sequências, também vem a ser uma ferramenta alternativa ao RFLP-PCR, desde que se tenha acesso a este tipo de equipamento ou serviço (RAKOTONIRAINY et al., 1994). Embora a eficiência da técnica de RFLP-PCR seja menor do que as análises de sequenciamento, AFLP ou SSR (“Simple Sequence Repeats”) é, na maioria das vezes, suficiente para a caracterização e identificação de isolados de fungos (ENKERLI et al., 2009).

O sequenciamento do DNA ribossomal (rDNA) é amplamente utilizado na identificação e diferenciação de espécies de fungos. As sequências de rDNA estão presentes repetidas vezes no genoma do fungo, apresentando até 200 cópias por genoma haploide, havendo considerável variação entre as espécies. (BRUNS et al., 1991). Uma unidade é formada por três genes rRNA, 18S, 5,8S e 28S, separados por espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2). Cada unidade do rDNA é separada por um espaço intergênico (IGS) (FOULY et al., 1997). Os genes de rDNA, evoluem de forma mais lenta, sendo considerados regiões mais conservadas entre espécies e gêneros. As regiões espaçadoras, ITS e IGS, evoluem mais rapidamente, sendo consideradas menos conservadas, acumulando maior variabilidade na diferenciação de espécies de fungos dentro do mesmo gênero ou entre variedades da mesma espécie (EDEL, 1998; BRIDGE; ARORA, 1998; DRIVE et al., 2000; LIU et al., 2002).

A amplificação e sequenciamento das regiões ITS foram usados com sucesso na taxonomia de *Metarhizium* spp. Driver et al., (2000) através de estudos com 123 isolados de diferentes espécies, promoveram a reavaliação da taxonomia de *Metarhizium* através de padrões de RAPD e análise da sequências das regiões ITS, 5,8S rDNA e da região D3 do gen 28S do rDNA, encontrando um alto nível de diversidade genética.

Fernandes et al. (2010) em seus estudo sobre caracterização de 30 isolados de *Metarhizium*, baseados em análises moleculares (AFLP e sequenciamento da região ITS-rDNA), tolerância ao calor e atividade ao frio, relataram variação genotípica e fenotípica entre os isolados testados, afirmando que os resultados demonstraram que os isolados se agruparam de forma semelhante tanto nas análises de AFLP quanto de sequenciamento da região do rDNA, promovendo a separação entre as diferentes espécies analisadas.

Freed et al. (2011) estudaram isolados de *M. anisopliae* s. l. provenientes do solo de diferentes países (China, Laos, Coreia do Sul, Singapura e Holanda), avaliando a variabilidade genética entre os diferentes isolados de diferentes fontes de solo (urbano, agrícola e florestal) através de marcadores microssatélites e sequenciamento da região ITS-rDNA. Os resultados da sequência do ITS-rDNA confirmaram os resultados obtidos pela análise dos marcadores microssatélites, com mínima variação genética entre os 60 isolados testados, mesmo pertencentes a regiões ecológicas e climáticas distintas.

Bischoff et al. (2009) avaliaram as relações filogenéticas dentro do complexo *M. anisopliae*, identificando linhagens monofiléticas e esclarecendo a taxonomia das espécies. Com esta finalidade foram analisados 57 isolados de diversas espécies de *Metarhizium* através

do emprego de uma abordagem filogenética multigênica, utilizando sequências parciais de regiões de genes codificadores de proteínas (EF-1 α , RPB1, RPB2 e β -tubulina) e também avaliando a morfologia deste táxon. As evidências filogenéticas e em alguns casos, também morfológicas, comprovaram o caráter monofilético dos nove táxons terminais do complexo *M. anisopliae*, reconhecidos como espécies pelos autores. Segundo os autores, as ferramentas moleculares fornecem os melhores resultados na diferenciação de espécies do complexo *M. anisopliae*. Baseados nestes e em resultados anteriores, a região 5' do EF-1 α é atualmente a região mais informativa para identificações de rotina de espécies dentro do gênero (BISCHOFF et al., 2006). Esta região requer apenas dois “primers” e é de fácil amplificação, sendo atualmente o locus mais bem sucedido no diagnóstico de grupos terminais, embora a utilização da região EF-1 α seja insuficiente para total resolução da genealogia do gênero *Metarhizium*. Desta forma, estudos futuros deverão determinar a utilização deste locus singular para o reconhecimento e identificação filogenética de espécies em outros complexos de espécies fúngicas.

Portanto, podemos concluir que as diversas análises podem ser realizadas para a caracterização de isolados fúngicos e que os relatos acima descritos demonstram o alto grau de sensibilidade das técnicas moleculares, permitindo que os fungos entomopatogênicos possam ser liberados no ambiente, com fácil monitoramento e elevada segurança (SOSA-GÓMEZ et al., 1998). Assim, as ferramentas moleculares têm se tornado cada vez mais importantes para identificação e caracterização desses isolados, objetivando garantir a qualidade do produto, o sucesso de sua aplicação, a investigação da persistência das amostras liberadas a campo, a determinação da relação hospedeiro-patógeno ou hospedeiro-habitat relacionadas às estruturas das populações (BIDOCHKA, 2001; MEYLING; EILENBERG, 2007).

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Metarhizium anisopliae* s.l.

RESUMO

O gênero *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) é amplamente utilizado em programas de controle biológico de diversos artrópodes, sendo constatada sua promissora utilização em escala comercial. Ao longo dos anos vem sendo reclassificado taxonomicamente, mas com o surgimento de técnicas biomoleculares, novos estudos foram conduzidos baseados tanto nos caracteres morfológicos quanto moleculares. Recentemente as relações filogenéticas foram reavaliadas e as espécies de *Metarhizium* anteriormente identificadas como *M. anisopliae* foram consideradas como parte do complexo *M. anisopliae*. O objetivo deste estudo foi avaliar a macro e micromorfologia de 30 isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l., originários de diferentes regiões geográficas, hospedeiros ou substratos, para confirmação de sua identificação. Além disso, avaliou-se a quantidade de conídios produzida, para seleção de isolados com maior potencial de produção de conídios em massa. Para descrição das características macroscópicas foram feitos pontos únicos de inoculo em meio de cultura e as características microscópicas foram avaliadas através da técnica de microcultivo entre lâmina e lamínula. A capacidade de produção de conídios foi avaliada em área de 0,589 cm² de cultura. As colônias dos isolados estudados apresentaram características morfológicas compatíveis com as descritas para o gênero na literatura. O tamanho das colônias variou entre 29,66 mm e 51,33 mm de diâmetro entre os isolados. Houve variação no comprimento e na largura de conídios e fiálides num mesmo isolado, assim como a presença de fiálides agrupadas e solitárias. A produção de conídios foi variável, com isolados apresentando elevado potencial, com média superior a 15000 x 10⁴ conídios em 0,589 cm² de cultura, porém tanto o tamanho dos conídios quanto o diâmetro das colônias não influenciaram na produção de conídios, pois isolados com baixo potencial de produção de conídios apresentaram tamanho da colônia semelhante a isolados com alto potencial.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*, morfologia, produção de conídios.

ABSTRACT

Metarhizium Hypocreales: Clavicipitaceae) is widely used in biological control programs of arthropods, evidencing its promising use in commercial scale. Over the years, it has been taxonomically reclassified, but with the development of molecular techniques, new studies were conducted based on morphological and molecular characters. Phylogenetic relationships were recently reviewed and the *Metarhizium* species previously identified as *M. anisopliae* were considered as part of *M. anisopliae* complex. The present study aimed the identification of 30 *M. anisopliae* s.l. isolates from different geographic regions, hosts or substrates, evaluating their macro and micromorphology. Furthermore, the conidial production potential was analyzed to select those with the highest potential. For macroscopic characteristics descriptions, single inoculum points were made in culture medium, the microscopic characteristics were evaluated using a microculture technique and the conidial production ability was evaluated on 0.589 cm² culture area. The colonies showed morphological characteristics that consisted with those described at the literature for the genus. The colonies diameter varied between 29.66 mm and 51.33 mm among the isolates. There was both length and width variation in the conidia and phialides in the same isolate, as well as the presence of grouped and lonely phialides. The conidial production was variable, with some isolates producing more than 15000 x 10⁴ conidia on 0.589 cm² of culture. Both conidial size and colonies diameter did not influence the conidial production once isolates with low conidial production potential showed colony size similar to isolates with high potential.

Key words: *Metarhizium*; morphology; conidial production.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) é amplamente utilizado em programas de controle biológico de diversos artrópodes, sendo constatada sua promissora utilização em escala comercial. Possui distribuição cosmopolita, ocorrendo em diferentes regiões, desde climas temperados até climas tropicais (ZIMMERMANN, 2007b).

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* s.l. foi descrito pela primeira vez por Ilya Mestchnikoff em 1979, como *Entomophthora anisopliae*, isolado de larvas do besouro do grão de trigo *Anisopliae austriaca* (Coleoptera: Scarabaeidae). Posteriormente, em 1883, Sorokin o classificou como *Metarhizium anisopliae*, denominando a infecção como muscardine verde (ALVES, 1998). Em 1976, Tulloch promove uma revisão taxonômica do gênero com base em suas características morfológicas, admitindo apenas duas espécies, *Metarhizium flavoviride* e *Metarhizium anisopliae*, sendo esta última dividida nas variedades *major* e *anisopliae*.

No entanto, com o surgimento de técnicas biomoleculares, novos estudos foram conduzidos baseados tanto nos caracteres morfológicos como moleculares (LIANG et al., 1992; DRIVER et al., 2000; LIU et al., 2002; PANTOU et al., 2003; SUNG et al., 2007). Recentemente Bischoff et al. (2009) avaliaram as relações filogenéticas dentro do que classificaram como complexo *Metarhizium anisopliae*, elevando ao nível de espécie: *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. majus* e *M. brunneum*, descrevendo também duas novas espécies, *M. globosum* e *M. robertsii*.

Metarhizium anisopliae s.l. morfológicamente apresenta micélio hialino e septado, com conidióforos característicos ramificados do tipo fiálides, sobre os quais surgem conídios cilíndricos organizados em colunas. As fiálides cilíndricas são originárias do vértice de hifas e se colocam uma ao lado da outra. Os conídios são geralmente hialinos ou com leve pigmentação verde e não septados (ALVES, 1998). Os isolados pertencentes ao complexo *M. anisopliae* apresentam coloração branca em sua fase inicial, ficando normalmente amarela durante as fases iniciais de desenvolvimento dos conídios e verde quando os conídios encontram-se maduros (BISCHOFF et al., 2009).

O objetivo deste estudo foi avaliar a macro e micromorfologia de 30 isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l., originários de diferentes regiões geográficas, hospedeiros ou substratos, a fim de se confirmar a identificação destes isolados. Além disso, avaliou-se a quantidade de conídios produzida pelos isolados, para seleção de isolados com maior potencial de produção em massa de conídios.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

A caracterização morfológica de 30 isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. foi realizada através da avaliação das características macro e microscópicas das colônias. Para descrição das características macroscópicas foram feitos pontos únicos de inóculo em meio de cultura BDA (Batata, dextrose, ágar), um paquímetro foi utilizado para mensurar o tamanho das colônias. Para avaliação das características microscópicas foi utilizada a técnica

de microcultivo entre lâmina e lamínula (RIDDELL, 1950). Após o cultivo, confeccionaram-se lâminas que foram observadas com auxílio de microscópio óptico com magnitude de 400x.

A capacidade de produção de conídios foi avaliada utilizando-se uma alça de platina 1 com a ponta circular medindo 0,5 cm de diâmetro, cada cultura foi cortada em três pontos aleatórios e foram feitas suspensões de conídios para quantificação em câmara de Neubauer.

2.2 Local

O estudo foi desenvolvido no período de janeiro a dezembro de 2010. A caracterização morfológica dos isolados foi realizada no Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos do Departamento de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no Rio de Janeiro. A avaliação da produção de conídios foi realizada no Laboratório de Controle Microbiano da Estação para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizada no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro.

2.3 Obtenção e manutenção dos isolados

Foram obtidos 30 isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. das coleções de culturas de fungos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e do Instituto Biológico de São Paulo, sendo originários de diferentes regiões geográficas e hospedeiros ou substratos (Tabela 1). Todos os isolados estudados foram preservados em meio de cultura BDA (Himedia) sob óleo mineral, sendo mantidos sob refrigeração e integrando o acervo de fungos entomopatogênicos do Laboratório de Controle Microbiano da UFRRJ.

Tabela 1. Isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. com seus respectivos hospedeiros ou substrato e origens.

Isolado	Hospedeiro/Substrato	Local
CG 32	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Bahia
CG 37	Solo	Tocantins
CG 46	<i>Deois incompleta</i> (Homoptera: Cercopidae)	Espírito Santo
CG 49	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera: Cercopidae)	Planaltina - DF
CG 87	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Flexeiras - AL
CG 112	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera: Cercopidae)	Planaltina - DF
IBCB 116	Solo	Contagem - MG
CG 148	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera: Cercopidae)	Goiânia - GO
CG 153	<i>Deois incompleta</i> (Homoptera: Cercopidae)	Altamira - PA
IBCB 156	Solo	Cascavel - PR
CG 191	Solo	Pelotas - RS
CG 312	Solo	Marilândia do Sul - PR
CG 344	Solo	Mauá - PR
CG 347	Solo	Minaçú - GO
IBCB 353	<i>Mahanarva fimbriolata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Valparaíso - SP
CG 371	Solo	Mauá - PR
IBCB 383	<i>Mahanarva fimbriolata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Água Branca - SP
IBCB 384	<i>Mahanarva fimbriolata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Sertãozinho - SP
IBCB 410	Lepitoptera	Petar-Iporanga - SP
CG 420	Hymenoptera	João Pessoa - PB

Tabela 1. Continuação

Isolado	Hospedeiro/Substrato	Local
IBCB 481	Solo	Campinas - SP
CG 580	<i>Zulia entreariana</i> (Homoptera: Cercopidae)	Araguaura - TO
CG 626	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Rio Largo - AL
CG 627	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Murici - AL
CG 628	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Porto Calvo - AL
CG629	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Marechal Deodoro - AL

CG=isolados provenientes da Coleção de fungos de invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;

IBCCB=isolados provenientes da Coleção de fungos entomopatogênicos do Instituto Biológico.

2.4 Caracterização morfológica

Os isolados de *M. anisopliae* s.l. foram transferidos para placas de Petri (100 × 15 mm, Fisherbrand) contendo meio de cultura BDA (Himedia). Para avaliação do tamanho das colônias, foram feitos pontos únicos de inóculo no centro da placa, com auxílio de alça de platina. As colônias foram mantidas em câmaras climatizadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (escotofase) e umidade relativa $\geq 80\%$ por 14 dias. Após o cultivo, foram feitas as descrições das características macroscópicas através da observação do diâmetro, aspecto, coloração, reverso e verificação da produção de exsudatos das colônias. Um paquímetro (calíper digital Mitutoyo com resolução de 0,01 mm) foi utilizado para mensurar o tamanho das colônias. Os isolados também foram avaliados quanto suas características microscópicas através da técnica de microcultivo entre lâmina e lamínula (RIDDELL, 1950). As placas foram incubadas sob as mesmas condições descritas na fase anterior. Após sete dias de cultivo, foram confeccionadas lâminas coradas com Lactofenol de Amman acrescido de Azul de Algodão (20 g de ácido fênico-Sigma, 20 ml de ácido láctico-Reagen, 40 ml de glicerina-Vetec, 0,05 g de azul de algodão-Merck, 20 ml de água destilada), sendo posteriormente observadas com auxílio de microscópio óptico com magnitude de 400x. A descrição das características microscópicas foi feita pela observação da forma e medida dos conídios e fiálides.

2.5 Avaliação da produção de conídios

Os isolados foram repicados em meio de cultura BDA, pelo método de esgotamento da alça. As colônias foram mantidas em câmaras climatizadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em escotofase e umidade relativa $\geq 80\%$ por 14 dias. Para quantificação da produção de conídios utilizou-se uma alça de platina com a ponta circular medindo 0,5 cm de diâmetro, cada cultura foi cortada em três pontos aleatórios e os fragmentos de ágar e cultura foram transferidos para tubos tipo falcon contendo 1 ml de solução de Tween 80 0,1%. Cada tubo foi agitado em “vortex” por 30 segundos e uma amostra de 10 μL da suspensão foi quantificada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico. Foi observada a capacidade de produção de conídios, em área de 0,589 cm^2 de cultura, entre os diferentes isolados estudados.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização morfológica

As colônias de *M. anisopliae* s.l. estudadas apresentaram características morfológicas compatíveis com as descritas na literatura (TULLOCH, 1976; YIP et al., 1992; DRIVER et al., 2000; BISCHOFF et al., 2009).

O tamanho das colônias variou entre 29,66 mm (CG 578) e 51,33 mm (CG629) de diâmetro, com média de $43,12 \pm 6,40$ mm (Tabela 2). As colônias apresentaram colorações que variaram entre tonalidades de verde oliva, a maioria com aparência lisa, crescimento zonado, aspecto pulverulento e reverso amarelo claro, com conídios concentrados mais ao centro e se dispersando na periferia da colônia que terminava com uma borda de micélio branco de aspecto algodinoso (Figura 1) (CG 32, CG 46, CG 112, IBCB 116, CG 148, IBCB 167, CG 191, CG 344, IBCB 353, IBCB 384, CG 371, IBCB 410, CG 420, IBCB 481, CG 489, CG 578, CG 579, CG 627, CG 628 e CG 629). O isolado IBCB 156 foi o único que apresentou aparência sulcada.

Os isolados CG 87, CG 347, CG 580 e CG 626 apresentaram variação nas características gerais observadas, pois apresentaram o centro da colônia de cor amarela, seguido de um concentrado de conídios de coloração verde oliva que se dispersavam formando uma borda periférica de fundo amarelo, sendo as demais características iguais aos isolados descritos anteriormente.

Algumas colônias apresentaram o centro de coloração amarela e presença de feixe de conidióforos (CG 37 e CG 153). Os isolados CG 49 e CG 312 também apresentaram feixe de conidióforos, porém em maior quantidade e localizados próximos a periferia da colônia, fato que os diferenciou das demais colônias.

Foi observada a produção de exsudatos de coloração hialina em algumas colônias (CG 37, CG 153, CG 49, CG 87, CG 312, CG 344, CG 347, IBCB 383, IBCB 481, CG 578, CG 580 e CG 626).

A análise das características microscópicas evidenciou que todos os isolados apresentaram conídios de aparência lisa, formato cilíndrico e de tamanhos médios entre 6,88 e 8,67 μm x 2,75 e 1,79 μm . As fiálides apresentaram formato cilíndrico e a média de suas medidas variou entre 9,70 e 7,17 μm x 2,15 e 2,93, havendo variação no comprimento e na largura de conídios e fiálides num mesmo isolado. Foi observada em todas as colônias a presença de fiálides agrupadas e solitárias num mesmo isolado, com a predominância da última (Figura 2).

Tabela 2. Diâmetro médio das colônias (mm) e médias das dimensões de conídios e fiálides (μm) de isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. (continua).

Isolados	Diâmetro (mm)	Conídios (μm)	Fiálides (μm)
CG 32	43,32	8,11 (6,14x10,91)x2,54 (1,78x3,39)	8,28 (5,80x9,58)x2,36 (1,71x2,97)
CG 37	50,42	8,67 (6,19x10,68)x2,39 (1,44x3,50)	7,34 (6,76x8,60)x2,33 (1,95x2,66)
CG 46	32,14	7,46 (5,59x8,41)x2,95 (2,06x3,52)	8,52 (6,14x10,91)x2,53 (2,14x3,38)
CG 49	46,16	7,98 (6,04x8,91)x2,45 (2,12x3,53)	8,54 (7,12x12,19)x2,41 (2,02x3,37)
CG 87	48,71	6,88 (6,14x8,75)x2,23 (1,87x3,45)	7,59 (6,42x11,91)x2,21 (2,12x3,45)
CG 112	45,47	8,14 (6,12x8,94)x2,89 (1,98x3,35)	8,91 (6,02x9,91)x2,22 (1,71x3,49)
IBCB 116	50,47	7,31 (5,99x9,38)x2,30 (1,60x3,07)	8,98 (6,17x10,86)x2,63 (1,51x3,25)
CG 148	51,21	7,54 (6,10x9,65)x2,52 (2,01x3,11)	8,59 (6,49x12,20)x2,58 (2,39x3,10)

Tabela 2. Continuação

Isolados	Diâmetro (mm)	Conídios (µm)	Fiálides (µm)
CG 153	49,78	7,69 (5,14x9,61)x2,45 (1,98x3,39)	8,96 (7,14x11,00)x2,58 (2,20x3,33)
IBCB 156	40,77	8,02 (6,45x10,12)x2,63 (1,45x3,21)	8,45 (7,21x9,95)x2,31 (2,21x3,35)
IBCB 167	40,10	6,92 (5,12x8,96)x2,12 (1,42x3,30)	7,94 (7,14x10,89)x2,43 (2,01x3,22)
CG 191	48,53	7,52 (5,84x9,92)x2,52 (1,98x3,42)	8,43 (6,26x10,82)x2,64 (1,54x3,29)
CG 312	42,10	8,03 (6,25x9,43)x2,49 (1,48x3,51)	8,27 (7,15x11,84)x2,42 (2,17x3,85)
CG 344	35,92	6,98 (5,10x7,92)x2,22 (1,13x3,21)	8,52 (6,34x10,49)x2,27 (1,95x3,16)
CG 347	48,28	7,77 (5,88x9,88)x2,56 (1,83x3,53)	9,70 (6,69x10,37)x2,36 (2,21x2,48)
IBCB 353	40,66	6,98 (5,11x8,19)x2,16 (1,88x3,42)	8,56 (6,30x10,11)x2,56 (1,54x3,01)
CG 371	42,37	8,23 (6,51x9,24)x2,47 (2,13x3,79)	8,57(7,12x10,43)x2,41 (1,57x3,32)
IBCB 383	49,53	7,54 (6,27x10,41)x2,48 (1,96x3,16)	7,35 (5,11x10,01)x2,42 (2,02x3,30)
IBCB 384	41,23	7,99 (6,1x9,97)x2,63 (1,13x3,95)	8,53 (6,10x10,11)x2,57 (1,80x3,33)
IBCB 410	43,27	7,98 (6,01x10,91)x2,42 (1,26x3,28)	8,43 (6,46x11,99)x2,21 (1,13x3,49)
CG 420	30,45	8,31 (6,89x10,91)x2,72 (2,01x3,26)	8,68 (6,15x10,99)x2,15 (1,51x2,61)
IBCB 481	45,32	8,55 (6,92x9,53)x2,59 (1,98x3,08)	7,92 (5,90x11,65)x2,73 (2,17x3,11)
CG 489	34,69	8,51 (6,46x10,21)x2,75 (2,04x3,66)	8,97 (5,14x11,47)x2,43 (2,18x3,49)
CG 578	29,66	7,88 (5,94x9,91)x2,73 (1,98x3,92)	8,64 (6,21x10,75)x2,93 (2,11x3,33)
CG 579	36,51	6,97 (5,14x8,51)x2,13 (1,42x3,17)	8,32 (6,13x10,14)x2,24 (2,03x3,17)
CG 580	37,12	7,81 (5,78x9,93)x2,30 (2,07x3,19)	8,88 (6,37x11,01)x2,48 (2,15x3,46)
CG 626	50,11	8,05 (6,11x9,99)x2,48 (2,10x3,85)	8,91 (6,43x10,79)x2,81 (1,93x3,66)
CG 627	41,65	7,86 (5,17x9,84)x2,29(1,77x3,83)	8,56 (6,94x9,93)x2,57 (2,23x3,49)
CG 628	46,35	8,46 (6,39x9,46)x1,79 (1,43x3,36)	7,17 (6,16x14,11)x2,34 (1,41x2,66)
CG629	51,37	8,55 (6,58x10,31)x2,63 (2,78x3,99)	8,86 (6,42x10,98)x2,47 (2,18x3,52)

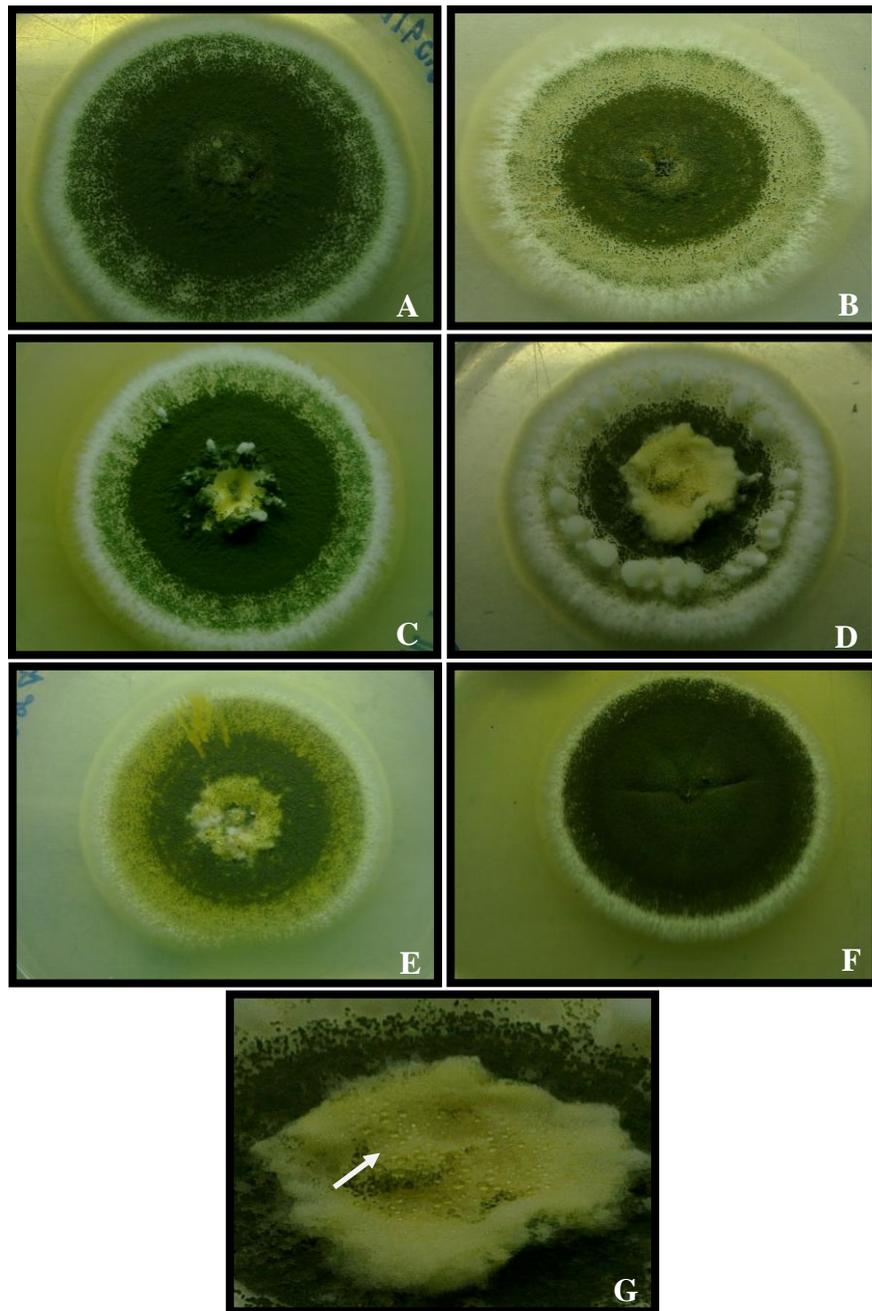


Figura 1. Colônias de isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. A=CG 148-colônia característica da maioria dos isolados estudados, verde oliva, lisa e zonada. B=IBCB 116-variação da tonalidade de verde oliva da colônia. C=CG 37-região central de coloração amarela evidente com presença de feixe de conidióforos. D=CG 49- presença de micélio feixe de conidióforos na região periférica da colônia e centro com coloração amarela. E= CG 347-colônia com centro e borda periférica amarela. F=IBCB 156-Colônia sulcada. G=ampliação do centro da colônia CG 49-notar produção de exsudato hialino (seta).

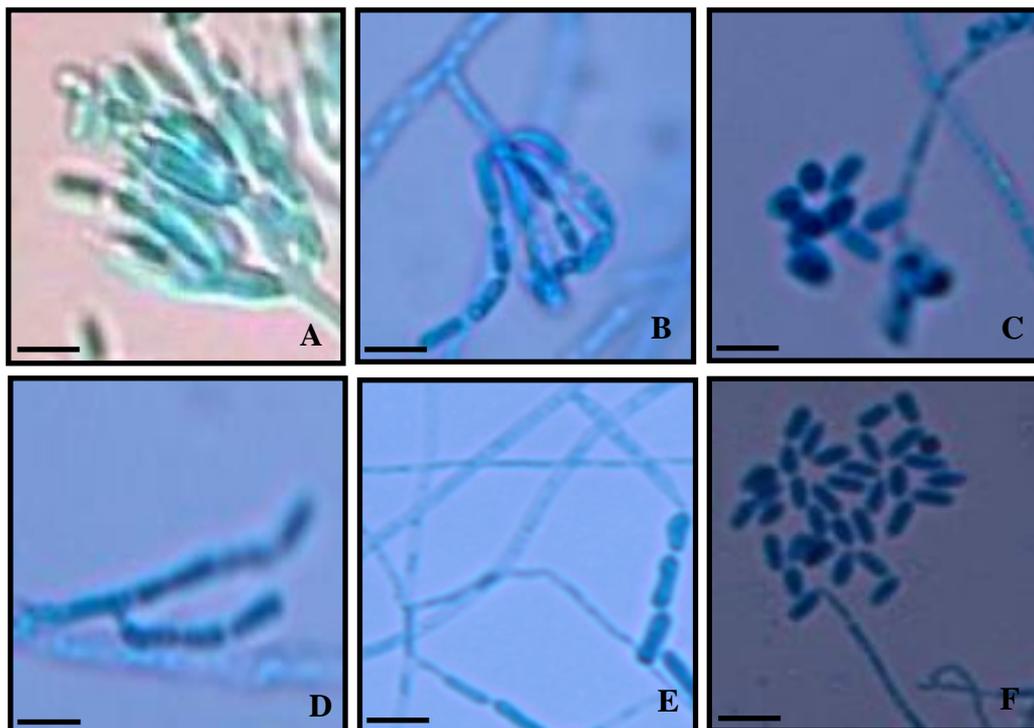


Figura 2. Isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. **A** (IBCB 116), **B** (CG 148) e **C** (CG 347) - conidióforo com fiálides justapostas e cilíndricas; **D** (CG 148), **E** (CG 37) e **F** (CG 87) - fiálides solitárias e conídios cilíndricos. Foto de microscopia óptica a magnitude de 1000 X, barras equivalentes a 10 μ m.

3.2 Avaliação da produção de conídios

Houve variação quanto à produção de conídios em 0,589cm² de cultura (Figura 3). Dos 30 isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. testados, cinco isolados apresentaram menor potencial para produção de conídios, produzindo em média menos de 5000 x 10⁴ conídios (CG 49, IBCB 167, IBCB 353, IBCB 410 e CG 420), dez isolados apresentaram potencial moderado, produzindo em média entre 5000 e 10000 x10⁴ conídios (CG 46, CG 87, CG 112, IBCB 156, CG 344, IBCB 384, CG 489, CG 578, CG 580 e CG 627) e 15 isolados apresentaram alto potencial, com dez isolados produzindo em média entre 10000 e 15000 x 10⁴ conídios (CG 32, CG 37, CG 148, CG 153, CG 191, CG 312, CG 371, IBCB 481, CG 579 e CG 628) e cinco isolados com produção média superior a 15000 x 10⁴ conídios (IBCB 116, CG 347, IBCB 383, CG 626 e CG 629).

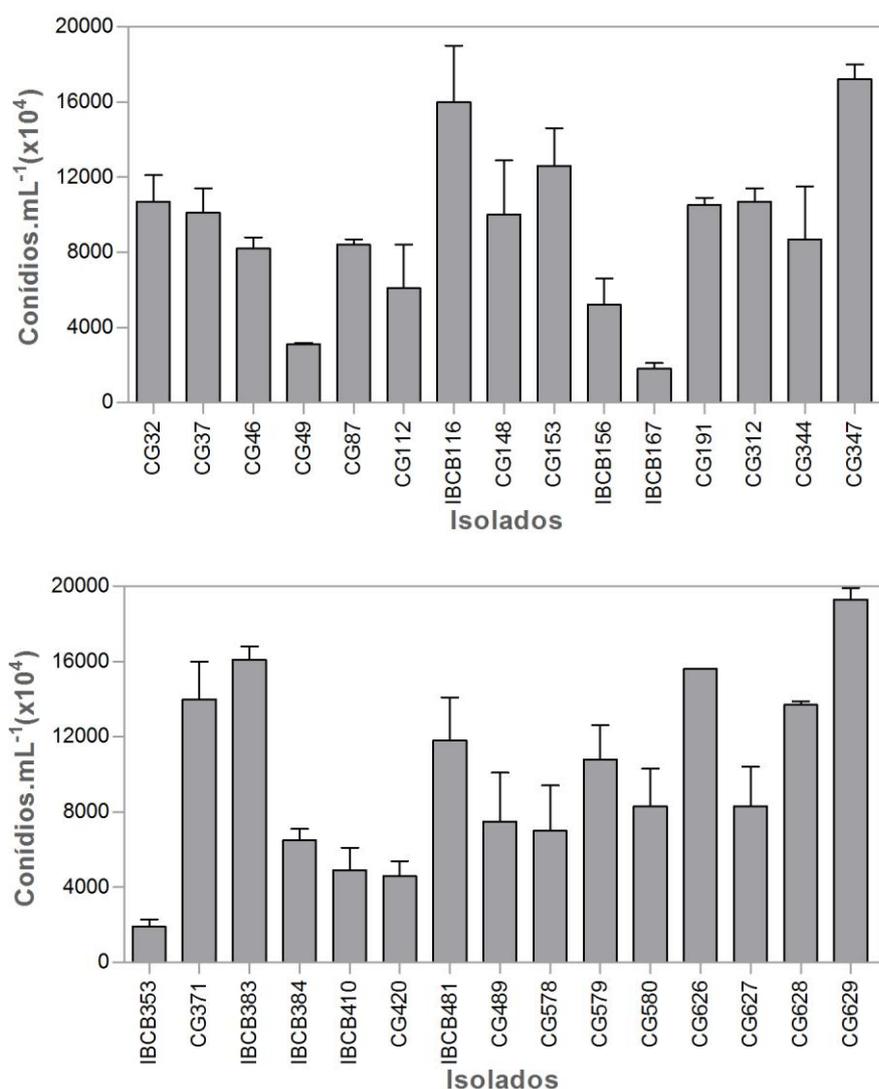


Figura 3. Médias e desvio padrão da produção de conídios de 30 isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. em área de cultura de 0,589 cm².

4 DISCUSSÃO

Tradicionalmente a identificação de *Metarhizium* spp. baseia-se na análise de suas características morfológicas em meios artificiais e no exame ao microscópio de conídios e conidióforos (BRIDGE et al., 1997). As características macro e microscópicas dos 30 isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. analisados no presente estudo foram compatíveis com as descritas para o gênero na literatura (TULLOCH, 1976; DRIVE et al., 2000; BISCHOFF et al., 2009; FERNANDES et al., 2010).

As colônias apresentaram tamanho bastante variável, entre 29,66 e 51,33 mm, ficando dentro da faixa observada por Fernandes et al., 2010, que ao analisarem o tamanho das colônias de isolados de *M. anisopliae* s.l. encontraram em média diâmetros inferiores a 70 mm.

Bischoff et al. (2009) na mais recente revisão taxonômica do gênero, observaram que a pigmentação das colônias dos isolados pertencentes ao complexo *M. anisopliae* inicialmente

é branca, ficando amarela nos estágios iniciais de desenvolvimento dos conídios, tornando-se verde com o seu amadurecimento, com colônias geralmente apresentando coloração variável entre verde oliva e suas diversas tonalidades. Os autores expõem que houve variação na cor das colônias entre as diferentes espécies analisadas, ressaltando que isolados de espécies diferentes apresentaram colônias de coloração semelhante, tornando este critério pouco confiável para identificação das espécies. Esses resultados corroboram os resultados do presente estudo, com a maioria das colônias apresentando colorações que variaram entre tonalidades de verde oliva, com algumas colônias apresentando o centro de coloração amarela.

A análise dos conídios de fungos entomopatogênicos é muito importante, não apenas como característica de diferenciação de táxons, mas também por serem responsáveis pelo início da infecção no hospedeiro sendo, portanto o ingrediente ativo nas formulações de biopesticidas (JEFFS et al., 1999). De acordo com Alves (1998), isolados de *M. anisopliae* apresentam como características microscópicas conidióforos simples que justapostos resultam numa massa irregular, conídios cilíndricos ou ovais e fiálides cilíndricas ou clavadas que se colocam uma ao lado da outra.

Tulloch (1976) promoveu a primeira revisão taxonômica do gênero e descreveu que os isolados de *M. anisopliae* s.l. (*M. anisopliae* var *anisopliae*) apresentavam conídios com forma cilíndrica a oval, muitas vezes ligeiramente estreitados no meio, podendo ser truncados em ambas as extremidades, com medidas podendo variar entre 3,5 x 9,0 µm de comprimento. Drive et al. (2000) em uma segunda revisão confirma a descrição anterior, relatando que os isolados de *M. anisopliae* s.l. geralmente apresentam conídios de coloração verde, forma cilíndrica, em média medindo entre 5 a 7 µm de comprimento e dispostos em cadeias de colunas.

No presente estudo todos os isolados apresentaram conídios de aparência lisa, formato cilíndrico e de tamanhos médios entre 6,88 e 8,67 µm x 2,75 e 1,79 µm. As fiálides apresentaram formato cilíndrico e suas medidas variaram entre 9,70 e 7,17 µm x 2,15 e 2,93 µm. Houve variação no comprimento e na largura de conídios e fiálides num mesmo isolado, assim como a presença de fiálides agrupadas e solitárias. Este último fato também foi observado por Fernandes (2007) que em análises micromorfológicas de diferentes isolados de *Beauveria* spp. observou isolados com células conidiogênicas pouco agrupadas ou solitárias, concluindo que o fato se deve provavelmente devido a época de isolamento dos mesmos, pois a maioria foi obtida nas décadas de 70 a 90, e vem sendo cultivados em diferentes meios artificiais e submetidos a diferentes métodos de preservação, e que os isolados que não apresentaram estas alterações tenham menor sensibilidade ao cultivo artificial ou foram pouco manipulados.

Glare et al. (1996) testaram a validade da análise da morfologia das fiálides como ferramenta taxonômica para diferenciação de espécies de *Metarhizium*. Ao examinarem isolados de *M. anisopliae* s.l., *M. album* e *M. flavoviride*, descobriram que a morfologia da fiálide de um único isolado pode variar dentro da mesma cultura e entre substratos.

É possível perceber uma ligeira correlação positiva entre o tamanho das fiálides e dos conídios, porém esta associação é considerada muito fraca para ser utilizada como diagnóstico taxonômico (BISCHOFF et al., 2009). Dificuldades na identificação de organismos baseada nas características morfológicas são frequentemente encontradas, pois estas características variam facilmente, dependendo das condições ambientais e fisiológicas (ENTZ et al., 2005).

Segundo Bischoff et al. (2009) os conídios são a principal característica morfológica capaz de promover a distinção entre as diferentes espécies de *Metarhizium*. Porém os autores também relatam a íntima relação entre as características morfológicas destas espécies, afirmando que os conídios de cinco entre as nove espécies analisadas são extremamente semelhantes em tamanho e forma, não sendo possível diferenciá-los com base na sua

morfologia. Fato já evidenciado por Driver et al. (2000) em sua revisão taxonômica do gênero, sugerindo que técnicas bioquímicas e moleculares devam ser associadas a análises morfológicas.

Os isolados apresentaram elevada variabilidade quanto à produção de conídios. Liu et al. (2003) relataram que isolados portadores de conídios de maior tamanho também apresentaram maior produção de conídios. Fato não observado neste estudo, tendo como exemplo o isolado IBCB 116, que apresentou uma das três maiores colônias (50,47 mm), obteve um dos potenciais mais elevados para produção de conídios, produzindo em média mais de 15000×10^4 conídios em $0,589 \text{ cm}^2$ de cultura, porém foi o isolado com conídios de menor comprimento. Desta forma, tanto o tamanho dos conídios quanto o diâmetro das colônias não influenciaram marcadamente a produção de conídios, pois isolados com baixo potencial de produção de conídios apresentaram tamanho da colônia semelhante a isolados de alto potencial.

CAPÍTULO II

AÇÃO DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Metarhizium anisopliae* s.l. SOBRE LARVAS DE *Rhipicephalus microplus*

RESUMO

As práticas atuais de controle de carrapatos são baseadas principalmente no uso de agentes químicos, porém a habilidade de *Rhipicephalus microplus* de desenvolver resistência aos diferentes acaricidas, seus efeitos ambientais negativos e a demanda cada vez maior por alimentos livres de produtos químicos, vêm acarretando o desenvolvimento de estratégias de controle alternativo. O objetivo deste estudo foi avaliar a virulência de 30 isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l., provenientes de diferentes regiões geográficas, hospedeiros ou substratos sobre larvas de carrapato, permitindo a seleção de isolados mais virulentos para serem utilizados em futuros programas de controle microbiano. O percentual de mortalidade e a concentração letal foram avaliados. Os grupos foram tratados com as concentrações de 10^8 , 10^7 , 10^6 ou 10^5 conídios/mL e o tratamento ocorreu por imersão das larvas em 1 mL de suspensão, por três minutos. O presente estudo confirmou a ação letal dos isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. sobre larvas do carrapato *R. microplus*, com elevado nível de mortalidade entre os isolados, geralmente ocorrendo de forma diretamente proporcional a concentração dos tratamentos. A maioria dos isolados ocasionou a morte de metade da população de larvas com a concentração de 10^7 conídios/mL, com os isolados mais virulentos apresentando concentração letal de 10^6 conídios/mL e percentuais médios de mortalidade de 100% ao 20º dia após tratamento das larvas. O presente estudo possibilitou a detecção de isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. com elevada virulência para larvas de *R. microplus*, podendo ser considerados potenciais agentes no biocontrole desta espécie de carrapato.

Palavras-chave: Controle microbiano; fungos entomopatogênicos; *Rhipicephalus microplus*.

ABSTRACT

Current practices to control ticks are mainly based on the use of chemical agents, but the ability of *Rhipicephalus microplus* to develop resistance to various acaricides, the negative environmental effects and the increasing demand for food free of chemicals are driving the development of alternative control strategies. The aim of this study was to evaluate the virulence of 30 isolates of *Metarhizium anisopliae* s.l. from different geographical regions, hosts or substrates on tick larvae, allowing the selection of virulent isolates in order to be further used in programs of microbial control. The mortality percentages and lethal concentrations were evaluated. The groups were treated with 10^8 , 10^7 , 10^6 or 10^5 conidia.mL⁻¹ concentrations and the treatments occurred by larvae immersions in one mL suspensions for three minutes. The current study confirmed the lethal action of Brazilian *M. anisopliae* s.l. isolates on *R. microplus* larvae, with high larval mortality percentages caused by the isolates, which generally was proportional to the conidia concentration of the treatments. Most isolates caused the death of half larvae population with 10^7 conidia.mL⁻¹ concentration, although the more virulent isolates presented lethal concentration of 10^6 conidia.mL⁻¹ with averages percentages of mortality nearly 100% from the 20th day after larvae treatments. The present study allowed the detection of *M. anisopliae* s.l. isolates with high virulence for *R. microplus* larvae, that may be considered as potential biocontrol agents in this tick species.

Key words: Microbial control; entomopathogenic fungi; *Rhipicephalus microplus*.

1. INTRODUÇÃO

Rhipicephalus microplus é o principal ectoparasita hematófago dos bovinos, presente nas diversas regiões do país. É causador de enormes perdas econômicas pela espoliação que causa ao hospedeiro, além de ser transmissor dos agentes etiológicos da tristeza parasitária bovina (ANDREOTI, 2010).

As práticas atuais de controle de carrapatos são baseadas principalmente no uso de agentes químicos, porém a habilidade do *R. microplus* de desenvolver resistência aos diferentes acaricidas, a demanda cada vez maior por alimentos livres de produtos químicos e os efeitos ambientais negativos causados pelos acaricidas, vêm acarretando o desenvolvimento de estratégias de controle alternativo, que minimizem o uso de agentes químicos (KAY et al., 1994).

A utilização de fungos entomopatogênicos com finalidade de controle biológico tem sido alvo de diversas pesquisas científicas (WILLADSEN, 2006), tendo sua patogenicidade comprovada para diversas espécies de carrapatos, como *R. microplus*, *R. sanguineus*, *R. appendiculatus*, *Dermacentor nitens*, *Ixodes scapularis*, *A. cajennense*, *A. variegatum*, *A. maculatum*, *A. americanum*, entre outros (BITTENCOURT et al., 1994a e b, 1996, 1997; KAAYA et al., 1996; SOUZA et al., 1999; BENJAMIN et al., 2002; MONTEIRO et al., 2003; HORNBOSTEL et al., 2004; KIRKLAND et al., 2004; LOPES et al., 2007; LEEMON; JONSSON, 2008).

A capacidade destes microorganismos em agir sobre os diferentes estágios evolutivos do hospedeiro, sua virulência relativamente específica e sua variabilidade genética pode ser considerada uma das suas principais vantagens, tornando-os agentes promissores no controle microbiano (ALVES, 1998; SAMISH et al., 2004).

Beauveria bassiana e *Metarhizium anisopliae* são os fungos entomopatogênicos melhor caracterizados e amplamente utilizados em programas de controle biológico de diversos artrópodes (ZIMMERMANN, 2007a, b; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

Nos últimos anos os esforços de pesquisas e o desenvolvimento tecnológico têm aumentado significativamente, e um número considerável de micopesticidas à base destes fungos tem sido desenvolvido em escala mundial para o controle de insetos e carrapatos (FARIA; WRIGHT, 2007), tendo sua segurança garantida, com riscos mínimos de contaminação ambiental (ZIMMERMANN, 2007b).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a virulência de 30 isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l., provenientes de diferentes regiões geográficas, hospedeiros ou substratos, sobre larvas do carrapato *Rhipicephalus microplus*, permitindo assim a seleção de isolados mais virulentos a fim de serem utilizados em futuros programas de controle microbiano.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e período de execução dos bioensaios

O estudo foi realizado no Laboratório de Controle Microbiano da Estação para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ),

localizada no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro. Os bioensaios foram realizados no período de abril a junho de 2011.

2.2 Obtenção das larvas de *Rhipicephalus microplus*

Para realização dos bioensaios, foram utilizadas fêmeas de *R. microplus* oriundas de infestações artificiais, feitas periodicamente, de bezerros mantidos em baias localizadas na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz. Vinte e um dias após a infestação, as fêmeas ingurgitadas foram coletadas do piso das baias e em seguida sofreram assepsia da cutícula, sendo imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1% durante três minutos e, posteriormente, secas em papel toalha. Estas foram mantida em placas de Petri e acondicionadas em câmara climatizada com temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ para a obtenção de larvas.

A postura das fêmeas até o 10º dia foi pesada em alíquotas de 50 mg, acondicionada em tubos de ensaio vedados com algodão hidrófilo e mantidos em câmara climatizada, sob as mesmas condições descritas para as fêmeas, até a eclosão total das larvas. Os tubos que não apresentaram eclosão superior a 95% foram excluídos do experimento. Os tratamentos ocorreram no 15º dia após a eclosão total das larvas das larvas.

2.3 Origem dos isolados

Os 30 isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. estudados são provenientes das coleções de culturas de fungos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e do Instituto Biológico de São Paulo, originários de diferentes regiões geográficas e hospedeiros ou substratos (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. com seus respectivos hospedeiros ou substrato e origens.

Isolado	Hospedeiro/Substrato	Local
CG 32	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Bahia
CG 37	Solo	Tocantins
CG 46	<i>Deois incompleta</i> (Homoptera: Cercopidae)	Espírito Santo
CG 49	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera: Cercopidae)	Planaltina – DF
CG 87	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Flexeiras – AL
CG 112	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera: Cercopidae)	Planaltina – DF
IBCB 116	Solo	Contagem – MG
CG 148	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera: Cercopidae)	Goiânia – GO
CG 153	<i>Deois incompleta</i> (Homoptera: Cercopidae)	Altamira – PA
IBCB 156	Solo	Cascavel – PR
IBCB 167	Solo	Cascavel – PR
CG 191	Solo	Pelotas – RS
CG 312	Solo	Marilândia do Sul – PR
CG 344	Solo	Mauá – PR
CG 347	Solo	Minaçú – GO
IBCB 353	<i>Mahanarva fimbriolata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Valparaíso – SP
CG 371	Solo	Mauá – PR
IBCB 383	<i>Mahanarva fimbriolata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Água Branca – SP
IBCB 384	<i>Mahanarva fimbriolata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Sertãozinho – SP
IBCB 410	Lepitoptera	Petar-Iporanga – SP

Tabela 1. Continuação

Isolado	Hospedeiro/Substrato	Local
CG 420	Hymenoptera	João Pessoa – PB
CG 579	<i>Zulia entreariana</i> (Homoptera: Cercopidae)	Figueirópolis – TO
CG 580	<i>Zulia entreariana</i> (Homoptera: Cercopidae)	Araguaura – TO
CG 626	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Rio Largo – AL
CG 627	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Murici – AL
CG 628	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Porto Calvo – AL
CG629	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Marechal Deodoro – AL

CG=isolados provenientes da Coleção de fungos de invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;

IBCCB=isolados provenientes da Coleção de fungos entomopatogênicos do Instituto Biológico.

2.4 Elaboração e quantificação das suspensões

Os isolados de *M. anisopliae* s.l. foram cultivados em placas de Petri (100 × 15 mm, Fisherbrand) contendo meio de cultura BDA (Batata, dextrose e ágar-Himedia). As culturas foram mantidas em câmaras climatizadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, em escotofase e umidade relativa $\geq 80\%$ por 14 dias.

Após o período de cultivo, a superfície da placa de Petri foi raspada com o auxílio de um cabo com lâmina de bisturi. Os conídios foram suspensos em 30 ml de água destilada estéril e Tween 80 a 0,1% (LUZ et al., 1998). Em seguida, esta solução foi homogeneizada e quantificada em microscópio óptico com o auxílio da câmara de Neubauer. A suspensão foi ajustada à concentração 10^8 conídios/mL, segundo Alves (1998). As demais concentrações (10^7 , 10^6 e 10^5 conídios/mL) foram preparadas através de diluições seriadas a partir da concentração de 10^8 conídios/mL, utilizando-se 1 mL da suspensão mais concentrada, acrescida de 9 mL de água destilada estéril e Tween 80 a 0,1%.

2.5 Viabilidade dos conídios

Uma amostra de 10 μL da suspensão a 10^5 conídios/mL de cada isolado foi transferida para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubada em câmara climatizada sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$ durante 24 horas. A leitura da viabilidade dos conídios foi feita através de observação direta ao microscópio óptico e o cálculo da germinação dos mesmos foi realizado segundo Alves (1998), avaliando-se um número mínimo de 300 conídios por placa, com o percentual de conídios viáveis calculado através da divisão do número de conídios germinados pelo número total de conídios contados.

2.6 Delineamento experimental

Para realização dos bioensaios foram preparadas, para cada isolado testado, quatro suspensões conidiais, nas concentrações de 10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 conídios/mL. No grupo controle utilizou-se apenas uma solução estéril de água e Tween 80 a 0,1%. Os tratamentos e o grupo controle foram constituídos por oito réplicas.

2.7 Bioensaios

Os tratamentos foram realizados através da imersão das larvas, aproximadamente 1000, de cada tubo de ensaio em 1 mL de suspensão de conídios, por um período de três minutos. Após esse tempo, os tubos foram invertidos para que o excesso de suspensão fosse

absorvido pelo algodão que os vedava. A mesma metodologia foi utilizada para o grupo controle. Os tubos foram devidamente identificados com os isolados testados e suas respectivas concentrações de tratamento. Posteriormente, os tubos foram mantidos em câmaras climatizadas com temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.

A avaliação da ação dos diferentes isolados brasileiros de *M. anisopliae* sobre as larvas de *R. microplus* foi realizada através da observação ao microscópio estereoscópio da estimativa do percentual de mortalidade das larvas a cada cinco dias, até o 30° dia após tratamento.

2.8 Reisolamento dos fungos

Após os bioensaios foram coletadas amostras de larvas tanto do grupo controle quanto dos grupos tratados com as suspensões de diferentes concentrações dos isolados de *M. anisopliae* s.l. Estas amostras foram incubadas em câmara úmida a 25 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$, para que ocorresse o crescimento fúngico e a confirmação de suas características macro e microscópicas (SAMSON; EVANS, 1982).

2.9 Análise estatística

A estimativa do percentual de mortalidade de larvas foi realizada a cada cinco dias até o 30° dia após tratamento. As médias dos percentuais de mortalidade dos quatro grupos tratamento e do grupo controle aos dez, 20 e 30 dias após tratamento foram submetidas a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido do teste SNK (Student-Newman-Keuls) utilizando o programa estatístico BioEstat (AYRES et al., 2005), para comparação entre as ordenações das médias e verificar entre quais tratamentos houve diferença significativa, com níveis de significância de 5% ($P < 0,05$) (SAMPAIO, 2007).

O cálculo das concentrações letais, CL₅₀ e CL₉₀ e seus respectivos intervalos de confiança, foram feitos pela análise de próbites (FINNEY, 1971), e os cálculos foram realizados com auxílio do software Probit or Logit Analysis.

3 RESULTADOS

3.1 Viabilidade dos conídios

A viabilidade dos conídios dos isolados de *M. anisopliae* s.l. estudados foi de 100% de germinação após 24 horas de incubação a 25 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$, demonstrando que os conídios apresentaram-se viáveis e aptos a serem utilizados nos bioensaios.

3.2 Percentual de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com *Metarhizium anisopliae* s.l.

O percentual de mortalidade foi avaliado a cada cinco dias até o 30° dia após o tratamento das larvas, no entanto, os resultados mais relevantes foram obtidos ao 10°, 20° e 30° dias, podendo ser observados na tabela 2, 3, 4 e figura 1. As larvas do grupo controle não apresentaram mortalidade ao decorrer do experimento. Até o 10° dia após o tratamento das larvas, o percentual médio de mortalidade foi baixo, inferior a 10 %, e em geral ocorreu de forma diretamente proporcional a concentração de conídios testada. Desta forma, quanto

maior a concentração de conídios a qual as larvas foram expostas, maior o percentual de mortalidade das mesmas. Com exceção dos isolados CG 112, CG344, CG 371 e IBCB 383 que ocasionaram maior percentual de mortalidade na concentração de 10^7 conídios/mL e dos isolados IBCB 167, CG 489, CG 627, CG 628 e CG 629 que não apresentaram variação significativa dos percentuais de mortalidades das larvas em relação à concentração de conídios testada.

Este padrão de comportamento também foi observado ao 20º dia, onde em geral o percentual médio de mortalidade foi proporcional a concentração de conídios utilizada, variando entre 5,8 e 100 % entre os isolados estudados. Os isolados IBCB 383, CG 489 e CG 580 apresentaram melhores resultados na concentração de 10^7 conídios/mL.

No 30º dia após o tratamento o percentual médio de mortalidade variou entre 37,9 e 100%, com aumento proporcional a concentração de conídios testada, com maiores percentuais na concentração de 10^8 conídios/mL.

Foram avaliadas as concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) obtidas ao 30º dia após tratamento (Tabela 5). A maioria dos isolados ocasionou a morte de metade da população de larvas com a concentração de 10^7 conídios/mL (CG 49, CG 167, IBCB 353, CG 420, CG 46, CG 87, IBCB 156, CG 344, CG 489, CG 578, CG 580, CG 32, CG 148, CG 153, CG 191, CG 371, CG 579, IBCB 116, CG 347, IBCB 383, CG 626, CG 629). Os isolados CG 37, IBCB 384 e IBCB 481 promoveram elevados percentuais médios de mortalidade com menor concentração de conídios (10^6 conídios/mL), apresentando percentuais médios de mortalidade de praticamente 100% já ao 20º dia após tratamento das larvas, podendo ser considerados como os isolados mais virulentos. Já os isolados CG 112, IBCB 116, CG 312, IBCB 410, CG 627 e CG 628 necessitaram de maiores concentrações de conídios (10^8 conídios/mL) para promover a morte das larvas, com o último necessitando da concentração de 10^9 conídios/mL para ocasionar mortalidade de metade da população de larvas tratadas e valor de CL_{90} de $1,854 \times 10^{11}$ conídios/mL.

Tabela 2. Percentual médio \pm desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 10 dias após a exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ$ C e Umidade Relativa $\geq 80\%$.

Isolados	Percentual médio de mortalidade (10 dias)				
	Controle	10^5	10^6	10^7	10^8
CG 32	0,0 \pm 0,0 a	0,3 \pm 0,5 a	0,1 \pm 0,4 a	1,8 \pm 3,4 a	9,4 \pm 5,0 b
CG 37	0,0 \pm 0,0 a	0,4 \pm 0,5 a	0,4 \pm 0,5 ab	1,8 \pm 1,7 bc	2,0 \pm 1,4 c
CG 46	0,0 \pm 0,0 a	0,3 \pm 0,7a	0,6 \pm 0,7 ab	1,1 \pm 0,6 bc	5,3 \pm 3,4 c
CG 49	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,9 \pm 1,7 ab	1,0 \pm 0,8 b
CG 87	0,0 \pm 0,0 a	0,3 \pm 0,5 a	1,0 \pm 1,4 bc	1,5 \pm 1,2 cd	3,0 \pm 1,8 d
CG 112	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,5 \pm 0,8 a	1,5 \pm 0,8 b	0,6 \pm 1,1 a
CG 153	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	1,1 \pm 1,1 b	0,9 \pm 0,8 b
CG 156	0,0 \pm 0,0 a	0,4 \pm 0,5 a	0,6 \pm 0,9 ab	2,0 \pm 1,9 bc	3,3 \pm 1,7 c
IBCB 167	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,4 \pm 0,5 a	1,4 \pm 1,3 a	0,1 \pm 0,4 a
CG 191	0,0 \pm 0,0 a	0,3 \pm 0,7 a	0,3 \pm 0,5 a	12,3 \pm 9,5 b	1,4 \pm 0,5 b
CG 312	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,4 \pm 0,5 ab	0,9 \pm 0,4 b	0,8 \pm 0,5 b
CG 344	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,3 \pm 0,5 a	3,8 \pm 4,0 b	0,3 \pm 0,5 a
CG 347	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	1,3 \pm 0,9 b	0,4 \pm 0,5 ab
IBCB 353	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	2,5 \pm 3,1 b	0,9 \pm 0,8 b
CG 371	0,0 \pm 0,0 a	0,1 \pm 0,4 a	0,3 \pm 0,5 a	2,9 \pm 1,5 b	0,6 \pm 0,5 a
IBCB 383	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	1,0 \pm 1,2 cd	2,1 \pm 1,9 c	0,4 \pm 0,5 bd
IBCB 384	0,0 \pm 0,0 a	0,3 \pm 0,5 a	1,3 \pm 0,5 b	3,1 \pm 1,9 b	1,5 \pm 0,5 b

Tabela 2. Continuação

Isolados	Controle	10⁵	10⁶	10⁷	10⁸
IBCB 410	0,0 ± 0,0 a	0,1±0,4 a	0,0 ±0,0 a	0,6 ±1,3 a	2,4 ±1,3 b
CG 420	0,0 ± 0,0 a	0,0±0,0 a	0,6 ±0,7 ab	1,9 ±2,2 b	1,4 ±1,1 b
IBCB 481	0,0 ± 0,0 a	0,0±0,0 a	0,5 ±1,1 a	3,1 ±1,7 b	5,5 ±3,1 b
CG 489	0,0 ± 0,0 a	0,0±0,0 a	0,1 ±0,4 a	0,6 ±0,9 a	0,4 ±0,5 a
CG 578	0,0 ± 0,0 a	0,3±0,5 a	1,3 ±0,9 b	4,4 ±3,2 b	1,4 ±0,5 b
CG 579	0,0 ± 0,0 a	0,0±0,0 a	1,0 ±1,8 a	3,9 ±3,1 b	10,9 ±8,3 b
CG 580	0,0 ± 0,0 a	0,0±0,0 a	1,1 ±1,6 b	2,3 ±1,4 b	0,8 ±0,5 b
CG 626	0,0 ± 0,0 a	0,1±0,4 a	0,3 ± 0,5 a	3,9 ± 3,1 b	2,5 ± 3,4 b
CG 627	0,0 ± 0,0 a	0,0±0,0 a	0,3 ±0,5 a	0,6 ±1,2 a	0,9 ±0,5 a
CG 628	0,0 ± 0,0 a	0,0±0,0 a	0,4 ± 0,5 a	0,5 ± 1,1 a	0,5 ± 0,5 a
CG629	0,0 ± 0,0 a	0,0±0,0 a	0,1±0,4 a	0,5 ±0,8 a	0,1 ±0,4 a

(*) Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem significativamente entre si (P≥0,05).

Tabela 3. Percentual médio ± desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 20 dias após a exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Experimento realizado sob condições controladas de 27 ± 1° C e Umidade Relativa ≥ 80%.

Isolados	Percentual de mortalidade (20 dias)				
	Controle	10⁵	10⁶	10⁷	10⁸
CG 32	0,0±0,0 a	3,5 ±3,4 ab	5,8±3,6 bc	42,9±45,5 cd	99,9±0,4 d
CG 37	0,0±0,0 a	2,0±1,4 ab	13,9±23,0 bc	83,6±29,3 d	69,9±20,5 cd
CG 46	0,0±0,0 a	3,6±3,0 ab	4,8±3,3 bc	74,5±41,7 cd	100,0±0,0 d
CG 49	0,0±0,0 a	2,8±1,5 ab	32,5±15,6 bc	75,6±19,4 c	51,3±31,3 c
CG 87	0,0±0,0 a	2,4±1,7 a	5,0±0,0 ab	70,0±39,3 bc	91,1±24,7 c
CG 112	0,0±0,0 a	1,3±0,5 ab	5,8±2,8 bc	18,1±7,5 cd	44,4±22,6 d
IBCB 116	0,0±0,0 a	2,9±1,4 ab	6,4±4,1 bc	18,1±7,5 c	27,4±38,9 c
CG 148	0,0±0,0 a	1,6 ±1,5 ab	13,4±12,8 bc	48,8±26,4 cd	60,0±36,2 d
CG 153	0,0±0,0 a	1,5±1,1 ab	15,3±26,3 bc	63,8±34,2 c	65,6±44,8 c
CG 156	0,0±0,0 a	3,0±2,1 b	5,1±6,7 b	51,3±18,9 c	86,4±13,9 c
IBCB 167	0,0±0,0 a	0,9±0,6 ab	4,9±2,3 bc	66,9±22,8 d	17,3±14,9 cd
CG 191	0,0±0,0 a	4,6±4,4 b	5,0±2,2 b	94,4±6,0 c	35,3±43,4 bc
CG 312	0,0±0,0 a	2,3±3,3 ab	3,9±2,9 bc	11,3±9,2 cd	50,6±40,4 d
CG 344	0,0±0,0 a	3,1±1,1 ab	8,6±7,0 bc	98,9±0,8 d	14,3±13,3 cd
CG 347	0,0±0,0 a	1,9±1,4 a	3,9±1,6 a	83,8±10,3 b	41,3±21,0 ab
IBCB 353	0,0±0,0 a	3,5±0,8 b	3,4±1,1 b	75,1±22,0 c	87,3±17,3 c
CG 371	0,0±0,0 a	6,5±3,1 b	6,9±2,6 b	82,1±23,3 c	65,6±39,4 c
IBCB 410	0,0±0,0 a	3,0±1,5 ab	3,9±1,0 bc	16,6±9,4 cd	55,6±39,8 d
CG 420	0,0±0,0 a	2,5±1,1 ab	16,4±33,1 bc	39,8±38,9 c	28,3±43,7 c
IBCB 481	0,0±0,0 a	4,0±3,0 ab	10,9±12,1 bc	86,0±27,2 cd	100,0±0,0 d
CG 489	0,0±0,0 a	6,1±8,6 b	21,3±12,2 cd	33,1±19,8 d	6,5±7,6 bc
CG 578	0,0±0,0 a	6,6±2,8 ab	11,0±5,6 b	60,0±23,9 c	80,8±25,1 c
CG 579	0,0±0,0 a	3,0±3,1 ab	6,3±3,2 bc	90,8 ±9,4cd	98,5±3,5 d
CG 580	0,0±0,0 a	2,8±1,0 ab	12,5±8,7 b	56,9±8,8 c	12,5±6,5 b
CG 626	0,0±0,0 a	2,9±3,2 ab	10,0 ±4,6 bc	70,6±14,0 cd	86,8±23,7 d
CG 627	0,0±0,0 a	1,3±0,7 ab	2,3 ±1,4 b	28,1±27,1 c	63,1±22,8 c
CG 628	0,0±0,0 a	1,4±1,7 ab	1,9 ±1,2 bc	5,5±4,6 c	5,8±3,1 c
CG629	0,0±0,0 a	2,0±1,4 ab	6,3 ±4,2 bc	32,5±26,7 d	42,3±42,5 cd

(*) Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem significativamente entre si (P≥0,05).

Tabela 4. Percentual médio \pm desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 30 dias após a exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ$ C e Umidade Relativa $\geq 80\%$.

Percentual médio de mortalidade (30 dias)					
Isolados	Controle	10^5	10^6	10^7	10^8
CG 32	0,0 \pm 0,0 a	9,4 \pm 9,7 ab	38,6 \pm 38,0 bc	80,6 \pm 28,0 cd	100,0 \pm 0,0 d
CG 37	0,0 \pm 0,0 a	29,1 \pm 32,2 ab	78,8 \pm 29,5 bc	96,3 \pm 6,9 c	97,9 \pm 5,2 c
CG 46	0,0 \pm 0,0 a	9,5 \pm 5,9 ab	16,3 \pm 10,6 b	85,0 \pm 28,3 c	100,0 \pm 0,0 c
CG 49	0,0 \pm 0,0 a	9,8 \pm 5,7 ab	51,3 \pm 15,5 bc	84,9 \pm 15,0 cd	96,6 \pm 8,7d
CG 87	0,0 \pm 0,0 a	10,6 \pm 5,6 ab	25,6 \pm 9,4 bc	82,5 \pm 32,4 cd	100,0 \pm 0,0 d
CG 112	0,0 \pm 0,0 a	5,0 \pm 4,2 ab	16,9 \pm 10,0 bc	35,6 \pm 11,8 cd	67,9 \pm 26,8 d
IBCB 116	0,0 \pm 0,0 a	5,8 \pm 3,8 ab	11,9 \pm 8,4 ab	36,9 \pm 14,4 b	55,0 \pm 39,3 b
CG 148	0,0 \pm 0,0 a	10,5 \pm 8,3 ab	35,0 \pm 24,1 bc	69,1 \pm 26,2 cd	100,0 \pm 0,0 d
CG 153	0,0 \pm 0,0 a	6,1 \pm 4,4 ab	26,3 \pm 13,0 b	88,8 \pm 18,1 bc	99,9 \pm 0,4 c
CG 156	0,0 \pm 0,0 a	6,1 \pm 4,4 b	14,4 \pm 11,2 bc	69,4 \pm 19,7 cd	95,5 \pm 4,0 d
IBCB 167	0,0 \pm 0,0 a	5,1 \pm 2,2 ab	13,8 \pm 3,5 bc	73,8 \pm 22,2 cd	91,3 \pm 13,5 d
CG 191	0,0 \pm 0,0 a	14,4 \pm 10,5 ab	28,8 \pm 15,3 bc	88,1 \pm 10,0 cd	97,5 \pm 2,7 d
CG 312	0,0 \pm 0,0 a	5,8 \pm 5,9 ab	11,0 \pm 5,6 bc	43,8 \pm 20,1 cd	74,4 \pm 28,6 d
CG 344	0,0 \pm 0,0 a	11,3 \pm 6,4 ab	21,9 \pm 9,6 bc	87,0 \pm 14,7 cd	99,9 \pm 0,4 d
CG 347	0,0 \pm 0,0 a	11,9 \pm 4,6 ab	37,5 \pm 12,5 bc	98,5 \pm 1,7 cd	99,8 \pm 0,7 d
IBCB 353	0,0 \pm 0,0 a	10,6 \pm 12,4 ab	20,6 \pm 19,9 b	92,9 \pm 5,6 c	97,3 \pm 4,5 d
CG 371	0,0 \pm 0,0 a	26,9 \pm 10,7 b	22,5 \pm 12,0 ab	93,5 \pm 11,7 c	96,3 \pm 7,4 c
IBCB 383	0,0 \pm 0,0 a	15,0 \pm 10,7 ab	42,5 \pm 17,5 b	61,3 \pm 28,0 bc	95,9 \pm 4,1 c
IBCB 384	0,0 \pm 0,0 a	31,3 \pm 13,0 ab	34,4 \pm 10,8 b	100,0 \pm 0,0 c	100,0 \pm 0,0 c
IBCB 410	0,0 \pm 0,0 a	13,1 \pm 9,8 ab	16,9 \pm 5,7 bc	41,9 \pm 11,0 cd	79,3 \pm 35,9 d
CG 420	0,0 \pm 0,0 a	21,9 \pm 24,0 ab	54,9 \pm 38,5 bc	72,5 \pm 27,1c	81,9 \pm 20,7 c
IBCB 481	0,0 \pm 0,0 a	24,4 \pm 18,6 ab	45,0 \pm 21,2 b	99,3 \pm 0,7 c	100,0 \pm 0,0 c
CG 489	0,0 \pm 0,0 a	14,4 \pm 11,8 ab	32,5 \pm 8,9 bc	55,6 \pm 27,4 c	73,1 \pm 31,8 c
CG 578	0,0 \pm 0,0 a	16,3 \pm 7,9 ab	33,1 \pm 16,2 b	88,8 \pm 5,8 c	94,4 \pm 7,9 c
CG 579	0,0 \pm 0,0 a	8,4 \pm 7,6 ab	15,6 \pm 8,6 b	99,4 \pm 0,9 c	100,0 \pm 0,0 c
CG 580	0,0 \pm 0,0 a	8,1 \pm 3,7 ab	26,3 \pm 13,0 bc	66,9 \pm 13,6 cd	88,4 \pm 25,7 d
CG 626	0,0 \pm 0,0 a	8,3 \pm 4,3 ab	23,1 \pm 16,9 bc	76,3 \pm 15,8 cd	97,4 \pm 7,0 d
CG 627	0,0 \pm 0,0 a	4,4 \pm 1,2 ab	10,0 \pm 6,5 bc	41,6 \pm 31,7 cd	87,4 \pm 16,6 d
CG 628	0,0 \pm 0,0 a	1,4 \pm 1,7 a	2,9 \pm 2,9 ab	10,6 \pm 5,0 bc	37,9 \pm 25,4 c
CG629	0,0 \pm 0,0 a	6,5 \pm 3,0 ab	23,1 \pm 11,9 bc	55,4 \pm 22,4 c	74,4 \pm 32,3 c

(*) Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem significativamente entre si ($P \geq 0,05$).

Tabela 5. Concentração letal (CL₅₀ e CL₉₀) dos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. obtida no bioensaio de larvas de *Rhipicephalus microplus* 30 dias após o tratamento, Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ$ C e Umidade Relativa $\geq 80\%$.

Concentração Letal (CL)		
Isolados	CL (conídios. ml ⁻¹)	Intervalo de Confiança (conídios. ml ⁻¹)
CG 32	CL ₅₀ = 1,580x10 ⁷	7,959x10 ⁶ - 3,137x10 ⁷
	CL ₉₀ = 1,876x10 ⁸	6,406x10 ⁷ - 6,540x10 ⁸
CG 37	CL ₅₀ = 2,255x10 ⁶	1,043x10 ⁶ - 6,273x10 ⁶
	CL ₉₀ = 4,520x10 ⁷	1,361x10 ⁷ - 1,823x10 ⁸

Tabela 5. Continuação

Isolados	CL (conídios. ml⁻¹)	Intervalo de Confiança (conídios. ml⁻¹)
CG 46	CL ₅₀ = 2,274x10 ⁷ CL ₉₀ = 2,022x10 ⁸	1,203x10 ⁷ - 4,299x10 ⁷ 7,520x10 ⁷ - 6,381x10 ⁸
CG 49	CL ₅₀ = 1,184x10 ⁷ CL ₉₀ = 1,873x10 ⁸	5,641x10 ⁶ - 2,486x10 ⁷ 5,844x10 ⁷ - 7,255x10 ⁸
CG 87	CL ₅₀ = 1,923x10 ⁷ CL ₉₀ = 2,094x10 ⁸	9,848x10 ⁶ - 3,758x10 ⁷ 7,337x10 ⁷ - 7,087x10 ⁸
CG 112	CL ₅₀ = 2,559x10 ⁸ CL ₉₀ = 1,745x10 ¹⁰	7,835x10 ⁷ - 8,360x10 ⁸ 1,184x10 ⁹ - 3,974x10 ¹¹
IBCB 116	CL ₅₀ = 5,361x10 ⁸ CL ₉₀ = 7,264x10 ¹⁰	1,107x10 ⁸ - 2,595x10 ⁹ 1,708x10 ⁹ - 5,667x10 ¹²
CG 148	CL ₅₀ = 2,144x10 ⁷ CL ₉₀ = 3,467x10 ⁸	1,030x10 ⁷ - 4,465x10 ⁷ 1,055x10 ⁸ - 1,380x10 ⁹
CG 153	CL ₅₀ = 1,858x10 ⁷ CL ₉₀ = 1,366x10 ⁸	1,012x10 ⁷ - 3,411x10 ⁷ 5,360x10 ⁷ - 4,052x10 ⁸
CG 156	CL ₅₀ = 4,303x10 ⁷ CL ₉₀ = 5,279x10 ⁸	2,163x10 ⁷ - 8,560x10 ⁷ 1,725x10 ⁸ - 1,936x10 ⁹
IBCB 167	CL ₅₀ = 4,631x10 ⁷ CL ₉₀ = 6,252x10 ⁸	2,291x10 ⁷ - 9,359x10 ⁷ 1,954x10 ⁸ - 2,414x10 ⁹
CG 191	CL ₅₀ = 1,609x10 ⁷ CL ₉₀ = 3,735x10 ⁸	7,218x10 ⁶ - 3,587x10 ⁷ 9,972x10 ⁷ - 1,733x10 ⁹
CG 312	CL ₅₀ = 1,702x10 ⁸ CL ₉₀ = 6,443x10 ⁹	6,439x10 ⁷ - 4,503x10 ⁸ 8,308x10 ⁸ - 6,962x10 ¹⁰
CG 344	CL ₅₀ = 2,029x10 ⁷ CL ₉₀ = 3,852x10 ⁸	9,480x10 ⁶ - 4,345x10 ⁷ 1,103x10 ⁸ - 1,646x10 ⁹
CG 347	CL ₅₀ = 1,294x10 ⁷ CL ₉₀ = 5,403x10 ⁷	7,750x10 ⁶ - 2,163x10 ⁷ 2,434x10 ⁷ - 1,364x10 ⁸
IBCB 353	CL ₅₀ = 1,840x10 ⁷ CL ₉₀ = 1,876x10 ⁸	9,520x10 ⁶ - 3,559x10 ⁷ 6,709x10 ⁷ - 6,199x10 ⁸
CG 371	CL ₅₀ = 1,140x10 ⁷ CL ₉₀ = 2,624x10 ⁸	5,059x10 ⁶ - 2,572x10 ⁷ 7,157x10 ⁷ - 1,187x10 ⁹
IBCB 383	CL ₅₀ = 2,098x10 ⁷ CL ₉₀ = 6,321x10 ⁹	5,807x10 ⁶ - 7,581x10 ⁷ 2,962x10 ⁸ - 2,214x10 ¹¹
IBCB 384	CL ₅₀ = 6,056x10 ⁶ CL ₉₀ = 8,618x10 ⁷	2,859x10 ⁶ - 1,282x10 ⁷ 2,776x10 ⁷ - 3,213x10 ⁸
IBCB 410	CL ₅₀ = 1,202x10 ⁸ CL ₉₀ = 9,482x10 ⁹	4,019x10 ⁷ - 3,598x10 ⁸ 7,775x10 ⁸ - 1,133x10 ¹¹
CG 420	CL ₅₀ = 1,223x10 ⁷ CL ₉₀ = 2,453x10 ⁹	3,505x10 ⁶ - 4,269x10 ⁷ 1,893x10 ⁸ - 4,815x10 ¹⁰
IBCB 481	CL ₅₀ = 5,861x10 ⁶ CL ₉₀ = 6,190x10 ⁷	2,941x10 ⁶ - 1,168x10 ⁷ 2,162x10 ⁷ - 2,100x10 ⁸
CG 489	CL ₅₀ = 6,769x10 ⁷ CL ₉₀ = 1,303x10 ¹⁰	1,996x10 ⁷ - 2,295x10 ⁸ 6,038x10 ⁸ - 4,627x10 ¹¹
CG 578	CL ₅₀ = 1,440x10 ⁷ CL ₉₀ = 3,024x10 ⁸	6,557x10 ⁶ - 3,164x10 ⁷ 8,462x10 ⁷ - 1,328x10 ⁹

Tabela 5. Continuação

Isolados	CL (conídios. ml⁻¹)	Intervalo de Confiança (conídios. ml⁻¹)
CG 579	CL ₅₀ = 1,624x10 ⁷ CL ₉₀ = 8,945x10 ⁷	9,277x10 ⁶ - 2,846x10 ⁷ 3,792x10 ⁷ - 2,424x10 ⁸
CG 580	CL ₅₀ = 5,769x10 ⁷ CL ₉₀ = 1,230x10 ¹⁰	1,986x10 ⁷ - 2,259x10 ⁸ 5,038x10 ⁸ - 4,726x10 ¹¹
CG 626	CL ₅₀ = 2,717x10 ⁷ CL ₉₀ = 3,506x10 ⁸	1,356x10 ⁷ - 5,445x10 ⁷ 1,150x10 ⁸ - 3,705x10 ⁹
CG 627	CL ₅₀ = 1,191x10 ⁸ CL ₉₀ = 2,031x10 ⁹	2,518x10 ⁷ - 2,571x10 ⁸ 4,920x10 ⁸ - 1,055x10 ¹⁰
CG 628	CL ₅₀ = 3,329x10 ⁹ CL ₉₀ = 1,854x10 ¹¹	3,654x10 ⁸ - 2,872x10 ¹⁰ 1,942x10 ⁹ - 3,705x10 ¹³
CG629	CL ₅₀ = 9,554x10 ⁷ CL ₉₀ = 5,478x10 ⁹	3,506x10 ⁷ - 2,603x10 ⁸ 6,257x10 ⁸ - 6,816x10 ¹⁰

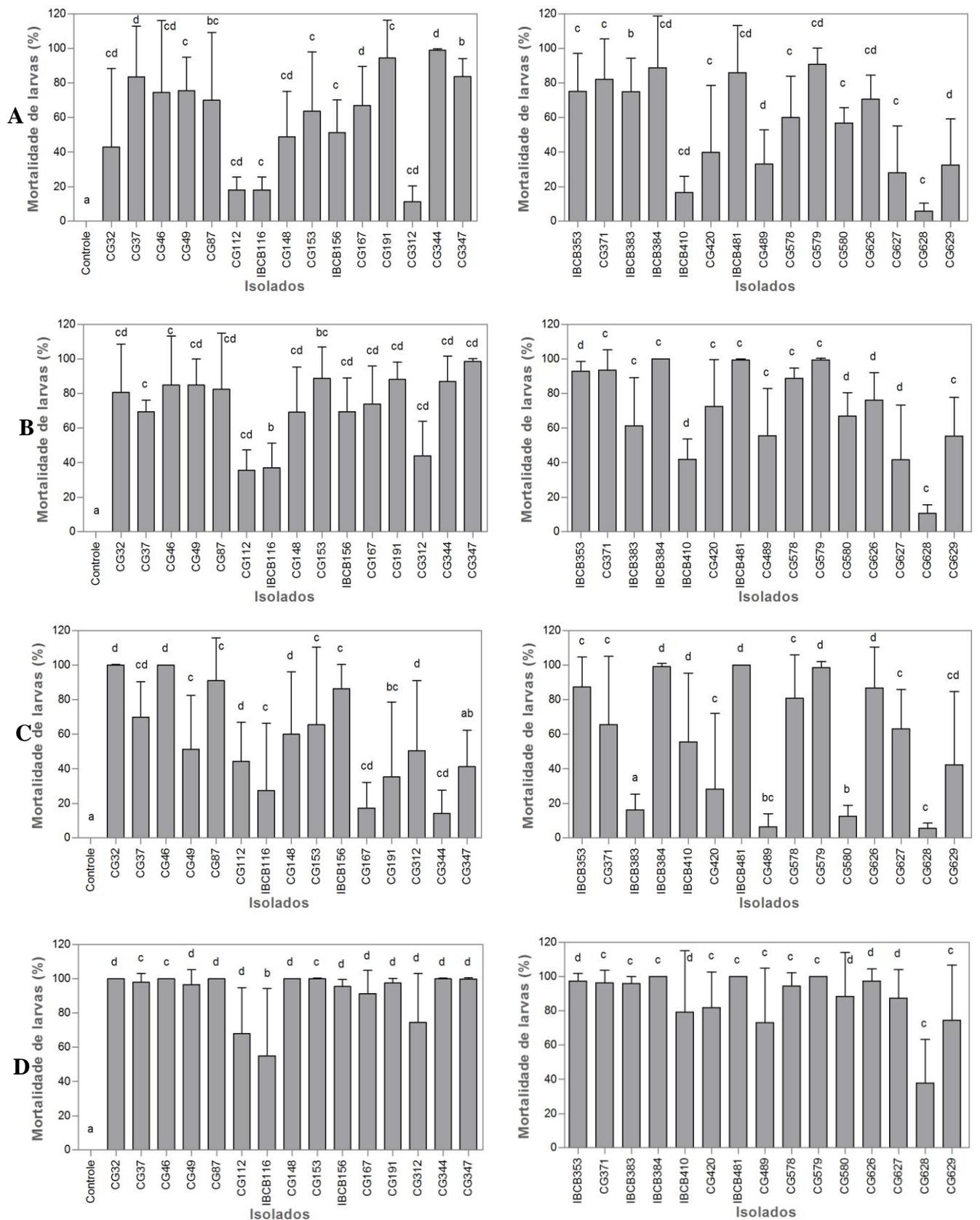


Figura 1. Percentual e desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidos após tratamento com isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. nas concentrações de 10^7 conídios/mL e 10^8 conídios/mL após 20 e 30 dias de tratamento. **A**=Percentuais médios e desvio padrão de mortalidade de larvas a concentração de 10^7 conídios/mL ao 20º dia após tratamento; **B**= Percentuais médios e desvio padrão de mortalidade de larvas a concentração de 10^7 conídios/mL ao 30º dia após tratamento; **C**= Percentuais médios e desvio padrão de mortalidade de larvas a concentração de 10^8 conídios/mL ao 20º dia após tratamento; **D**=Percentuais médios e desvio padrão de mortalidade de larvas a concentração de 10^8 conídios/mL ao 30º dia após tratamento.

3.3 Reisolamento fúngico

As larvas de *R. microplus* do grupo controle e submetidas aos tratamentos pelos isolados de *M. anisopliae* s.l. apresentaram desenvolvimento de colônias fúngicas. Tais colônias foram identificadas como sendo os mesmos isolados utilizados nos bioensaios, comprovando que os fungos foram capazes de penetrar, colonizar e causar alterações nas larvas do carrapato *R. microplus*. As larvas do grupo controle não apresentaram crescimento fúngico.

4 DISCUSSÃO

Os fungos entomopatogênicos podem ser considerados uma alternativa promissora aos acaricidas químicos utilizados no controle de carrapatos (SAMISH et al., 2004; WILLADSEN, 2006; SOSA-GÓMES et al., 2010). Schrank e Vainstein (2010) enfatizaram que uma das principais vantagens da utilização dos fungos entomopatogênicos no controle de carrapatos é a especificidade pelo hospedeiro e o mecanismo de penetração, iniciado a partir da germinação dos conídios. A viabilidade dos conídios é importante no processo de infecção do hospedeiro, pois possibilita o sucesso no início da primeira etapa da penetração do fungo na cutícula do carrapato, que se caracteriza pela germinação dos conídios e a conseqüente formação do tubo germinativo (BITTENCOURT et al., 1999b; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). No presente estudo, a viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* foi de 100% garantindo a qualidade dos conídios presentes nas suspensões fúngicas utilizadas no tratamento de larvas de *R. microplus*.

Diversos estudos têm demonstrado a virulência de *M. anisopliae* s.l. para diferentes estágios de desenvolvimento do carrapato (ÁNGEL-SAHAGÚN et al., 2010; KAAYA et al., 2011; SUN et al., 2011), sugerindo que este complexo de espécies fúngicas é um potencial agente de biocontrole deste parasita, especialmente no Brasil, onde tanto o fungo quanto o hospedeiro coexistem no mesmo microambiente. O presente estudo permitiu a seleção de isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. mais virulentos para o controle “in vitro” de larvas de *R. microplus*, conseqüentemente permitindo a seleção de isolados a serem utilizados em formulações para o controle integrado de pragas. A formulação do conídio é extremamente importante para maior eficácia dos resultados, uma vez que atua na manutenção da viabilidade, virulência e eficácia dos fungos entomopatogênicos a campo, permitindo melhor adesão dos conídios sob a cutícula de artrópodes, propiciando proteção contra condições ambientais adversas, como radiação UV, altas temperaturas e baixa umidade (POLAR et al., 2008; KAAYA et al., 2011). Além disso, a formulação deve estender a vida útil do fungo, prolongando a persistência do fungo em condições de campo (KAAYA; HASSAN, 2000; SAMISH et al., 2004; ANGELO et al., 2010; CAMARGO et al., 2012).

Estudos anteriores demonstraram elevada mortalidade de larvas de *R. microplus* dez dias após o tratamento com os entomopatógenos *M. anisopliae* ou *B. bassiana* (BITTENCOURT et al., 1994b, 1996; PAIÃO et al., 2001; FERNANDES et al., 2003; LEEMON et al., 2008; BARCI et al., 2009; POSADAS; LECUONA, 2009). No entanto, os isolados de *M. anisopliae* s.l. avaliados no presente estudo causaram baixo percentual de mortalidade (inferior a 10%) neste mesmo período de observação. Essa variação na virulência dos isolados pode ser atribuída às características genéticas de cada isolado e sua distribuição geográfica (BIDOCHKA et al., 2002; FERNANDES et al., 2009), à origem dos hospedeiros nos quais os fungos foram isolados (GOETTEL et al., 1990; VICENTINI et al., 2001) bem como à susceptibilidade da população de carrapatos (FERNANDES et al., 2011; PERINOTTO et al., 2012), ressaltando a importância da susceptibilidade dos indivíduos no

controle microbiano, pois além das condições ambientais, fisiológicas e genéticas, a susceptibilidade dos indivíduos de uma população pode interferir no controle biológico de uma determinada população de carrapatos. No entanto nenhuma relação entre a origem dos isolados ou hospedeiros/substrato e seu potencial virulento foi observada no presente trabalho. Estudos realizados por Fernandes et al. (2011) também não demonstraram esta relação quando avaliaram a virulência de *Beauveria* spp. originalmente isoladas de carrapatos sobre larvas de *R. microplus*. Vestergaard et al. (1995) citaram que a patogenicidade dos isolados de *M. anisopliae* no controle de *Frankliniella occidentalis* não demonstrou estar relacionada com seu hospedeiro ou local de origem, estando as variações nos índices de mortalidade relacionadas apenas à variabilidade de cada isolado fúngico.

O presente estudo confirmou a ação letal dos isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. sobre larvas do carrapato *R. microplus*, com elevado nível de mortalidade entre os isolados, geralmente ocorrendo de forma diretamente proporcional a concentração de conídios nos tratamentos. A maioria dos isolados ocasionou a morte de metade da população de larvas com a concentração de 10^7 conídios/mL, com os isolados mais virulentos apresentando concentração letal de 10^6 conídios/mL e percentuais médios de mortalidade de 100% ao 20º dia após tratamento das larvas.

De acordo com Tigano-Milani et al. (1995), a utilização de bioensaios prévios, sob condições controladas ou semicontroladas, é fundamental para compreensão dos parâmetros envolvidos na eficácia e persistência do patógeno a campo, quando se objetiva introduzi-los no ambiente com finalidade de controle biológico. A seleção de isolados fúngicos mais virulentos para carrapatos associada a maiores estudos para a obtenção de formulações ou adjuvantes que potencializem a ação acaricida de *M. anisopliae* é fundamental para o desenvolvimento de eficazes programas de biocontrole de carrapatos a campo.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS BRASILEIROS DE *Metarhizium anisopliae* s.l.

RESUMO

Metarhizium anisopliae é um fungo cosmopolita, isolado a partir de uma grande variedade de habitats, localizações geográficas e hospedeiros. Diferenças na patogenicidade, aliadas as características descritas acima, indicam que naturalmente ocorre variação genética. A identificação precisa dos isolados de *Metarhizium* spp. é pré-requisito para o registro e patente dos biopesticidas comerciais, garantindo a liberação de fungos entomopatogênicos no ambiente de forma segura e de fácil monitoramento. Devido a isso, o objetivo deste estudo foi a caracterização molecular de 27 isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l., originários de diferentes regiões geográficas, hospedeiros ou substratos, através da análise da sua variabilidade genética. Os isolados foram caracterizados pela análise de RFLP-PCR e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA. No presente estudo não foi observado um padrão de especificidade para o agrupamento entre isolados oriundos de mesma região, hospedeiro ou substrato. Foi observada baixa variabilidade genética entre os isolados que basicamente se agruparam em dois grupos. O isolado CG 344 mostrou-se geneticamente distante de todos os outros isolados brasileiros estudados, tanto na análise por RFLP-PCR quanto no sequenciamento, mas de acordo com a comparação com as sequências de ITS do rDNA recuperadas do “GenBank”, este isolado mostrou-se relacionado ao gênero *Metarhizium*, porém ao contrário dos demais isolados, esse parece ser geneticamente distante das espécies *M. anisopliae* s.l., *M. robertsii* e *M. brunneum*. Desta forma, a utilização de ferramentas moleculares é cada vez mais importante para identificação e caracterização desses isolados, objetivando garantir a qualidade do produto, o sucesso de sua aplicação e o monitoramento de um isolado introduzido no ambiente com finalidade de controle biológico.

Palavras-Chave: RFLP-PCR; sequenciamento; variabilidade genética; fungos entomopatogênicos.

ABSTRACT

Metarhizium anisopliae is a cosmopolitan fungus isolated from a variety of different habitats, geographic regions and hosts. These characteristics associated to differences in pathogenicity indicate that the genetic variation occurs naturally. The accurate identification of *Metarhizium* spp. isolates is a prerequisite for biopesticides registration and patent trade, allowing the secure release of entomopathogenic fungi in the environment and its easy monitoring. Therefore, this study aimed to characterizing molecularly 27 *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates, from different geographical regions, hosts or substrates, and analyzing their genetic variability. The isolates were characterized by PCR-RFLP analysis and ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequencing. No specificity pattern was observed when isolates from the same region, host or substrate were clustered. Low genetic variability was observed among isolates, which were basically separated into two groups. The CG 344 isolate was shown to be genetically distant from the other Brazilian isolates studied, both in PCR-RFLP and in sequencing analysis. However, according to comparisons with “GenBank” rDNA ITS sequences, this isolate was related to *Metarhizium* genus, but still different from the other isolates. CG 344 it appears to be genetically distant from *M. anisopliae* s.l., *M. robertsii* and *M. brunneum* species. In conclusion, molecular tools are increasingly important for identification and characterization of fungal isolates, ensuring the product quality, and success application and the environmental track of the fungi in field biological control programs.

Key words: RFLP-PCR; sequencing; genetic variation; entomopathogenic fungi.

1 INTRODUÇÃO

A identificação de isolados de *Metarhizium* baseia-se tradicionalmente na análise das características morfológicas das colônias cultivadas em meios artificiais e na análise microscópica de conídios e outras estruturas (BRIDGE et al., 1997), porém o potencial limitado do método de análise das características morfológicas utilizadas na distinção entre espécies de *Metarhizium* tem sido sistematicamente demonstrado quando as metodologias moleculares são empregadas para avaliação da variabilidade genética inter e intraespecíficas. Assim sendo, os critérios morfológicos utilizados para classificação taxonômica tem sido complementados com novas ferramentas (DRIVER et al., 2000; BISCHOFF et al., 2009, FERNANDES et al., 2010).

Métodos baseados na análise de DNA possibilitam a distinção entre linhagens estritamente relacionadas. As abordagens moleculares para detecção de polimorfismos em fungos têm adicionado valiosas informações acerca da diversidade desses organismos. A genotipagem das linhagens permite estabelecer uma correlação entre genótipos e as características de interesse, como por exemplo, a patogenicidade, informação relevante ao controle microbiano de artrópodes, facilitando e enriquecendo os estudos biológicos dos fungos entomopatogênicos (DRIVER et al., 2000; ENKERLI et al., 2005).

Metarhizium anisopliae s.l. é o agente biocontrolador mais pesquisado nas condições climáticas brasileiras, devido a sua variabilidade genética natural que resulta no surgimento de muitas linhagens com diferentes níveis de virulência, especificidade, produção de conídios, resistência a radiação UV e termotolerância (ALVES, 1998; MENDONÇA, 2005).

Para seleção de genótipos eficazes na utilização em programas de biocontrole e para a compreensão dos fatores moduladores de epizootias, é de relevante importância o conhecimento da população genética presente no ecossistema (INGLIS et al., 2008). A persistência e o impacto de linhagens do fungo introduzidas no meio ambiente, incluindo seus efeitos sobre hospedeiros não alvos, são fatores de grande importância e preocupação. Sendo necessário, inclusive para o registro oficial de produtos biológicos, um eficiente monitoramento das variações genéticas entre os isolados e suas capacidades de distribuição, persistência e permuta gênica (WANG et al., 2005). Permitindo assim que os fungos com ação entomopatogênica e acaricida possam ser liberados no ambiente e monitorados com segurança (HEGEDUS; KHACHATOURIANS, 1996).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi a caracterização molecular de 27 isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l., originários de diferentes regiões geográficas, hospedeiros ou substratos, através da análise da variabilidade genética dos isolados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização

O estudo foi iniciado no Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no Rio de Janeiro e posteriormente conduzido no Laboratório de Hemoparasitas e vetores localizado na Estação para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de

Janeiro (UFRRJ), localizada no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro. No período de junho de 2011 a março de 2012.

2.2 Origem dos isolados

Os isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l estudados foram provenientes das coleções de culturas de fungos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e do Instituto Biológico de São Paulo, originários de diferentes regiões geográficas e hospedeiros ou substratos. Foi utilizado como “outgroup” um isolado de *Beauveria bassiana*, cedido pelo Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. e *Beauveria bassiana* com seus respectivos hospedeiros ou substrato e origens.

Isolado	Hospedeiro/Substrato	Local
CG 32	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Bahia
CG 37	Solo	Tocantins
CG 49	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera: Cercopidae)	Planaltina - DF
CG 87	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Flexeiras - AL
CG 112	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera: Cercopidae)	Planaltina - DF
IBCB 116	Solo	Contagem - MG
CG 148	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera: Cercopidae)	Goiânia - GO
CG 153	<i>Deois incompleta</i> (Homoptera: Cercopidae)	Altamira - PA
IBCB 167	Solo	Cascavel - PR
CG 191	Solo	Pelotas - RS
CG 312	Solo	Marilândia do Sul - PR
CG 344	Solo	Mauá - PR
CG 347	Solo	Minaçu - GO
IBCB 353	<i>Mahanarva fimbriolata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Valparaíso - SP
IBCB 383	<i>Mahanarva fimbriolata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Água Branca - SP
IBCB 384	<i>Mahanarva fimbriolata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Sertãozinho - SP
IBCB 410	Lepitoptera	Petar-Iporanga - SP
CG 420	Hymenoptera	João Pessoa - PB
IBCB 481	Solo	Campinas - SP
CG 489	Solo	Campinas - SP
CG 578	<i>Zulia entreariana</i> (Homoptera: Cercopidae)	Fátima - TO
CG 579	<i>Zulia entreariana</i> (Homoptera: Cercopidae)	Figueirópolis - TO
CG 580	<i>Zulia entreariana</i> (Homoptera: Cercopidae)	Araguaura - TO
CG 626	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Rio Largo - AL
CG 627	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Murici - AL
CG 628	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Porto Calvo - AL
CG629	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Marechal Deodoro - AL
ESALQ 986*	<i>Rhipicephalus microplus</i> (Acari: Ixodidae)	Piracicaba - SP

CG=isolados provenientes da coleção de fungos de invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;

IBCCB=isolados provenientes da coleção de fungos entomopatogênicos do Instituto Biológico;

*Isolado de *Beauveria bassiana* utilizado como “outgroup”.

2.3 Extração de DNA

Os conídios foram removidos de culturas crescidas em meio BDA (Batata, dextrose e ágar-Himedia) e suspensos em frascos Erlenmeyers contendo 50 mL de meio de cultura Sabouraud dextrose (10g de neopeptona-Vetec, 40g de dextrose-Vetec, 1000 mL de água destilada) acrescido de 1% de extrato de levedura (Biobrás), segundo Inglis et al. (2008). As culturas foram mantidas sob condições de agitação a 150 oscilações por minuto, a 25°C, durante três dias. Posteriormente os micélios foram centrifugados. Este processo ocorreu completando-se o tubo tipo falcon com solução PBS 1 x estéril (8 g de NaCl, 1,15 g de Na₂HPO₄, 0,2 g de KCl, 0,2 g de KH₂PO₄ e 1000 mL de água destilada, pH=7,4) e centrifugando os isolados por cinco minutos a 10.000 rpm, por três vezes, até que finalmente fosse recolhida a massa micelial. Os micélios foram então liofilizados e armazenados em tubos tipo falcon a temperatura de -20°C.

Na etapa seguinte, o micélio de cada isolado foi congelado em nitrogênio líquido e macerado com auxílio de grau e pistilo, sendo então transferido aproximadamente 70 mg de micélio macerado para um microtubo de 1,5 mL. O DNA genômico foi extraído usando DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen Sciences), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Posteriormente as amostras foram quantificadas por espectrofotometria em NanoDrop[®] 2000 (Thermo Scientific) e diluído para solução estoque na concentração de 15 ng/μL.

2.4 Amplificação do DNA por PCR

Os “primers” utilizados para amplificação da região intergênica (ITS) do rDNA foram sintetizados pela Invitrogen e encontram-se listados na tabela 2. Ambos foram suspensos em água ultrapura (Invitrogen) a concentração final de 100 μM. As soluções estoque de cada “primer” foram preparadas nas concentrações de 10 μM.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador modelo Eppendorf Mastercycler[®] pro S, em volumes de 25μL, contendo: 2,5 μL de tampão de reação 10 x, 0,2 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 0,2 μM de cada “primer” e 1 U de Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 45 ng de DNA e água ultrapura (Invitrogen) para completar o volume da reação.

O programa de amplificação foi constituído por um ciclo de desnaturação inicial a 95°C/5 minutos; seguido de 10 ciclos de 95°C/30 segundos; variação da temperatura de 62-58°C/30 segundos (redução de 0,5°C/ciclo); 72°C/50 segundos, seguido de 35 ciclos a 95°C/30 segundos; 58°C/30 segundos; 72°C/50 segundos e um ciclo correspondente a etapa de extensão final de 72°C/10 minutos.

Foram utilizados 10 μL dos produtos obtidos acrescidos de 2 μL de tampão de amostra 6 x (Fermentas), estes foram submetidos a eletroforese a 100 V em gel de agarose a 1%, usando tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1 x e marcador de peso molecular de 100 pb DNA ladder (Invitrogen). Ao término da corrida, os géis foram corados com brometo de etídeo, visualizados em fonte de luz UV e registrados pelo sistema de fotodocumentação (L. Pix Touch[®]-Loccus Biotecnologia).

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) utilizados no estudo.

<i>Primer</i>	<i>Seqüência (5’ para 3’)</i>	<i>pb</i>	<i>Referência</i>
ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19	White et al., 1990
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	White et al., 1990

pb=número de pares de base

2.5 Digestão dos produtos de PCR por enzimas de restrição (RFLP-PCR)

Os fragmentos amplificados da região ITS foram digeridos, de acordo com o protocolo do fabricante, pelas seguintes enzimas de restrição: *AluI* (Promega), *DdeI* (Promega), *HaeIII* (Sigma), *HpaII* (Fermentas) e *Sau3AI* (Promega). Foram utilizados 8 µL dos produtos de PCR (~ 400 ng) em reações de 20 µL, utilizando-se 5 U de enzima por reação (Anexos).

Os perfis de restrição obtidos foram observados através de eletroforese a 100 V em gel de agarose a 3% usando tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1 x e marcador de peso molecular de 50 pb DNA ladder (Ludwig Biotec). Ao término da corrida, os géis foram corados com brometo de etídeo, visualizados em fonte de luz UV e registrados pelo sistema de fotodocumentação.

2.6 Análise dos perfis obtidos por RFLP-PCR

Os perfis obtidos através da técnica de RFLP-PCR da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foram analisados através do sistema binário de bandas presentes (1) ou ausentes (0) para cada isolado testado. Uma matriz de similaridade foi gerada utilizando-se o Coeficiente SM (“Simple Matching”) pelo programa NTSYS-PC versão 2.1 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System). Essas matrizes foram transformadas em dendrogramas pelo método não ponderado de agrupamento aos pares (UPGMA-unweighted pair-group method with arithmetic mean) (SNEATH; SOKAL, 1973) pelo programa NTSYS-PC versão 2.1.

2.7 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de amplificação região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foram purificados utilizando-se o kit Wizard[®]SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, para posterior sequenciamento. Ao término da etapa de purificação, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria em NanoDrop[®] 2000 (Thermo Scientific) e os produtos purificados foram submetidos a eletroforese a 100 V em gel de agarose a 2% usando tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1 x e marcador de massa Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). Ao término da corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo, visualizado em fonte de luz UV e registrado pelo sistema de fotodocumentação.

2.8 Sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA

As amostras purificadas para sequenciamento foram enviadas ao setor de sequenciamento do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, de acordo com as recomendações disponibilizadas no endereço eletrônico <http://genoma.ib.usp.br/?pageid=979>. Os “primers” utilizados foram os mesmos da reação de PCR. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando-se o BigDye[®] Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit, através do sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems).

Os cromatogramas obtidos foram editados pelo programa DNA Base v.3. As sequências foram alinhadas pelo método de alinhamento progressivo Clustal W e um dendrograma foi construído utilizando-se o algoritmo baseado no método de “Neighbour-joining”, através do método de comparação de nucleotídeos de Jukes-Cantor e analisadas pelo método de bootstrap com 1000 replicações, para isso utilizou-se o programa Mega 5.0 (KUMAR et al., 2004).

Posteriormente, um novo dendrograma foi construído com o objetivo de comparar a sequências deste estudo com sequências correspondentes a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA,

de isolados de *M. anisopliae* (isolado Sag14-1=AB524435 e isolado CNYN2=FJ545305), *M. robertsii*. (isolado ARSEF2575=FJ317317 e isolado ARSEF727=FJ617321), *M. guizhouense*. (isolado M-CGAC2702-1=JN180461 e isolado M-CGAC2702-2=JN180462), *M. acridum* (isolado ARSEF3609C3=FJ617342 e ARSEF3609C1=FJ617339), *M. lepidiotae* (isolado Kgs8-1=AB524441 e isolado Yks4-2=AB524439), *M. brunneum* (isolado ARSEF5626=FJ617325 e isolado ARSEF1095= FJ617318), *M. majus* (isolado CG27=EF051714 e isolado ARSEF1946=HQ331443) e *M. flavoviride* (HM583833) recuperadas da base de dados “GenBank” (2012). Os números de acesso encontram-se entre parênteses. A metodologia de edição, alinhamento e construção do dendrograma foi a mesma descrita anteriormente.

3 RESULTADOS

3.1 Análise de RFLP-PCR da região ITS1-5.8S-ITS2

A região ITS foi analisada com o objetivo de se evidenciar a variabilidade genética entre os isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. estudados. A amplificação com o par de “primers” ITS1 e ITS4 resultou num fragmento de aproximadamente 600 pb. Os perfis de restrição obtidos no RFLP-PCR dos diferentes isolados, expostos nas figuras 1, 2, 3, 4 e 5, foram analisados para construção de uma matriz de similaridade através do coeficiente de concordância simples. A análise de RFLP-PCR permitiu a detecção de polimorfismo entre os isolados fúngicos testados. O dendrograma obtido revelou cinco grupos distintos (Figura 6). O primeiro grupo apresentou 100% de similaridade entre si e foi formado pelos isolados CG 49, CG 87, CG 112, IBCB 167, CG 312, CG 383, IBCB 410, CG 420, CG 489, CG 578, CG 579, CG 669, o segundo compreendeu os isolados CG 37, IBCB 116, CG 148, CG 153, CG 191, CG 347, IBCB 384, CG 580, CG 627, com 100% de similaridade entre si e aproximadamente 87% de similaridade com o grupo I. O terceiro grupo foi representado pelo isolado CG 344, com aproximadamente 72% de similaridade com os dois primeiros grupos. O quarto grupo pelo isolado IBCB 353, com aproximadamente 70% de similaridade com os grupos anteriores e o quinto grupo foi composto pelos isolados IBCB 481 e CG 626, com aproximadamente 81% de similaridade entre si e 44% de similaridade com os demais grupos. O isolado ESALQ 986 foi utilizado como “outgroup”, apresentando apenas 34% de similaridade com os demais grupos de *M. anisopliae* s.l. analisados.

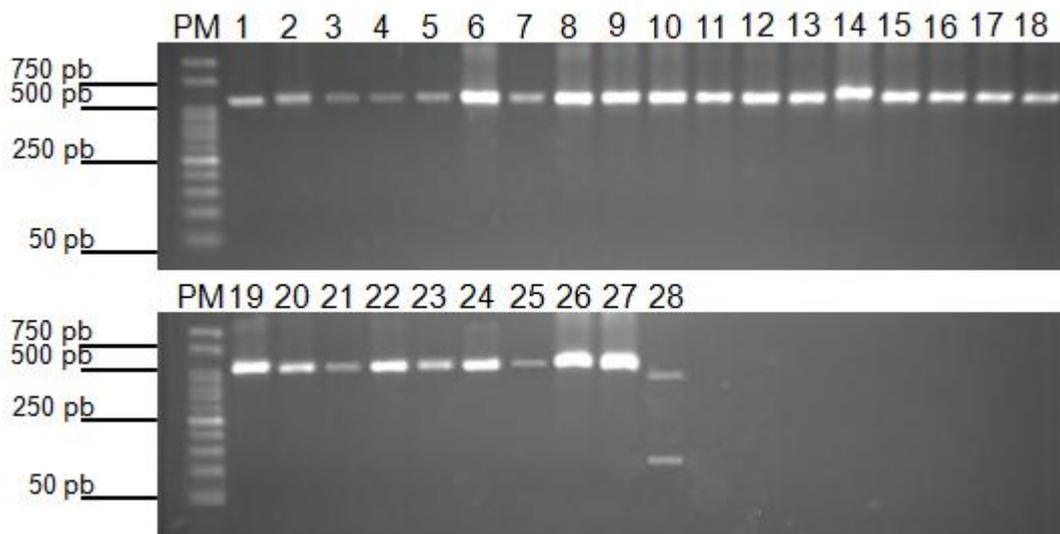


Figura 1. Digestão da região ITS1-5.8S-ITS2 pela enzima de restrição *AluI*. PM=Marcador de peso molecular de 50pb (Ludwig Biotec). (1)=CG 629; (2)=IBCB 353; (3) CG 489; (4)=IBCB 384; (5)=CG 148; (6)=CG 312; (7)=IBCB 167; (8)=CG 668; (9)= CG 191; (10)=CG 49; (11)=CG 627; (12)=CG 580; (13)=IBCB 116; (14)=CG 626; (15)=CG 37; (16)=CG 347; (17)=CG 87; (18)= CG 420; (19)= CG 153; (20)= CG 112; (21)=CG 32; (22)=CG 579, (23)=IBCB 481; (24)=CG 578; (25)= IBCB 383; (26)=CG 344; (27)= IBCB 410; (28)= ESALQ 986 (“outgroup”).

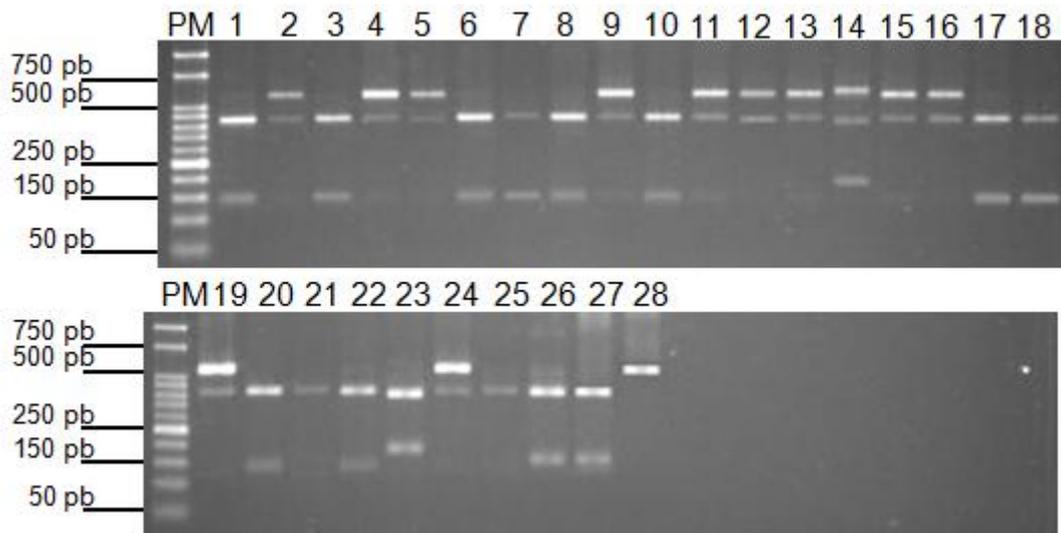


Figura 2. Digestão da região ITS1-5.8S-ITS2 pela enzima de restrição *DdeI*. PM=marcador de peso molecular de 50pb (Ludwig Biotec). (1)=CG 629; (2)=IBCB 353; (3) CG 489; (4)=IBCB 384; (5)=CG 148; (6)=CG 312; (7)=IBCB 167; (8)=CG 668; (9)= CG 191; (10)=CG 49; (11)= CG 627; (12)=CG 580; (13)=IBCB 116; (14)=CG 626; (15)=CG 37; (16)=CG 347; (17)=CG 87; (18)= CG 420; (19)= CG 153; (20)= CG 112; (21)=CG 32; (22)=CG 579, (23)=IBCB 481; (24)= CG 578; (25)= IBCB 383; (26)=CG 344; (27)= IBCB 410; (28)= ESALQ 986 (“outgroup”).

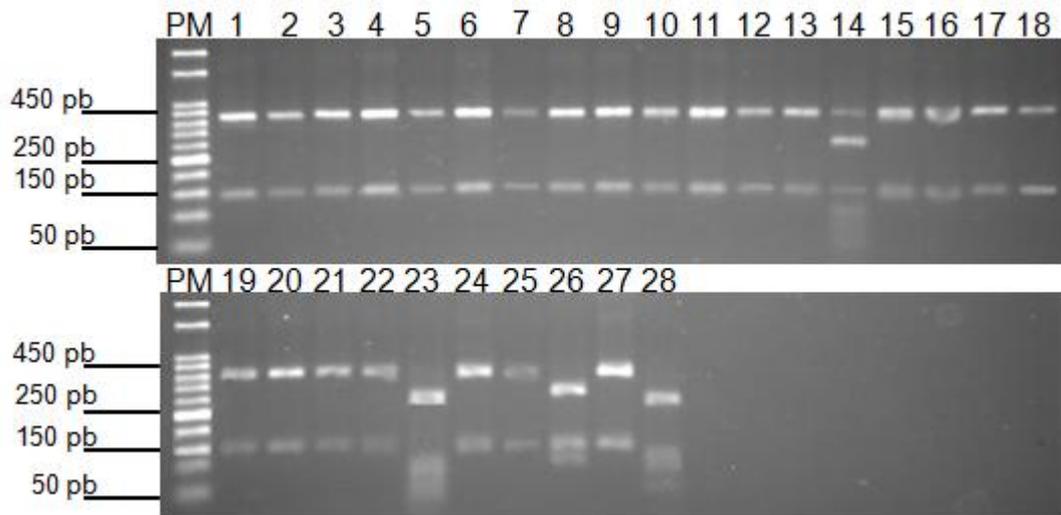


Figura 3. Digestão da região ITS1-5.8S-ITS2 pela enzima de restrição *HaeIII*. PM=marcador de peso molecular de 50pb (Ludwig Biotec). (1)=CG 629; (2)=IBCB 353; (3) CG 489; (4)=IBCB 384; (5)=CG 148; (6)=CG 312; (7)=IBCB 167; (8)=CG 668; (9)= CG 191; (10)=CG 49; (11)= CG 627; (12)=CG 580; (13)=IBCB 116; (14)=CG 626; (15)=CG 37; (16)=CG 347; (17)=CG 87; (18)= CG 420; (19)= CG 153; (20)= CG 112; (21)=CG 32; (22)=CG 579, (23)=IBCB 481; (24)= CG 578; (25)= IBCB 383; (26)=CG 344; (27)= IBCB 410; (28)= ESALQ 986 (“outgroup”).

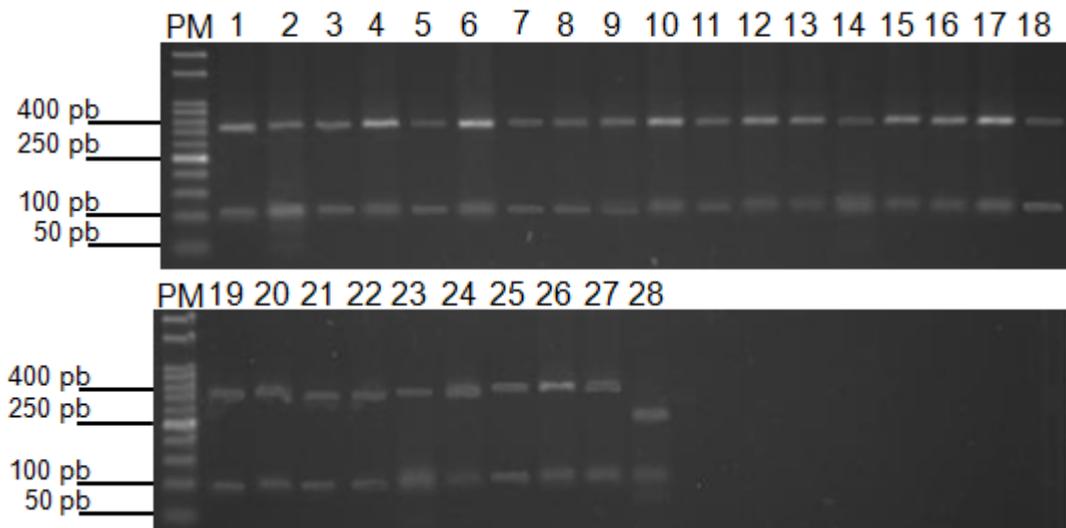


Figura 4. Digestão da região ITS1-5.8S-ITS2 pela enzima de restrição *HpaII*. PM=marcador de peso molecular de 50pb (Ludwig Biotec). (1)=CG 629; (2)=IBCB 353; (3) CG 489; (4)=IBCB 384; (5)=CG 148; (6)=CG 312; (7)=IBCB 167; (8)=CG 668; (9)= CG 191; (10)=CG 49; (11)= CG 627; (12)=CG 580; (13)=IBCB 116; (14)=CG 626; (15)=CG 37; (16)=CG 347; (17)=CG 87; (18)= CG 420; (19)= CG 153; (20)= CG 112; (21)=CG 32; (22)=CG 579, (23)=IBCB 481; (24)= CG 578; (25)= IBCB 383; (26)=CG 344; (27)= IBCB 410; (28)= ESALQ 986 (“outgroup”).

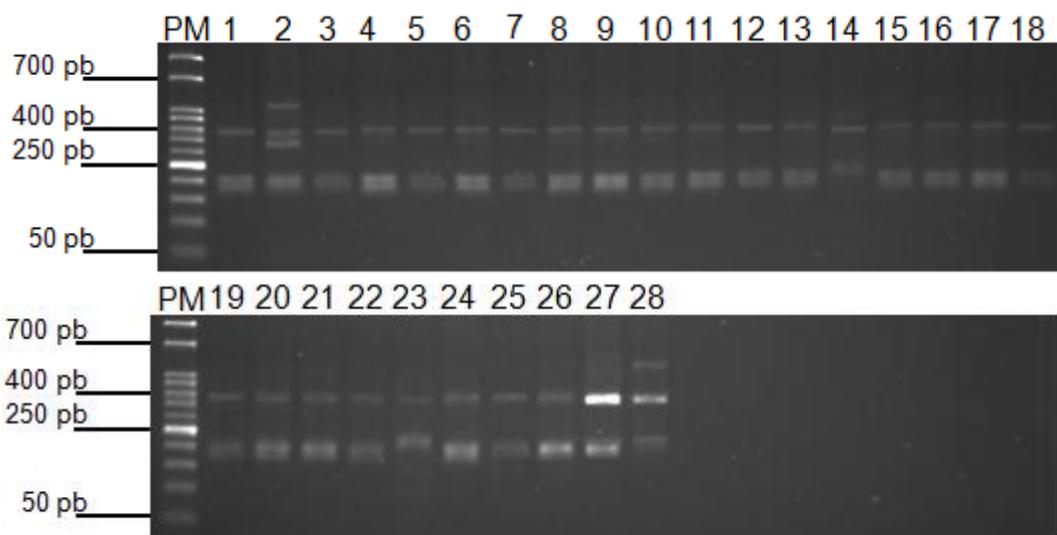


Figura 5. Digestão da região ITS1-5.8S-ITS2 pela enzima de restrição *Sau3AI*. (PM)=marcador de peso molecular de 50pb (Ludwig Biotec®); (1)=CG 629; (2)=IBCB 353; (3) CG 489; (4)=IBCB 384; (5)=CG 148; (6)=CG 312; (7)=IBCB 167; (8)=CG 668; (9)= CG 191; (10)=CG 49; (11)= CG 627; (12)=CG 580; (13)=IBCB 116; (14)=CG 626; (15)=CG 37; (16)=CG 347; (17)=CG 87; (18)= CG 420; (19)= CG 153; (20)= CG 112; (21)=CG 32; (22)=CG 579, (23)=IBCB 481; (24)= CG 578; (25)= IBCB (383; (26)=CG 344; (27)= IBCB 410; (28)= ESALQ 986 (“outgroup”).

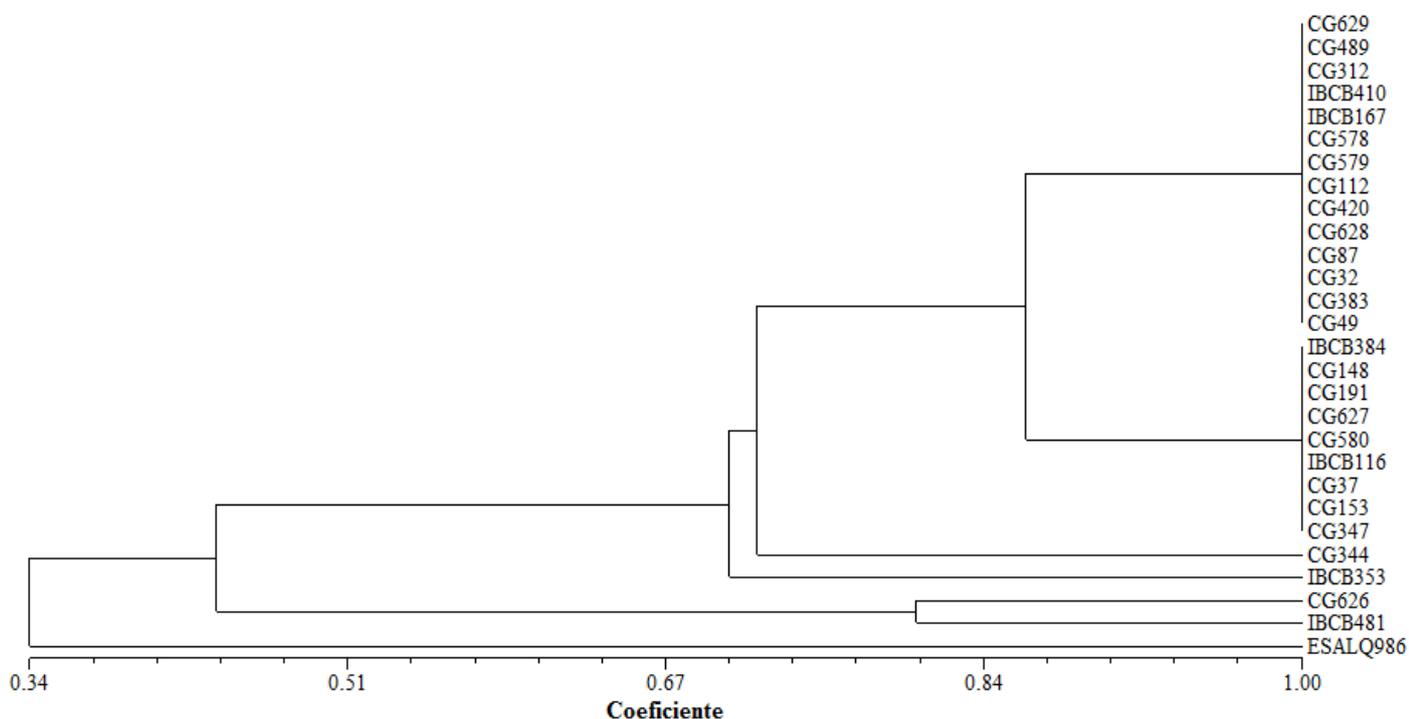


Figura 6. Dendrograma baseado nos perfis de restrição pela análise de RFLP-PCR de 27 isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. utilizando-se o coeficiente SM (“Simple Matching”) e o algoritmo de agrupamento UPGMA. O isolado ESALQ 986-*Beauveria bassiana* foi utilizado como “outgroup”.

3.2 Sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l.

Nesta etapa, os isolados CG 32, CG 87, CG 347, IBCB 353, IBCB 383 e CG 626 foram excluídos, pois após três tentativas continuaram a mostrar falhas no sequenciamento. As sequências correspondentes a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA dos isolados do presente estudo foram inicialmente comparadas entre si e posteriormente comparadas com sequências desta mesma região de diferentes espécies de *Metarhizium* depositadas na base de dados “GenBank”.

O dendrograma gerado mostrou que os isolados agruparam-se em dois grandes grupos. O primeiro grupo foi formado pela maior parte dos isolados (CG 37, CG 112, IBCB 116, CG 148, CG 153, CG 312, IBCB 384, CG 578, CG 579, CG 580, CG 627, CG 628 e CG 629), que mostraram grande proximidade entre si, com exceção dos isolados CG 49 e CG 420 que se mantiveram mais afastados. Um grupo menor também foi revelado, com os isolados IBCB 167, CG 191, IBCB 410, IBCB 481 e CG 489, se mostrando geneticamente próximos, os demais isolados não se agruparam a nenhum outro isolado, permanecendo afastados e caracterizando polimorfismo genético (Figura 7). A maior parte dos isolados utilizados neste estudo agruparam-se, mantendo proximidade com as sequências do “GenBank” (Figura 8) de *M. robertsii*. e *M. anisopliae*. Já os isolados IBCB 481, IBCB 410, IBCB 167, CG 191 se agruparam próximo as sequências de *M. brunneum* recuperadas do banco de dados. Os isolados CG 344, CG 420 e CG 489 não se agruparam com outros isolados, embora estes últimos tenham suas sequências mais próximas aos isolados estudados do que a do isolado CG 344 que se manteve extremamente afastado dos mesmos, tanto na análise por RFLP-PCR quanto no sequenciamento.

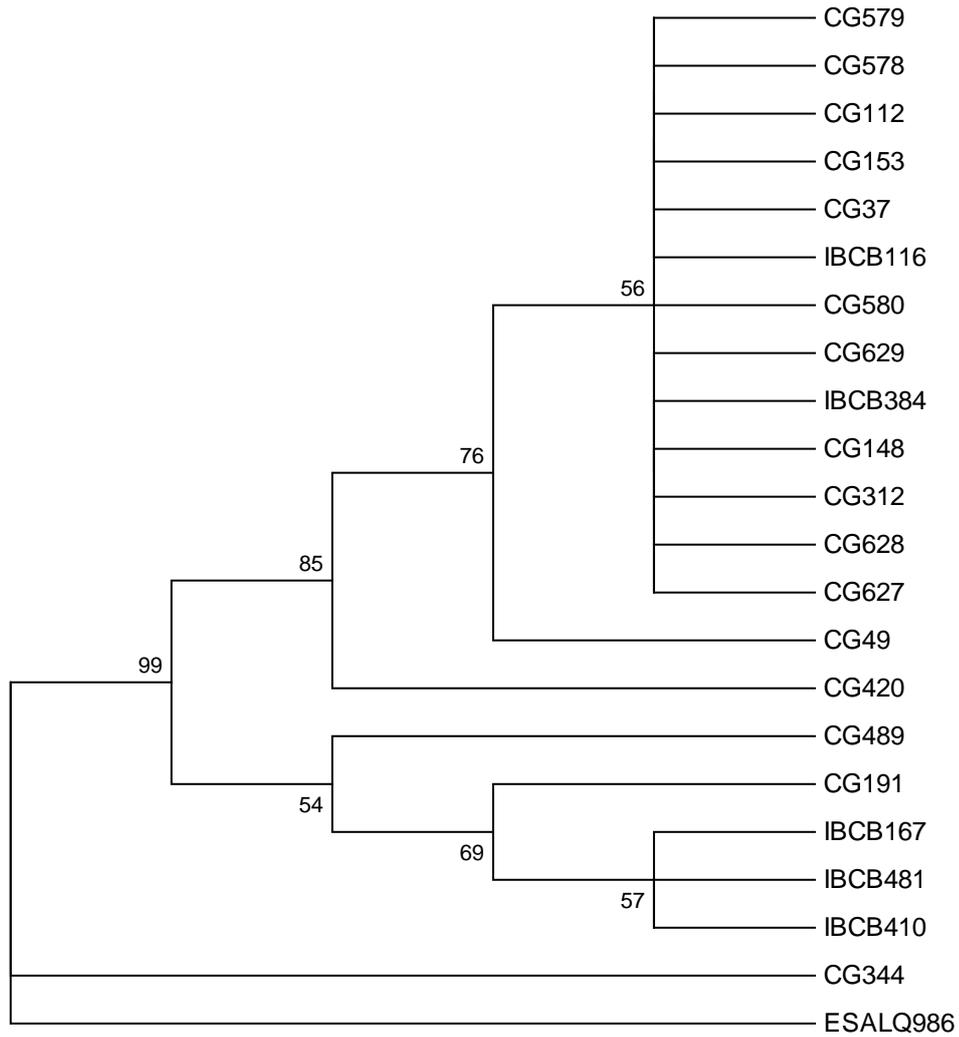


Figura 7. Dendrograma de “Neighbour-joining” dos dados do sequenciamento da região ITS do rDNA de 21 isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. gerado através do método de “Jukes-Cantor” e análise de “bootstrap” com 1000 replicações. O isolado ESALQ 986-*Beauveria bassiana* foi utilizado como “outgroup”.

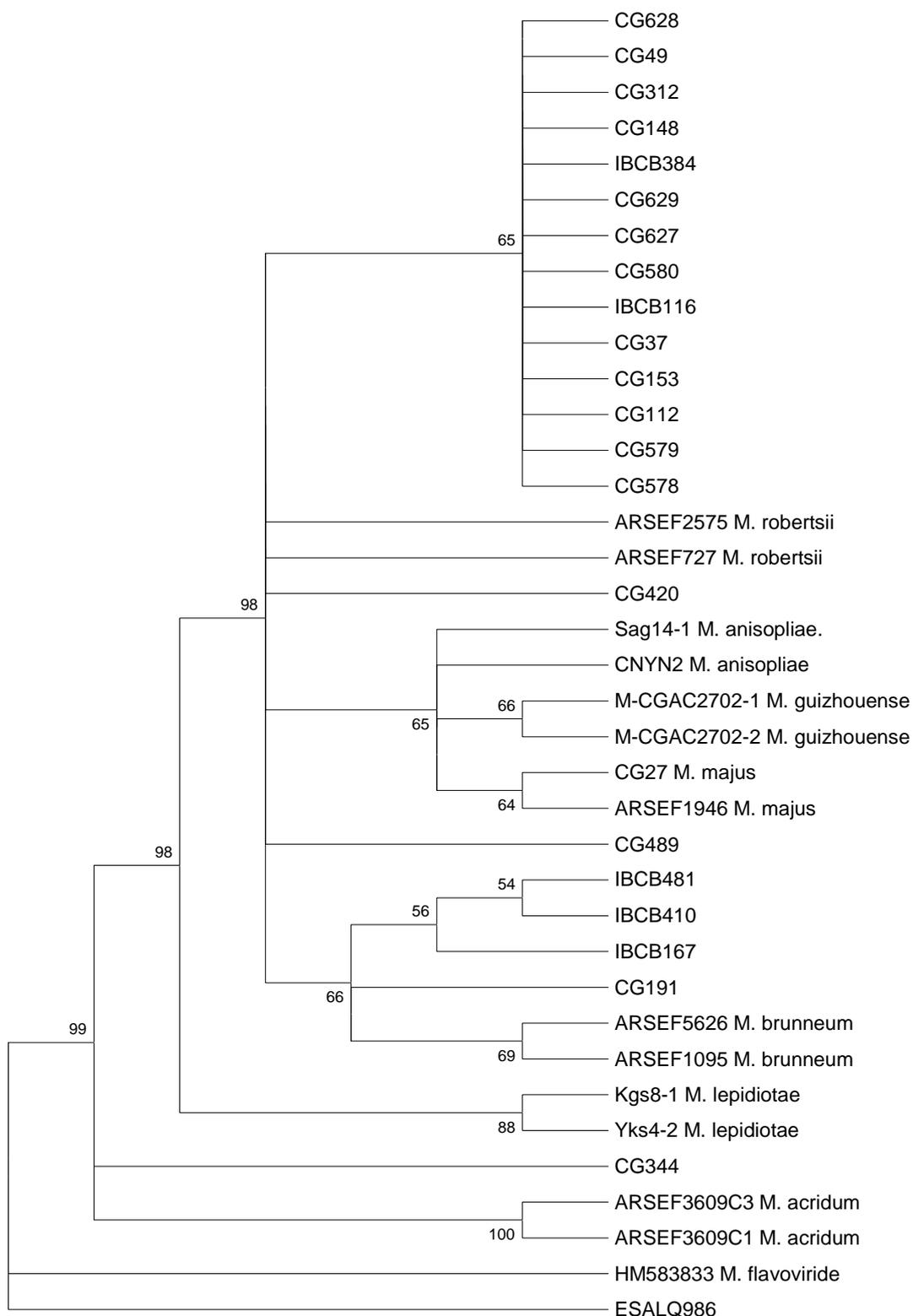


Figura 8. Dendrograma de “Neighbour-joining” obtido através dos dados de sequenciamento da região ITS do rDNA de 21 isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. e de 15 seqüências de *Metarhizium* spp. obtidas do “GenBank” gerado através do método de “Jukes-Cantor” e análise de “bootstrap” com 1000 replicações O isolado ESALQ 986-*Beauveria bassiana* foi utilizado como “outgroup”.

4 DISCUSSÃO

Metarhizium anisopliae s.l. é um fungo cosmopolita e tem sido isolado de uma variedade de habitats e diversas regiões geográficas (ST. LEGER et al., 1992). Ferramentas moleculares têm sido utilizadas para analisar variações inter e intraespecíficas em várias espécies de fungos (ENKERLI et al., 2009). A amplificação de genes ribossomais e regiões espaçadoras ITS e IGS vêm sendo amplamente utilizadas em estudos de taxonomia e de diversidade genética (FOULEY et al., 1997; DRIVER et al., 2000; ANDERSON et al., 2001; FERNANDES et al., 2010; TANGTHIRASUNUM et al., 2010; FREED et al., 2011).

Tigano-Milani et al. (1995) em estudos sobre variabilidade genética de isolados brasileiros de *M. anisopliae*, observaram que o genótipo de um isolado parece estar mais associado com o hospedeiro ou substrato do que com a região geográfica de origem, relatando que o solo apresentou isolados com grande variabilidade genética em uma área específica. Da mesma forma, Fungaro et al. (1996), através da técnica de RAPD observaram que a diversidade entre os isolados de *M. anisopliae* s.l. obtidos de *Deois flavopicta* foi menor do que aquela encontrada entre isolados provenientes do solo. Inglis et al. (2008), ao analisarem a diversidade genética de isolados de *M. anisopliae* s.l. de amostras de solo do sudoeste da cidade de British Columbia, no Canadá, relataram que dos 25 isolados examinados, foram identificados 21 genótipos diferentes e que surpreendentemente, os quatro isolados que apresentavam genótipos clonais foram recuperados de locais diferentes.

No presente estudo não foi observado um padrão de especificidade para o agrupamento entre isolados oriundos de mesma região ou hospedeiro/substrato. Os isolados CG 312, CG 578 e CG 629, por exemplo, embora apresentem distintos hospedeiros/substratos e sejam de regiões geográficas distintas, foram agrupados juntos tanto na análise de RFLP-PCR quanto no sequenciamento. Esta mesma constatação foi feita por Driver et al. (2000) ao analisarem isolados de *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *M. album*. Fegan et al. (1993) analisando a variabilidade genética de *M. anisopliae* s.l. de diferentes regiões e hospedeiros, concluíram que não se pode fazer associações entre isolados de *M. anisopliae* e seu local de origem ou hospedeiro. Enkerli et al. (2009) através de análises de RFLP-PCR de isolados de *M. anisopliae* s.l. também observaram polimorfismo entre isolados originários das mesmas regiões geográficas do mundo.

Foi observada variabilidade genética entre os 21 isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. estudados, com os isolados basicamente se agrupando em dois grupos. Fungos com reprodução assexuada possuem menor variabilidade genética quando comparados a microrganismos que se reproduzem sexuadamente, devido à ausência de recombinação genética, com exceção dos casos onde a hibridização somática ou ciclo parassexual compense essa ausência. O modo de reprodução clonal limita os microrganismos de reprodução assexuada a ter apenas mutações como mecanismo de variação genética. Porém a ampla distribuição e a vasta gama de hospedeiros de algumas espécies de fungos entomopatogênicos sugerem que a despeito da reprodução ser assexuada, existe considerável variabilidade genética entre essas espécies (CASTRILLO; BROOKS, 1998). O fungo entomopatogênico *M. anisopliae* trata-se de um microrganismo haplóide, mitospórico, sem estágio teleomórfico ainda conhecido (DRIVER et al., 2000), embora já tenha sido descrita a forma sexuada das espécies *M. guizhouense* e *M. majus*, como *Cordyceps taii* e *C. brittlebankisoides*, respectivamente (LIANG et al., 1991; LIU et al., 2002). Mecanismos de reprodução parassexuada têm sido reportados para este fungo, mas as evidências indicam que o processo de anastomose das hifas ocorre apenas entre isolados estritamente relacionados (ST. LEGER et al., 1992; BIDOCHKA et al., 2000; LEAL et al., 2000). A variabilidade intra-específica detectada nesta espécie provavelmente é resultante de recombinação mitótica, mutação ou

elementos extranucleares, enquanto isso, outras linhagens permanecem inalteradas (ST LEGER et al., 1992).

O isolado CG 344 mostrou-se geneticamente distante de todos os outros isolados brasileiros estudados, tanto na análise por RFLP-PCR quanto no sequenciamento, mas de acordo com a comparação com sequências recuperadas do “GenBank” mostrou-se relacionado ao gênero *Metarhizium*, porém ao contrário dos demais isolados, este parece ser geneticamente distante das espécies *M. anisopliae* s.l., *M. robertsii* s.l. e *M. brunneum* s.l. Esta variação pode ser devido ao fato deste isolado não ter passado por sucessivos processos de cultivo ao longo dos anos em diferentes meios artificiais ou preservado por diferentes métodos, o que possivelmente contribuiu com a pequena variabilidade genética observada. Sucessivos cultivos em meios artificiais do mesmo isolado vêm sendo relacionados ao processo de envelhecimento da colônia (CAMOUGRAND et al., 2004), com alterações morfológicas e moleculares (WANG et al., 2005) capazes de gerar polimorfismo.

Através do sequenciamento da região ITS do rDNA dos isolados foi possível observar com maior clareza sua variabilidade genética, porém essa técnica é mais onerosa que a RFLP-PCR, onde deve-se atentar para a importância da escolha correta das enzimas de restrição, para que sejam escolhidas enzimas com maior probabilidade de atuarem em sítios de restrição presentes no fragmento amplificado que evidenciem o polimorfismo. Outro fator importante que deve ser levado em consideração é o fato de algumas enzimas de restrição cortarem fragmentos muito pequenos, em torno de 50 pb, ou tamanho similar, que dificultam a interpretação em géis de eletroforese, e que os mesmos sejam desconsiderados erroneamente na análise dos resultados (UENO; JORGE, 2002). A técnica de RFLP-PCR ainda é muito utilizada como parte inicial dos estudos filogenéticos de microorganismos, onde através desta técnica é possível agrupar todos os isolados e a partir destes grupos, escolher os mais representativos para que sejam submetidos ao sequenciamento, assim se obtém menos amostras para sequenciar e maior precisão nos resultados obtidos (SCHNABEL et al., 1999; DESTÉFANO, 2004).

Segundo Bischoff et al. (2009) o sequenciamento da região ITS forneceu pouco suporte para que a revisão taxonômica do gênero *Metarhizium* proposta por Drive et al. (2000) fosse melhor sucedida, relatando que este fato restringiu suas descrições. Em sua análise filogenética os autores identificaram e descreveram variedades para ambas as espécies analisadas (*M. anisopliae* e *M. flavoviride*). Dessa forma, restringiram a descrição de novas espécies para variedades devido ao caráter limitante da sequência analisada. A análise filogenética utilizada por Bischoff et al. (2006) demonstrou grande eficácia através da utilização de uma abordagem multigênica, pela análise de sequências quase completas dos genes EF-1 α , RPB1, RPB2 e β -tubulina, fornecendo ferramentas mais sensíveis e robustas para identificação das linhagens de *Metarhizium* spp. Porém, pode-se afirmar que análise da região ITS do rDNA dos isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. atendeu ao objetivo proposto pelo estudo, propiciando a determinação do polimorfismo genético destes isolados. No entanto, Bischoff et al. (2009) sugerem uma abordagem multigênica para identificação taxonômica deste gênero.

Estudos a níveis moleculares com fungos entomopatogênicos são de grande importância podendo ter aplicações práticas em programas de melhoramento genéticos destes fungos e tornando possível o acompanhamento individual de isolados em ensaios de competição a campo, permitindo a distinção entre os isolados pertencentes aos ensaios e os autóctones, propiciando a condução de estudos e tratamentos de forma mais precisa e segura (BRAGA et al., 1998).

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste estudo permitiram elaborar as seguintes conclusões:

- 1- Os isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. analisados neste estudo apresentaram características morfológicas compatíveis com a espécie e com aquelas descritas na literatura.
- 2- Foi observada variação na produção de conídios pelos diferentes isolados estudados, não sendo observada relação entre o diâmetro das colônias e o tamanho dos conídios no percentual de produção de conídios.
- 3- O presente estudo confirmou a ação letal dos isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. sobre larvas do carrapato *Rhipicephalus microplus*, com o percentual médio de mortalidade no 30º dia após tratamento diretamente proporcional a concentração de conídios nos tratamentos a que foram submetidas, logo, quanto maior a concentração de conídios a qual as larvas foram expostas, maior o percentual de mortalidade das mesmas.
- 4- Os isolados CG 37, IBCB 384 e IBCB 481 apresentaram os menores valores de CL₅₀ e CL₉₀, apresentando percentuais médios de mortalidade de 100% ao 20º dia após tratamento das larvas, podendo ser considerados como os isolados mais virulentos do estudo.
- 5- O isolado CG 628 apresentou os maiores valores de CL₅₀ e CL₉₀, $3,329 \times 10^9$ e $1,854 \times 10^{11}$, respectivamente, e percentual médio de mortalidade de 37,9 % ao 30º dia após tratamento, podendo ser considerado como o isolado menos virulento.
- 6- Nenhuma relação entre a origem dos isolados ou hospedeiros/substrato e seu potencial virulento foi observada no presente trabalho.
- 7- Tanto a análise de RFLP-PCR quanto o sequenciamento evidenciaram o polimorfismo existente entre isolados de *M. anisopliae* s.l. estudadas.
- 8- No presente estudo não foi observado um padrão de especificidade para o agrupamento entre isolados oriundos de mesma região geográfica, hospedeiro ou substrato.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos estudos têm demonstrado resultados satisfatórios, comprovando a virulência dos fungos entomopatogênicos em condições de laboratório, porém sua eficácia diminui consideravelmente quando são testados a campo. O desempenho de fungos entomopatogênicos é afetado por uma variedade de fatores ambientais, tais como temperatura, umidade, radiação solar, chuvas, ventos e o microclima no habitat em que o entomopatógeno vive, exercendo influência na variabilidade genética dos isolados fúngicos. Além disso, as diferenças na susceptibilidade de populações de carrapatos, além das condições fisiológicas e genéticas, também afetam a virulência do fungo. No entanto, os resultados obtidos neste estudo permitem eleger isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. para a pesquisa de programas de controle biológico do carrapato *Rhipicephalus microplus* e de outros artrópodes-praga em condições de campo.

Neste estudo, os isolados foram avaliados morfológicamente, quanto ao potencial de produção de conídios, quanto ao potencial virulento sobre larvas de *R. microplus* e caracterizados molecularmente.

Os isolados CG 37, IBCB 384 e IBCB 481 foram considerados como os mais virulentos para larvas de *R. microplus* e conseqüentemente como promissores agentes a serem utilizados em futuros estudos de biocontrole deste carrapato a campo. Considerando que apresentaram os maiores percentuais médios de mortalidade e os menores valores de CL₅₀ e CL₉₀. Os isolados CG 112, IBCB 116, CG 32, IBCB 410, CG 627 e CG 628, foram considerados como o isolado fúngico menos virulentos, com CG 628 apresentando percentuais médios de mortalidade inferiores a todos os isolados avaliados e os maiores valores de CL₅₀ e CL₉₀, não apresentando condições satisfatórias para atuarem como agentes de biocontrole desta espécie.

Todos os isolados fúngicos avaliados apresentaram características morfológicas compatíveis com as descritas para o gênero na literatura, com micélio hialino e septado, com conidióforos característicos ramificados do tipo fiáides, sobre os quais surgem conídios cilíndricos organizados em colunas. Os isolados pertencentes ao complexo *M. anisopliae* apresentam coloração branca em sua fase inicial, ficando normalmente amarela durante as fases iniciais de desenvolvimento dos conídios e verde quando os conídios encontram-se maduros (BISCHOFF et al., 2009). O potencial de produção de conídios não teve relação com o potencial virulento dos isolados analisados neste estudo, visto que os isolados CG 37 e IBCB 481, tidos como mais virulentos, apresentaram o mesmo potencial de produção de conídios que o isolado CG 628, menos virulento. Porém, a análise de produção de conídios é extremamente importante, uma vez que o uso promissor de fungos entomopatogênicos depende, dentre outras características, da produção eficaz e suficiente de conídios, essenciais para a produção de formulações a serem utilizadas em testes a campo.

Não foi evidenciada relação entre virulência e potencial de produção de conídios dos isolados brasileiros estudados, com sua origem geográfica e seus respectivos hospedeiros/substratos. Pois, isolados de uma mesma região do país apresentaram resultados distintos, mesmo tendo sido isolados de um hospedeiro/substrato comum. Como exemplos os isolados CG 87, CG 580, CG 626, CG 627, CG 628 e CG 629, todos originários da região Nordeste, mais especificamente do estado de Alagoas. Os isolados CG 87, CG 580, CG 626 e CG 629 apresentaram potenciais de virulência parecidos, podendo ser considerados como promissores agentes de controle biológico de *R. microplus*, ao contrário dos isolados CG 627

e CG 628, que apresentaram resultados pouco satisfatórios, sendo considerados como isolados pouco virulentos para esta espécie de carrapato. Neste contexto, também foi possível observar que os isolados CG 87 e CG 628 mesmo apresentando a mesma espécie hospedeira, *Mahanarva posticata*, apresentaram resultados totalmente distintos, conforme já descritos anteriormente. Também utilizando estes isolados como exemplo, foi possível observar que o potencial de produção de conídios variou bastante entre eles, com os isolados CG 87, CG 580 e CG 627 apresentando produção moderada de conídios e os isolados CG 626 e CG 629 com produção média superior a 15000×10^4 conídios. Ao analisarmos os isolados mais virulentos do estudo, CG 37, IBCB 481 e IBCB 384, também observamos este comportamento, embora tenham apresentado resultados semelhantes quanto ao potencial de virulência, estes isolados fúngicos são de diferentes regiões do país, hospedeiros/substratos. O isolado CG 37 foi isolado do solo da região Norte (TO), já os isolados IBCB 481 e IBCB 384 foram isolados da região Sudeste (SP), mas respectivamente do solo e do inseto *Mahanarva posticata*.

Não foi estabelecida relação evidente entre grupos genéticos, potencial de virulência, origem geográfica e hospedeiros/substratos, com grupamentos formados por isolados originários de diferentes regiões do país, hospedeiros/substratos. Embora os resultados não tenham permitido relacionar os dados com o habitat de origem dos isolados, hospedeiros/substratos, foi obtida uma série de informações importantes sobre a estrutura populacional de isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. Mesmo os isolados mais virulentos observados neste estudo, não estarão aptos a atuarem em programas de biocontrole a campo, até que se estabeleça uma formulação adequada destes isolados e uma estratégia de controle eficiente, que minimizem a ação dos raios UV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.E.M. de; BATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, p. 77-86, 2001.

ALMEIDA, M.B.; TORTELLI, F.P.; RIET-CORREA, B.; FERREIRA, J.L.M.; SOARES, M.P.; FARIAS, N.A.R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L. Tristeza parasitária bovina na região Sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 237-242, 2006.

ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

ALVES, S.B. Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 77-86, 1992.

ALVES, R.T.; FARIA, M.R. Situação atual de fungos entomopatogênicos no Brasil. (Parte I), 2003. Disponível: <www.clubedofazendeiro.com.br/Cietec/artigos/ArtigosTexto>. Acesso em: 18 agosto de 2008.

ANDERSON, I.C.; CHAMBERS, S.M.; CARNEY, C.G.J. ITS-RFLP and ITS sequence diversity in *Pisolithus* from central and eastern Australian sclerophyll forestes. **Mycological Research**, v. 11, p. 1304-1312, 2001.

ANDREOTI, R. **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil** – Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 1 edição, 2010. 36p.

ANGEL-SAHAGÚN, C.A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA J.; GALINDO-VELASCO, E.; LÓPEZ-EDWARDS, M.; REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ, O.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; REYES-VELÁZQUEZ, W.P.; SKODA, S.R.; FOSTER, J.E. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hypomycetes). **Journal of Insect Science**, v.5, p.1-8, 2005.

ÁNGEL-SAHAGÚN, C.A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; PESCADOR-RUBIO, A.; SKODA, S.R.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; LORENZONI, A.G.; GALINDO-VELASCO, E.; FRAGOSO-SÁNCHEZ, H.; FOSTER, J.E. 2010. Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus = Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 278-286, 2010.

ANGELO, I. C., FERNANDES, E. K. K., BAHIENSE, T. C., PERINOTTO, W. M. S., MORAES, A. P. R., TERRA, A. L. M., BITTENCOURT, V. R. E. P. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 317-322, 2010.

ANUALPEC. **Anuário de pecuária brasileira**. São Paulo: AgraFNP, 2009. 360 p.

AYRES, M.; Jr AYRES, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S.DOS. **BioEstat 4.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: IOEPA, 2005. 324p.

BAHIENSE, T.C. **Avaliação *in vivo* dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* associados ou não com deltametrina no controle de uma cepa do carrapato *Boophilus microplus* resistente a piretróides**. 2007, 54p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

BAHIENSE, T.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Laboratory evaluation of the compatibility and the synergism between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and deltamethrin to resistant strains of *Boophilus microplus*. **New York Academy of Sciences**, v. 1026, p. 1-4, 2004.

BAHIENSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 319-324, 2006.

BARCI, L.A.G.; ALMEIDA, J.E.M.; NOGUEIRA, A.H.C.; ZAPPELINI, L.O.; PRADO, A.P.; Selection of isolates of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.18, p.7-13, 2009.

BARROS, S.L.; MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; MENK, C.; ALMEIDA, M.A.O.; MELO, E.P.S.; KESSLER, R.H. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, by enzyme-linked immunosorbent assays. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, p. 513-517, 2005.

BATEMAN, R. P.; CAREY, M.; MOORE, D.; PRIOR, C. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. **Annals of Applied Biology**, v. 122, p. 145-152, 1993.

BAUMANN, R.; SCHUBERT, R.; HEITLAND, W.; AUGER-ROZENBERG, A.; FAIVRE-RIMPAT, P.; MULLER-STARCK, G. Genetic diversity within and among populations of *Dipirion pini* (Hym., diprinidae) determined by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction on haploid males. **Journal of Applied Entomology**, v. 127, p. 258-264, 2003.

BEATI, L.; KEIRANS, J. E. Analysis of the systematic relationships among ticks genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 32-48, 2001.

BERTI FILHO, E.O. **Controle Biológico dos Insetos Praga**. In: CROCOMO, W.B. Manejo Integrado de Pragas. Editora UNESP, São Paulo. 1990. p.87-104.

- BENJAMIN, M. A.; ZHIOUA, E.; OSTFELD, R. S. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, p. 723-728, 2002.
- BIDOCHKA, M.J.; McDONALD, M.A.; 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.
- BIDOCHKA, M.J.; MELZER, M.J.; LAVENDER, T.M.; KAMP, A.M. Genetically related isolates for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* harbour homologous dsRNA viruses. *Mycological Research*, v. 104, p. 1094–1097, 2000.
- BIDOCHKA, M.J.; KAMP, A.M.; LAVENDER, T.M.; DEKONING, J.; De CROSS, J.N.A. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p. 1335-1342, 2001.
- BIDOCHKA M.J.; MENZIES, F.V.; KAMP, A.M. Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. **Archives of Microbiology**, v.178, p. 531–537, 2002.
- BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. **Mycologia**, v. 98, p. 737-735, 2006
- BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, p. 512-530, 2009.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Uso do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Arquivo da Universidade Rural do Rio de Janeiro**, v. 15, p. 197-202, 1992.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 16, p. 49-55, 1994a.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*. **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 16, p. 41-47, 1994b.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD C.L.; LIMA, A.F. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v. 17, p. 83-88, 1995a.
- BITTENCOURT, V.R.E.P., MASSARD C.L.; LIMA A.F.; VIEGAS E.C. Isolamento e produção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, a partir de

Boophilus microplus (Canestrini, 1887). **Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v.17, p. 55-60, 1995b.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; PERALVA, S. L. F. S.; VIEGAS, E. C.; ALVES, S. B. Avaliação dos efeitos do contato de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com ovos de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 5, p. 81-84, 1996.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; SOUZA, E. J.; PERALVA, S. L. E. S.; MASCARENHAS, A. G.; ALVES, S. B. Avaliação da eficácia *in vitro* de dois isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (bals.) vuill. em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, p. 49-52, 1997.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural**, v. 29, p. 351-354, 1999a.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; SOUZA, E. J. ; PERALVA, S.L.F.S. ; REIS, R.C.S. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 em teste de campo com bovinos infestados por carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 20, p. 78-82, 1999b.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; BAHIENSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K. Avaliação da ação *in vivo* de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, p. 38-42, 2003.

BRAGA, G.U.L.; VENKOVSKY, R.; MESSIAS, C.L. Estimates of genetic parameters related to chitinase production by *Metarhizium anisopliae*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, p. 171-177, 1998.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v.74, p.734-739, 2001a.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MESSIAS, C.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 105, p. 874-882, 2001b.

BRIDGE, P.D.; WILLIAMS, M.A.J.; PRIOR, C.; PATERSON, R.R.M. Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 1163-1169, 1993.

BRIDGE, P.D.; PRIOR, C.; SAGBOHAN, J.; LOMER, C.J.; CAREY, M.; BUDDIE, A. Molecular characterization of isolates of *Metarhizium* from locusts and grasshoppers. **Biodiversity and Conservation**, v. 6, p. 177-189, 1997.

BRIDGE, P.D.; ARORA, D.K. Interpretation of PCR methods for species definition. **In: BRIDGE, P.D.; ARORA, D.K.; REDDY, C.A.; ELANDER, R.P. Applications in PCR mycology.** CABI Publishing, p. 63-84, 1998.

BRUNS, T.D.; WHITE, T.J.; TAYLOR, J.W. Fungal Molecular Systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 22, p. 525-564, 1991.

BULLMAN, G.M.; MUÑOS CABENAS, M.E.; AMBRÚSTOLO, R.R. El impacto ecológico de las lactonas macrocíclicas (endectocidas): una actualización comprensiva y comparativa. **Veterinaria Argentina**, v. 8, p. 3-15, 1996.

CAGAN, L.; SVERCEL, M. The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the European corn borer. *Ostrinia nubilalis* HBN. (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Central European Agriculture**, v. 2, p. 227-233, 2001.

CAMARGO, M.G.; GOLO, P. S.; ANGELO, I.C.; PERINOTTO, W.M.S.; SÁ, F.A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, 2012 (in press).

CAMOUGRAND, N., KISSOVA, I.; VELOURS, G.; MANON, S. Uth1p: a yeast mitochondrial protein at the crossroads of stress, degradation and cell death. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 133-140, 2004.

CASTRILLO, L.A.; BROOKS, W.M. Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isosyme and RAPD analyses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 190-196, 1998.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J.K.; BALL, B.V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K.D. Fungal biocontrol of Acari. **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, p. 357-384, 2000.

CHARNLEY, A.K.; ST. LEGER, R.J. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. **In: COLE, G.T.; HOCH, H.C. The fungal spore and diases initiation in plants and animals.** New York: Plenum Press, p. 267-286, 1991.

CHEN, J.W.; LIU, B.L.; TZENG, Y.M. Purification and quantification of destruxins A and B from *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Chromatography**, v. 830, p. 115-125, 1999.

COBB, B.D.; CLARKSON, J.M. Detection of molecular variation in the insect pathogenic fungus *Metarhizium* using RAPD-PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 112, p. 319-324, 1993.

CORREIA, A.C.B.; FIORIN, A.C.; MONTEIRO, A.C.; VERÍSSIMO, C.J. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, p. 189-191, 1998.

COSTA, G.L.; SARQUIS, M.I.M.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus*

tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 154, p. 207-209, 2002.

DE CROSS, J.N.A.; BIDOCHKA, M.J. Cold-induced proteins in cold-active isolates of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 105, p. 868-873, 2001.

DESTÉFANO, R.H.R.; DESTÉFANO, S.A.L.; MESSIAS, C.L. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 245-252, 2004.

DEVI, K.U.; SRIDEVI, V.; MOHAN, CH.M.; PADMAVATHI, J. Effect of high temperature and water stress on *in vivo* germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, p. 181-189, 2005.

DIMBI, S.; MANIANIA, N.K.; LUX, S.A.; MUEKE, J.M. Effect of constant temperatures and germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. **Biocontrol**, v. 49, p. 83-94, 2004.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of soil fungi**. New York: Academic, 1980. v.1. 859p.

DRIVER, F.; MILNER, R.J. PCR applications to the taxonomy of entomopathogenic fungi. **In: BRIDGE, P.D.; ARORA, D.K.; REDDY, C.A.; ELANDER, R.P. Applications in PCR mycology**. CABI Publishing, p. 153-186, 1998.

DRIVER, F.; MILNER, R.J.; TRUEMAN, J.W.H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, v. 104, p. 134-150, 2000.

EDEL, V. Polymerase chain reaction in mycology: an overview. **In: BRIDGE, P.D.; ARORA, D.K.; REDDY, C.A.; ELANDER, R.P. Applications in PCR Mycology**. CABI Publishing, p. 1-20. 1998.

EKESI, S.; MANIANIA, N.K.; AMPONG-NYARKO, K. Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 9, p.177-185, 1999.

ENKERLI, J.; KOLLIKER, R.; KELLER, S.; WIDMER, F. Isolation and characterization of microsatellite markers from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 384-386, 2005.

ENKERLI, J.; NIELSEN, C.; WIDMER, F.; JENSEN, A.B. Molecular genetic tools used to study Entomophthorales. **In: Keller, S. Arthropod-Pathogenic Entomophthorales: Biology, Ecology, Identification**. Office for Official Publications of the European Communities, 2007, p. 82-97.

ENKERLI, J.; GHORMADE, V.; OULEVEY, C.; WIDMER, F. PCR-RFLP analysis chitinase genes enables efficient genotyping of *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 102, p. 185-188, 2009.

ENTZ, S.C.; JOHNSON, D.L.; KAWCHUK, L.M. Development of a PCR-based bdiagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Mycological Research**, v. 109, p. 1302-1312, 2005.

FANG, W.; VEJA-RODRIGUEZ, J.; GLOSH, A.K.; KANG, A.; ST LEGER, R.J. Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. **Science**, v. 331, p.1074-1077, 2011.

FAO. **Resistencia a los antiparasitários: estado actual con énfasis en America Latina**. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)-Producción y Sanidad Animal, Roma, 2003. 51p.

FARIA, M.R.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, p. 237-256, 2007.

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 high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 2075-2081, 1993.

FERNANDES, E.K.K. ; COSTA, G.L. ; SOUZA, E.J. ; MORAES, A.M. L. ; BITTENCOURT, V.R.E.P. *Beauveria bassiana* isolated from engorged females and tested against eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p. 393-398, 2003.

FERNANDES, E. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 237-243, 2007.

FERNANDES, E. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 69-78, 2008.

FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, p.71-93, 2008.

FERNANDES, É. K. K. ; MORAES, Á. M. L. ; PACHECO, R. S. ; RANGEL, D. E. N. ; MILLER, M. P. ; BITTENCOURT, V. R. E. P. ; ROBERTS, D. W. . Genetic diversity among Brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non-Brazilian isolates and other *Beauveria* species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 760-774, 2009.

FERNANDES, É.K.K.; KEYSER, C.A.; CHONG, J.P.; RANGEL, D.E.N.; MILLER, M.P.; ROBERTS, D.W. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 115-128, 2010.

FERNANDES, É.K.K.; ANGELO, I.C.; RANGEL, D.E.N.; BAHIENSE, T.C.; MORAES, A.M.L.; ROBERTS, D.W.; BITTENCOURT, V.R.E.P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 307-318, 2011.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FINNEY, D.S. **Probit analysis**. Cambridge: University Press, 1971. 333p.

FOULY, H.; WILKINSON, H.T.; CHEN, W. Restriction analysis of internal transcribed spacers and the small subunit gene of ribosomal DNA among four *Gaeumannomyces* species. **Mycologia**, v. 89, p. 590-597, 1997.

FRAZZON, A.P.G.; VAZ JR, I.S.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 94, p. 117-125, 2000.

FREED, S.; JIN, F.L.; REN, S.X. Determination of genetic variability among the isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from different geographical origins. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 359-370, 2011.

FREIMOSER F.M.; SCREEN, S.; BAGGA, S.; HU, G.; ST LEGER, R.J. Expresses sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. **Microbiology**, v. 149, p. 239-247, 2003.

FREIRE, J. J. Arseno e cloro resistência e emprego de tiofosfato de dietilparanitrofenila (Parathion) na luta anticarrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Boletim da Diretoria de Produção Animal**, v.9, , p. 3-21, 1953.

FREIRE, L.; COSTA, A.; GÓES, L.; OLIVEIRA, N. DNA polymorphism and total protein in mutants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin strain E9. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 93-97, 2001.

FREITAS, D.R.J.; POHL, P.C.; VAZ JR, I.S. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 109-117, 2005.

FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C.; PIZIRANI-KLLINER, A.P.; 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.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 8, p. 49-61, 1993.

FURLONG, J., MASSARD, C. de A. **Controle do carrapato dos bovinos**. In: FURLONG, J. Manejo sanitário, prevenção e controle de parasitoses e mamite em rebanhos de leite. EMBRAPA-CNPGL, p.37-48, 1994.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S. **Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas**. Circular Técnica n. 59-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, 2000. 25p.

FURLONG, J.; PRATA, M.C.; MARTINS, J.R.S., COSTA JR, L.M.; COSTA, J.C.R.M; VERNEQUE, R.S. **Diagnóstico *in vitro* da sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a acaricidas**. In: Anais...XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Ouro Preto, v. 13, p. 305, 2004.

GLARE, T. R.; MILNER, R. J.; BEATON, C. D. Variation in *Metarhizium*, a genus of fungal pathogens attacking *Orthoptera* : Is phialide morphology a useful criterion ? **Journal of Orthopteran Research**, v. 5, p.19-27, 1996.

GOETTEL, M.S.; POPRAWSKI, T.J.; VANDENBERG, J.D. **Safety of non-targetinvertebrates to fungal biocontrol agents**. In: LAIRD, M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W. Safety of Microbial Insecticides. Boca Raton: CRC Press Inc, 1990, p. 115-132.

GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D.; WRAIGHT, S.P. **Fungi**. In: LACEY, L.A.; KAYA, H.K. Field manual of techniques in invertebrate pathology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000, p. 255-282.

GONÇALVES, P. M. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 30, p. 187-194, 2000.

GONZÁLES, J.C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo: Mestre Jou, 1974. 101p.

GONZÁLES, J.C. O carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Can. 1887) (Revisão histórica e conceitual). **A Hora Veterinária**, ano 21, p.23-28, 2002.

GONZÁLES, J. C.; SERRA-FREIRE, N. M. O couro dos bovinos do Rio Grande do Sul: riqueza há muito maltratada. **A Hora Veterinária**, v. 12, p. 14-16, 1992.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA-BORJA, G.E.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, p. 8-10, 2002.

GUARAGNA, G.P.; CARVALHO, J.B.P.; FIGUEIREDO, A.L. GAMBINI,L.B.; BARBOSA,M.I. de A. Efeito dos fatores genéticos e ambientes na infestação natural de carrapatos (*B. microplus*, Canestrini) em bovinos leiteiros. **Boletim de Indústria Animal**, São Paulo, v. 45, p. 19-32, 1988.

GUERRA, D.M.S.; PIRES, A.P.D.; LIMA, E.A.L.A. Persistência de *Metarhizium anisopliae* spp. no solo sob diferentes condições de temperatura e umidade. **Caatinga**, v. 22, p. 50-54, 2009.

GUO, H-L.; YE, B-L.; YUE, Y-Y.; CHEN, Q-T.; FU, C-S. Three new species of *Metarhizium*. **Acta Mycologica Sinica**, v. 5, p. 177-184, 1986.

HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Detections of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* within infected migratory grasshoppers (*Melanoplus sanguinipes*) using Polymerase Chain Reaction and DNA prob. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, p. 21-27, 1996.

HORN, S. C. **Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos no Brasil**. Boletim de Defesa Sanitária Animal, 1983. 15p.

HORNBOSTEL, V.L.; OSTFELD, R.S.; ZHIOUA, E.; BENJAMIN, M.A. Sublethal effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) on engorged larval, nymphal, and adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 922-929, 2004.

HUANG, B.; LI, C.; HUMBER, R.A.; HODGE, K.T.; FAN, M; LI, Z. Molecular evidence for the taxonomic status of *Metarhizium taii* and its teleomorph, *Cordyceps taii* (Hypocreales, Clavicipitaceae). **Mycotaxon**, v. 94, p. 137-147, 2005.

HUGHES, W.O.H.; THOMSEN, L.; EILENBERG, J.; BOOMSMA, J.J. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting and nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 46-53, 2004.

INGLIS, G.D.; DUKE, G.M.; GOETTEL, M.S.; KABALUK, J.T. Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 101-113, 2008.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; BUTT, T.M.; STRASSER, H. **Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pests**. In: BUTT, T.M., JACKSON, C.W. Y MAGAN, N. Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potencial. CABI Internacional, Wallingford, U.K. 2001. p. 23-69.

JEFFS, L.B.; XAVIER, I.J.; MATAI, R.E.; KHACHATOURIANS, G.G. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolyocladium* e *Verticillium*. **Canadian journal of Microbiology**, v. 45, p. 936-948, 1999.

JONSSON N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 1-10, 2006.

KANZOK, S.M.; JACOBS-LORENA, M. Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. **Trends Parasitology**, v. 22, p. 49-51, 2006.

KAY, B.H.; KEMP, D.H. Vaccines against artropods. **American Journal of Tropical Hygiene**, v. 50, p.87-96, 1994.

KAAYA, G. P.; MWANGI, E. N.; OUNA, E. A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, p. 15-20, 1996.

KAAYA G.P.; HASSAN, S. Entomogenous fungi as promising biopesticides from tick control. **Experimental Applied Acarology**, v. 24, p. 913–926, 2000.

KAAYA, G.P.; SAMISH, M.; HEDIMBI, M.; GINDIN, G.; GLAZER, I. Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. **Experimental Applied Acarology**, v. 55, p. 273-281, 2011.

KIRKLAND, B. H.; CHO, E.; KEYHANI, N. O. Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidea) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, v. 31, p. 414- 421, 2004.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v.5, p.150-163, 2004.

KUNZ S.E.; KEMP, D.H. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact, **Revue Scientifique et Technique**, v. 13, p. 1249-1286,1994.

LEAL, S.C.M.; BERTIOLI, D.J.; BUTT, T.M.; PEBERDY, J.F. Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* by RAPD-PCR. **Mycological Research**, v. 98, p.1077-1081, 1994.

LEAL, S.C.M.; BERTIOLI, D.J.; BUTT, T.M.; CARDER, J.H.; BURROWS ,P.R.; PEBERDY, J.F. Amplification and restriction endonuclease digestion of the Pr1 gene for the detection and characterization of *Metarhizium* strains. **Mycological Research**, v. 101, p. 257-265,1997.

LEAL, S.C.M.; BERTIOLI, D.J.; BUTT, T.M.; PEBERDY, J.F.; BERTIOLI, D.J. Genetic exchange in *Metarhizium anisopliae* strains co-infecting *Phaedon cochleariae* is revealed by molecular markers. **Mycological Research**, v. 104, p. 409–414, 2000.

LEE, B. Resistant cattle for tick control. **Rural Research**, v. 105, p. 4-7, 1979.

LEEMON, D. M.; JONSSON, N. N. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, p. 40-49, 2008.

LEITE, R.C.; LABRUNA, M.B.; OLIVEIRA, P.R. *In vitro* susceptibility of engorged females from different populations of *Boophilus microplus* to comercial acaricides. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v.4, p. 283-294, 1995.

LIANG, Z.Q.; LIU A.Y.; LIU J.L. A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium* anamorph. **Acta Mycologica Sinica**, v, 10, p. 257–262, 1991.

LIANG, Y.Y.; DE ZAMAROCZY, M. ARSÈNE, F.; PANQUELIN, A.; ELMERICH, C. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasiliense* Sp7: involvment of nifA, glnA and glnB gene products. **FEMS Microbiology Letters**, v. 79, p. 113-119, 1992.

LIU, Z.Y.; LIANG, Z.Q.; WHALLEY, A.J.S.; YAO, Y.J.; LIU, A.Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 178–182, 2001.

LIU, Z.Y.; LIU, A.Y.; YAO, Y.J.; HYDE, K.D.; YU, Z.N. Molecular evidence for teleomorph-anamorph connections in *Cordyceps* based on ITS-5.8S rDNA sequences. **Mycological Research**, v. 106, p. 1100-1108, 2002.

LIU, H.; SKINNER, M.; BROWNBIGDE, M.; PARKER, B.L. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.82, p.139-147, 2003.

LOGULLO, C.; DA SILVA VAZ, I.; SORGINE, M.H.F.; PAIVA-SILVA, G.O.; FARIA, F.S.; ZINGALI, R.B.; DE LIMA, M.F.R.; ABREU, L.; FIALHO OLIVEIRA, E.; ALVES, E.W.; MASUDA, H.; GONZÁLES, J.C.; MASUDA, A.; OLIVEIRA, P.L. Isolation of aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v. 116, p. 525-232, 1998.

LES, J.C.; MASUDA, A.; OLIVEIRA, P.L. Isolation of na aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v. 116, p. 525-532, 1998.

LOPES, R. B.; ALVES, S. B.; PADULLA, L. F. L.; P'REZ, C. A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 27-31, 2007.

LUBECK, I.; ARRUDA, W.; SOUZA, B.K.; STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C.R.; SCHANK, A.; VAINSTAIN, M.H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as a potential biocontrol of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. **Fungal Ecology**, v. 1, p. 78-88, 2008.

LUZ, C.; TIGANO, M.S.; SILVA, I.G.; CORDEIRO, C.M.T.; ALJANABI, S. M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p.839-846, 1998.

LUZ, C.; TAI, M.H.H.; SANTOS, A.H.; SILVA, H.H.G. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 214-215, 2008.

MAGALHÃES, F.E.P. **Aspectos biológicos e de controle do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) no município de Pedro Leopoldo-MG, Brasil**. 1989. 107p. Tese (Doutorado em Parasitologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1989.

MARANHÃO, E.A.A.; MARANHÃO, E.H.A. Hongos entomopatógenos: importante ferramenta para el control de “moscas blancas” (Homoptera: Aleyrodidae). **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 5-6, p. 209-242, 2009.

MARQUES, E.K.; IKUTA, N.; LUNGE, V.R.; FONSECA, A.S.K. **Diagnóstico molecular e biotecnologia**. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. de; AZEVEDO, J.L. de. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p.101-129.

MARTINEZ, S.S. **O nim: *Azadirachta indica* – natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: IAPAR, 2002. 142 p.

MATA, R.F.F. **Efeito de extratos aquosos de *Cabralea canjerana* subsp. *polytricha* (Adr. Juss) Penn. (Meliaceae) no controle biológico de *Brevycorine brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae) e *Ascia monuste orseis* (Godart) (Lepidoptera: Pieridae)**. 2007. 66p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

MAVRIDOU, A; TYPAS, MA. Intraspecific polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* revealed by analysis of rRNA gene complex and mtDNA RFLPs. **Mycological Research**, v. 102, p. 1233-1241, 1998.

MCCOY, C.W.; TIGANO-MILANI, M.S. Use of entomopathogenic fungi in biological control: a world view. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 87-93, 1992.

MENDES, M. C.; PEREIRA, J. R.; PRADO, A. P. Sensitivity of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to pyrethroids and organophosphate in farms in the Vale do Paraíba region, São Paulo, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, p. 81-85, 2007.

MENDONÇA, A.F. **Cigarrinhas da cana-de-açúcar: controle biológico**. INSECTA, Maceió, 2005, 317p.

MENT D.; GINDIN G.; SOROKER, V.; GLAZER, I.; ROT, A.; SAMISH, M. *Metarhizium anisopliae* conidial responses to lipids from tick cuticle and tick mammalian host surface. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 132-139, 2010.

MEYLING, N.V.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. **Biological Control**, v.43, p.145-155, 2007.

MILNER, R.J.; LOZANO, L.B.; DRIVER, F.; HUNTER, D. A comparative study of two Mexican isolates with an Australian isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain characterisation, temperature profile and virulence for wingless grasshopper, *Phaulacridium vittatum*. **Biocontrol**, v. 48, p. 335-348, 2003.

MOHANTY, S.S.; RAGHAVENDRA, K.; MITTAL, P.K.; DASCH, A.P.. Efficacy of culture filtrates of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 199-202, 2008.

MOINO JR, A.M.; ALVES, S.B. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Bauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e no comportamento e limpeza de *Heterotermes tenuis*. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 10, p. 611-619, 1998.

- MONTEIRO, A.C.; FIORIN, A.C.; CORREIA, A.C.B. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Mestsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 109-112, 1998.
- MONTEIRO, S. G.; BAHIENSE, T. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Ação do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre a fase parasitária do carrapato *Anocentor nittens* (Neumann, 1897) Schulze, 1937 (Acari: Ixodidae). **Ciência Rural**, v. 33, p. 559-563, 2003.
- MORAES, F.R., COSTA, A.J., WOELZ, C.R. Suscetibilidade natural comparativa entre taurinos e zebuinos a *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). **Ars Veterinária**, v. 2, p. 45-53, 1986.
- MORDUE, A.J.; BLACKWELL. Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology**, v. 39, p. 903-924, 1993.
- MORENO, E.C. **Incidência de ixodídeos em bovinos de leite e prevalência em animais domésticos da Região metalúrgica de Minas Gerais**. 1984. 105p. Dissertação (Mestrado em ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1984.
- MURREL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Crutice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systems Parasitology**, v. 56, p. 169-172, 2003.
- NICHOLSON, W.L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H.J.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.548-572, 2000.
- NOLAN, J. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 18, p. 155–166, 1985.
- NUÑEZ, J.L.; MUÑOZ-COBENAS, M.E.; MOLTEDO, H.L. ***Boophilus microplus* la garrapata comum del ganado vacuno**. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur, 1. ed., 1982. 184p.
- OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*D. hominis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 42, p. 127-35, 1990.
- OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M.; FREITAS, A.R. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 24, p. 1267-1271, 1989.
- ONOFRE S.B., MINIUIK, C.M., de BARROS, N.M., AZEVEDO, J.L.. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 1478–1480, 2001.
- OUEDRAOGO, A.J; FARGUES, M.S.; GOETTEL; C.J. LOMER. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. **Mycopathologia**, v. 137, p. 37-43, 1997.

PAIÃO, J.C.V.; MONTEIRO, A.C.; KRONKA, S.N. Susceptibility of the cattle tick of the *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, p.245-251, 2001.

PANTOU, M.P.; MAVRIDOU, A.; TYPAS, M.A. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: Excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, p. 159-174, 2003.

PARRA, J. R.; BOTELHO, P. S. M.; BENTO, J. M; FERREIRA, B. S. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Editora Manole, São Paulo, 2002. 609p.

PENNA, V. M. ***Boophilus microplus*: a resistência genética do hospedeiro como forma de controle**. Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 1990. 65p.

PEREIRA, M. C. ***Boophilus microplus*: revisão taxonômica e morfológica**. Rio de Janeiro: Químio Divisão Veterinária, 1982. 167p.

PERINOTTO, W. M. S. ; ANGELO, I. C. ; GOLO, P. S. ; QUINELATO, S. B. ; CAMARGO, M. G. ; SA, F. A. ; BITTENCOURT, V. R. E. P. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 257-260, 2012.

PINTO, A.S.; BARRETO, C.C.; SCHANK, A.; ULHOA, C.J.; VAINSTAIN, M.H. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogenic *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 322-327, 1997.

PIPE, N.D.; CHANDLER, D.; BAINBRIDGE, B.W.; HEALE, J.B. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal RNA gene complex of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 99, p. 485-491, 1995.

POLAR, P.; MOORE, D.; KAIRO, M.; RAMSUBHAG, A. Topically applied mycoacaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. **Experimental Applied Acarology**, v. 46, p. 119-148, 2008.

POSADAS, J.B., LECUONA, R.E. Selection of native isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycetes:Clavicipitaceae) for the microbial control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 46, p.284–291, 2009.

POWELL, R.T.; REID, T.J. Project tick control. **Queensland Agricultural Journal**, v. 108, p. 279-300, 1982.

RAKOTONIRAINY, M.S.; CARIU, M.L.; BRYGOO, Y.; RIBA, G. Phylogenetic relationships within the genus *Metarhizium* based on 28S rRNA sequences and isozyme comparison. **Mycological Research**, v. 98, p. 225-23, 1994.

RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.; FLINT, S.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, p. 77-83, 2004.

RATH, A.C.; WORLEDGE, D.; ANDERSON, G.C.; CARR, C.J. Virulence of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *Metarhizium flavoviridae* games and rozsygal and *Beauveria bassiana* (Ballsamo) Vuillemin to *Adoryphorus coulini* (Burmeister) (Coleoptera: Scarabaeidae). **Journal of the Australian Entomological Society**, v. 34, p. 181-186, 1995.

RIBEIRO, S. P. M. A.; LUNA ALVES-LIMA, E. A.; ASSUNÇÃO, W. T. G. Sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Linhagem PL43) em folhas de cana-de-açúcar. **Anais da Sociedade de Entomologia do Brasil**, v. 21, p. 59-67, 1992.

RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265-270, 1950.

RIDING, G.A.; JARMEY, J.; MAKENNA, R.V.; PEARSON, R.; COBON, G.S.; WILLADSEN, P. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization and possible function, **Journal of Immunology**, v. 153, p. 5158-5166, 1994.

ROBERTS, D.W.; CAMPBELL, A.S. Stability of entomopathogenic fungi. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, v. 10, p. 19-76, 1977.

ROBERTS, D.W.; GUPTA, S.; ST LEGER, R.J. Metabolite production by entomopathogenic fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 325-347, 1992.

ROBERTS, D.W.; YENDOL, W.G. Use of microbial control of insects. **In: BURGESS, H.D. Microbial control of insects and mites**. New York: Academic Press, p. 125-149, 1971.

ROCHA, C.M.B.M. O carrapato dos bovinos. Boletim Técnico: Série Extensão da Universidade Federal de Lavras. Lavras, ano VI, n. 6, 1997. 27p.

ROMBACH, M.C.; HUMBER, A.R.; EVANS, H.C. *Metarhizium album*, a pathogen of leaf and planthoppers of rice. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, p. 37-45, 1987.

ROMBACH, M.C.; HUMBER, A.R.; ROBERTS, D.W. *Metarhizium flavoride* var. *minus* var. nov., a pathogen of plant and leafhoppers on rice in Philippines and Solomon Islands. **Mycotaxon**, v. 27, p. 87-92, 1986.

SAMISH, M.; GINDIN, G.; ALEKSEEV, E.; GLAZER, I. Pathogenicity of entomopathogenic fungi to different developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 1355-1359, 2001.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLASER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v.129, p. 389-403, 2004.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. FEP MVZ Editora, Belo horizonte, MG, 2007. 264p.

SAMSON, R.A.; EVANS, H.C. Two new *Beauveria* spp. from South America. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 39, p. 93-97, 1982.

SCHNABEL, G.; SCHNABEL, E. L.; JONES, A.L. Characterization of Ribosomal DNA from *Venturia inaequalis* and Its Phylogenetic Relationship to rDNA from Other Tree-Fruit *Venturia* Species. **Phytopathology**, v.89, p. 100-108, 1999.

SCHOLTE, E.J.; NG'HABI, K.; KIHONDA, J.; TAKKEN, W.; PAAIJMANS, K.P. ABDULLA, S.; KILLEEN, G.F.; KNOLS, B.G. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. **Science**, v. 308, p. 1641–1642, 2005.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, p. 1267-1274, 2010.

SHAH, P.A.; DOURO-KPINDOU, O.K.; SIDIBE, A.; DAFPE, C.O.; PAUUW, H.V.D.; LOMER, C.J. Effects of the sunscreen oxybenzone on field efficacy and persistence of *Metarhizium flavoviride* conidia against *Kraussella amabile* (Orthoptera: Acrididae) in Mali, West Africa. **Biocontrol Science Technology**, v. 8, p. 357-364, 1998.

SILVA, A.M.; ALENCAR, M.M.; REGITANO, L.C.A.; OLIVEIRA, M.C.S. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitas na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p. 1477-1482, 2010.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; TIGANO, M.S.; ARANTES, O.M.N. **Caracterização de entomopatógenos**. In: ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 731-764.

ST LEGER, R.J.; MAY, B.; ALLEE, L.L.; FRANK, D.C.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, p. 89-101, 1992.

ST LEGER, R.J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 6349-6354, 1996.

SOUZA, E. J.; REIS, R. C. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Evaluation of in vitro effect of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on eggs and larvae of *Amblyomma cajennense*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 8, p. 127-131, 1999.

STEAR, M. J.; NEWMAN, M. J.; NICHOLAS, F. W.; BROWN, S. C.; HOLROYD, R. G. Tick resistance and the major histocompatibility system. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 62, p. 47–52, 1984.

SUN, M.; REN, Q.; GUAN, G.; LIU, Z.; MA, M.; GOU, H.; CHEN, Z.; LI, Y.; LIU, A.; NIU, Q.; YANG, J.; YIN, H.; LUO, J. Virulence of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* to the engorged female *Hyalomma anatolicum anatolicum* tick (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 389-393, 2011.

SUNG, G-H.; HYWEL-JONES, N.L.; SUNG, J-M.; LUANGSA-ARD, J.J.; SHRESTHRA, B.; SPATAFORA, J.W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**, v. 57, p. 5-59, 2007.

SUTHERST, R. W.; WHARTON, R. H., COOK, I. M., SUTHERLAND, I. D., BOURNE, A. S. Long-term population studies on the cattle tick (*Boophilus microplus*) on untreated cattle selected for different levels of tick resistance. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 30, p. 353-368, 1979.

SUTHERST, R.W.; MAYWALD, G. F.; KERR, J. D.; SIEGEMAN; D. A. The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 34, p. 317-327, 1983.

TANGTHIRASUNUN, N.; POEAIM, S.; SOYTONG, K.; SOMMARTYA, P.; POPOONSAK, S. Variation in morphology and ribosomal DNA among isolates of *Metarhizium anisopliae* from Thailand. **Journal of Agricultural Technology**, v. 6, p. 317-329, 2010.

THOMAS, M.B.; READ, A.F. Can fungal biopesticides control malaria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 377–383, 2007.

THOMAS, M.B.; JENKINS, N.E. Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*. **Mycological Research**, v.101, p.1469-1474, 1997.

THOMSEN, L.; JENSEN, A.B. Application of nested-PCR technique to resting spores from the *Entomophthora muscae* species complex: implications for analyses of host-pathogen population interactions. **Mycologia**, v. 94, p. 794-802, 2002.

TIAGO, P.V.; FURLANETO, M.C. O papel de proteases degradadoras de cutícula. **Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais**, v. 2, p. 40-51, 2003

TIGANO-MILANI, M.S.; GOMES, A.C.M.M.; SOBRAL, B.W.S. Genetic variability among Brazilian isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 65, p. 206-210, 1995.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transaction of the British Mycological Society**, v. 66, p. 407-411, 1976.

UENO, M.; JORGE, A. O. C. Comparação de Técnicas Moleculares de Análise de DNA cromossomal de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina. **Revista de Biociências**, v.8, p. 1-9, 2002.

UTECH, K.B.W.; WHARTON, R.H.; KERR, D.J. Resistance to *B. microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29, p. 885-95, 1978.

VAN DEN BOSCH, R.; MESSENGER, P.S.; GUTIERREZ, A.P. **An introduction to biological control**. New York: Plenum Press, 1982. 247p.

VELÁSQUEZ, V.B.; CÁRCAMO, M.P.; MERIÑO, C.R.; IGLESIAS, A.F.; DURÁN J.F. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 89-99, 2007.

VESTERGAARD, S., GILLESPIE, A.T., BUTT, T.M., SCHREITER, G.; EILENBERG J. Pathogenicity of the Hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western thrips, *Frankliniella occidentalis*. **Biocontrol Science and Technology**, v.5, p.185-192, 1995.

VILELA, E.F.; PALLINI, A. **Uso de semioquímicos no controle biológico de pragas**. In: Parra JRP, Botelho PSM, Corrêa-Ferreira BS, Bento JMS. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Ed. Manole: São Paulo. p. 529-542, 2002.

VILLARES, J.B. Contribuição ao estudo da resistência e susceptibilidade genética dos bovinos ao *Boophilus microplus*. **Boletim de Indústria Animal**, v. 4, p. 60-79, 1941.

VICENTINI, S.; FARIA, M.R.; OLIVEIRA, M.R.V.. Screening of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates against nymphs of *Bemisia tabaci* (Genn.) Biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) with description of a new bioassay method. **Neotropical Entomology**, v.30, p. 97-103, 2001.

WALSTAD, J.D.; ANDERSON, R.F.; STAMBAUGH, W.J. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 16, p. 221-226, 1970.

WANG, C.; TYPAS, M.A.; BUTT, T.M. Detection and characterization of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, **FEMS Microbiology Letters**, v. 213, p. 251-255, 2002.

WANG, S.; MIAO, X.; ZHAO, W.; Bo HUANG; FAN, M.; LI, Z.; HUANG, Y. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). **Mycological Research**, v.109, p.1364-1372, 2005.

WANG, C., BUTT, T.M.; ST. LEGER, R.J. (2005) Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. **Microbiology**, v. 151, p. 3223–3236, 2005

WHARTHON, R.H.; UTECH, K.B.W.; TURNER, H.G. Resistance to the cattle tick, *B. microplus*, in a herd of Australian Illawarra Shorthorn cattle: its assessment and herdability. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 21, p. 163-81, 1970.

WHARTON, R. H. **Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus***. In: PAL, R.; WHARTON, R. H. Control of arthropods of medical and veterinary importance. New York, Plenum Publishing, 1974, p. 36-52.

WILLADSEN, P.; RIDING, G.A.; McKENNA, R.V.; KEMP, D.H., TELLAM, R.L.; NIELSEN, J.N.; LAHNSTEIN, J.; COBON, G.S.; GOUGH, J.; Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **Journal of Immunology**, v. 143, p. 1346-1351, 1989.

WILLADSEN, P. Tick control: Thoughts on a reseach agenda. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 161-168, 2006.

WILSON F.; HUFFAKER C. B. **The philosophy, scope and importance of biological control**. In: HUFFAKER C. B.; MESSENGER P. S. Theory and practice of biological control. Academic Press, New York, 1976. p. 3-15.

YANAKA-SCHAFFER, F.Y.; DALL'ONDER, L.P.; PANICHI, M.C.; MENDES, R.G.; FAGUNDES, N.J.R.; BANDINELLI, J.B. BOGO, M.R. Sequence analysis of the rDNA intergenic spacer of *Metarhizium* strains isolated in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 116–121, 2008.

YIP, H.; RATH, A.C.; KOEN, T.B. Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabaeidae: *Adoryphorus couloni*). **Mycological Research**, v. 96, p. 92-96, 1992.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 9, p. 553-596, 2007a.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 879-920, 2007b.

ANEXOS

A. Protocolo da reação de restrição pela enzima *AluI* (1000 u)

Água ultra pura = 16,3 μL

Tampão RE 10 x = 2,0 μL

BSA acetilado (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) = 0,2 μL

Enzima de restrição (10 u/ μL) = 5 u = 0,5 μL

DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) = 1 μL

Volume final = 20 μL

37°C-1h

B. Protocolo da reação de restrição pela enzima *DdeI* (1000 u)

Água ultra pura = 16,3 μL

Tampão RE 10 x = 2,0 μL

BSA acetilado (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) = 0,2 μL

Enzima de restrição (10 u/ μL) = 5 u = 0,5 μL

DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) = 1 μL

Volume final = 20 μL

37°C-1h

C. Protocolo da reação de restrição pela enzima *HaeIII* (1000 u)

Água ultra pura = 16,5 μL

Tampão SM 10 x = 2,0 μL

Enzima de restrição (10 u/ μL) = 5 u = 0,5 μL

DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) = 1 μL

Volume final = 20 μL

37°C-1h

D. Protocolo da reação de restrição pela enzima *HpaII* (1000 u)

Água ultra pura = 16,5 μL

Tampão Tango 10 x = 2,0 μL

Enzima de restrição (10 U/ μL) = 5 u = 0,5 μL

DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) = 1 μL

Volume final = 20 μL

37°C-1h

E. Protocolo da reação de restrição pela enzima *Sau3AI* (500 u)

Água ultra pura = 16,3 μL

Tampão RE 10 x = 2,0 μL

BSA acetilado (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) = 0,2 μL

Enzima de restrição (10 U/ μL) = 5 u = 0,5 μL

DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) = 1 μL

Volume final = 20 μL

37°C-1h