

**DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* EM
LARVAS DE *Diatraea saccharalis* POR *PRIMERS* ESPECÍFICOS**

RICARDO HENRI RODRIGUES DESTÉFANO

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
“Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Agronomia,
Área de Concentração: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Abril – 2003

**DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* EM
LARVAS DE *Diatraea saccharalis* POR *PRIMERS* ESPECÍFICOS**

RICARDO HENRI RODRIGUES DESTÉFANO

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **CLAUDIO LUIZ MESSIAS**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
“Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Agronomia,
Área de Concentração: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA

Estado de São Paulo – Brasil

Abril – 2003

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Destéfano, Ricardo Henri Rodrigues

Detecção e identificação de *Metarhizium anisopliae* em lavras de *Diatraea saccharalis* por primers específicos / Ricardo Henri Rodrigues Destéfano. - - Piracicaba, 2003.

72 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.
Bibliografia.

1. Broca (Inseto nocivo) 2. Controle biológico 3. Fungo entomopatogênico I. Título

CDD 632.78

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Claudio Luiz Messias pelo estímulo e pela oportunidade propiciados para a realização deste trabalho.

Agradeço especialmente à Pesquisadora Dra. Suzete A. Lanza Destéfano, pela grande contribuição e inestimável ajuda, me estimulando a todo instante e sem dúvida valorizando em muito este trabalho com seus conhecimentos na área de Genética Molecular.

Agradeço ao Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Instituto Biológico, Campinas, SP pela disponibilização do laboratório e equipamentos, onde parte do trabalho foi realizada.

Ao Pesquisador Dr. Júlio Rodrigues Neto pela amizade e colaboração na revisão deste trabalho.

À Dra. Valéria Maia Oliveira da Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA/UNICAMP pela amizade e carinho dispensados, pelo profissionalismo e auxílio indispensável nas análises filogenéticas.

Ao Dr. Enrico De Beni Arrigoni do Centro de Tecnologia Copersucar – Piracicaba, SP, pela cessão dos insetos utilizados neste estudo e pelas conversas profissionais construtivas.

Ao Prof. Dr. Gonçalo A. G. Pereira por permitir a realização dos experimentos de sequenciamento no Laboratório de Genômica e Expressão do Depto. Genética e Evolução/IB/UNICAMP.

Às Biólogas Denise Balani e Mariana Ferreira, pela gentileza, auxílio e empenho na realização de algumas práticas laboratoriais.

Às Biólogas Cintia Losano Costa e Carla Judice Maria do Laboratório de Genômica e Expressão do DGE/IB/UNICAMP pelo empenho e profissionalismo demonstrados no auxílio nos experimentos de sequenciamento, e análises das seqüênciasde para o desenho dos *primers* específicos.

Às colegas de trabalho, Célia, Ernestina, Ana Rita e Patricia pela convivência amiga e saudável que elas propiciam, tornando nosso ambiente de trabalho bastante agradável.

À Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, ao Instituto de Biologia e ao Departamento de Genética e Evolução pela oportunidade de aperfeiçoamento acadêmico-profissional.

Aos meus queridos e amados filhos Ricardo Henri Rodrigues Lanza Destéfano e Guilherme Rodrigues Lanza Destéfano pela paciência e compreensão nos finais de semana confinados, dispensados ao meu trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 O fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sorokin.....	4
2.2 Patogenicidade e virulência.....	6
2.3 Marcadores moleculares.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Linhagens.....	15
3.2 Meios de cultivo.....	15
3.2.1 Meio mínimo.....	15
3.2.2 Meio completo.....	17
3.2.3 Solução de vitaminas.....	17
3.2.4 Meio de arroz.....	17
3.3 Soluções e tampões.....	18
3.4 Obtenção de conídios para inoculação em meio líquido.....	19
3.5 Obtenção do micélio para extração de DNA.....	19
3.6 Hospedeiro.....	19
3.7 Bioensaios.....	20

3.8	Preparação dos insetos após os bioensaios para extração de DNA.....	20
3.9	Extração de DNA em pequena escala.....	21
3.10	Amplificação do DNA por PCR.....	22
3.11	Digestão dos produtos de PCR com endonucleases de restrição.....	23
3.12	Análise dos padrões de <i>fingerprinting</i>	24
3.13	Purificação dos produtos de amplificação para sequenciamento.....	24
3.14	Sequenciamento da região ITS1 - 5.8S – ITS2 DNAr.....	25
3.15	Análise filogenética.....	25
3.16	Desenho e síntese dos oligonucleotídeos (<i>primers</i>) Específicos.....	25
4	RESULTADOS.....	26
4.1	Amplificação do gene 18S DNAr e da região ITS1 – 5.8S – ITS2 DNAr.....	26
4.1.1	Análise do gene 18S DNAr.....	26
4.1.2	Análise da região ITS1 - 5.8S – ITS2.....	28
4.1.3	Análise de PCR-RFLP da região ITS1 - 5.8S – ITS2.....	31
4.2	Sequenciamento da região ITS1 – 5.8S – ITS2 DNAr de diferentes espécies de <i>Metarhizium</i> e <i>Beauveria bassiana</i>	32
4.3	Análise filogenética da região ITS1 - 5.8S – ITS2 do operon ribossômico.....	33
4.4	Desenho de <i>primers</i> específicos.....	36
4.5	Deteccção de <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> em insetos infectados.....	39
4.6	RFLP dos fragmentos específicos obtidos para confirmação da deteccção de <i>M.a.</i> var. <i>anisopliae</i> nos insetos infectados.....	40
5	DISCUSSÃO.....	44

6 CONCLUSÕES.....	51
ANEXO.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Esquema do par de <i>primers</i> NS1 e NS8 da sub-unidade menor 18S.....	27
2 Digestão do gene 18S com <i>Afa</i> I, <i>Alu</i> I, <i>Dde</i> I e <i>Hae</i> III.....	28
3 Esquema dos <i>primers</i> utilizados para amplificação da região intergênica.....	29
4 Digestão da região espaçadora ITS com <i>Afa</i> I, <i>Alu</i> I, <i>Dde</i> I e <i>Hae</i> III.....	30
5 Digestão da região espaçadora ITS com <i>Hpa</i> II e <i>Sau</i> 3A I.....	31
6 Dendrograma de similaridade obtido com o coeficiente de Dice.....	32
7 Amplificação da região ITS em diferentes espécies de <i>Metarhizium</i> e <i>Beauveria</i>	33
8 Dendrograma resultante do alinhamento das seqüências ITS1 – 5.8S – ITS2 DNAr de diferentes espécies de <i>M. anisopliae</i>	35

9 Fenograma resultante do alinhamento das seqüências ITS1 – 5.8S – ITS2 DNAr de diferentes espécies de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i>	35
10 Gradiente de temperatura entre 40 e 55°C para teste de especificidade para <i>M. anisopliae</i> com o par de <i>primers</i> ITSMet/ITS4.....	37
11 Amplificação com o par de <i>primers</i> ITS14/ITS4 para teste de especificidade entre as linhagens E ₉ e 14 de <i>M. anisopliae</i> e DNA do inseto sadio.....	38
12 Teste de amplificação com DNAs extraídos de insetos infectados utilizando-se os <i>primers</i> ITSMet/ITS4 e ITS14/ITS4.....	39
13 Digestão dos produtos de amplificação gerados com o par de <i>primers</i> ITSMet/ITS4 com endonucleases de restrição.....	40
14 Digestão dos produtos de amplificação gerados com os <i>primers</i> ITSMet/ITS4 com diferentes endonucleases de restrição.....	41
15 Digestão dos produtos de amplificação gerados com o par de <i>primers</i> ITSMet/ITS4 com diferentes endonucleases de restrição.....	42
16 Digestão dos produtos de amplificação gerados com o par de <i>primers</i> ITS14/ITS4 com diferentes endonucleases de restrição.....	43

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Linhagens utilizadas no presente estudo.....	16
2 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo.....	23
3 Perfil de restrição obtido a partir da digestão dos fragmentos de DNA correspondentes ao gene ribossômico 18S com diferentes enzimas.....	27
4 Perfil de restrição obtido a partir da digestão dos fragmentos de DNA, correspondentes à região intergênica, com diferentes enzimas.....	29

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* EM LARVAS DE *Diatraea saccharalis* POR PRIMERS ESPECÍFICOS

Autor: RICARDO HENRI RODRIGUES DESTÉFANO

Orientador: Prof. Dr. CLAUDIO LUIZ MESSIAS

RESUMO

A região espaçadora ITS rDNA tem sido utilizada como uma importante ferramenta molecular para a identificação de fungos. Neste estudo a região ITS1 - 5.8S - ITS2 foi analisada em diferentes espécies do fungo entomopatogênico *Metarhizium* incluindo *M. anisopliae*, *M. album* e *M. flavoviride* com o objetivo de se construir *primers* específicos para a detecção e identificação do fungo no interior de larvas infectadas de *Diatraea saccharalis*. A amplificação desta região produziu um fragmento único de aproximadamente 540 pb para as linhagens E₉, B/Vi e C, e de 600 pb para a linhagem 14 de *M. anisopliae* var. *anisopliae*; de 650 bp para *M. album* e 600 pb para *M. flavoviride*. Os produtos de PCR obtidos foram digeridos com diferentes enzimas de restrição *Afa* I, *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hpa* II e *Sau* 3A I; e os perfis de PCR-RFLP mostraram nítidas diferenças entre as espécies analisadas. O sequenciamento da região ITS1 – 5.8S – ITS2 permitiu o desenho de *primers* específicos para as linhagens de *M.a.* var. *anisopliae* do Brasil e da Austrália. A amplificação não ocorreu em linhagens de *M. álbum*, *M. flavoviride* e *Beauveria bassiana*. Os DNAs extraídos de larvas infectadas pelas linhagens E₉, B/Vi e C do Brasil e linhagem 14, da Austrália, foram testados utilizando-se os *primers*

desenvolvidos. Em todos os experimentos o fungo *M.a.* var. *anisopliae* foi detectado 48 horas após a inoculação. A técnica molecular empregada neste estudo permite a rápida e segura detecção e identificação de *M.a.* var. *anisopliae* em bioensaios de laboratório e de campo, programas de manejo de pragas e estudos de epizootiologia.

**DETECTION AND IDENTIFICATION OF *Metarhizium anisopliae* WITHIN
INFECTED SUGARCANE BORER *Diatraea saccharalis* LARVAE USING
SPECIFIC PRIMERS**

Author: RICARDO HENRI RODRIGUES DESTÉFANO

Adviser: Prof. Dr. CLAUDIO LUIZ MESSIAS

SUMMARY

The ITS rDNA have been used as an important molecular tool for fungi identification. In this study the ITS1 - 5.8S – ITS2 rDNA regions were analyzed in different species of the entomopathogenic fungus *Metarhizium* including *M. anisopliae*, *M. album* and *M. flavoviride*, in order to construct specific primers for their detection and identification within infected *Diatraea saccharalis* larvae. The amplification of this region yielded a unique fragment of approximately 540 bp for E₉, B/Vi and C, and 600 bp for strain 14 of *M. anisopliae* var. *anisopliae*; of 650 bp for *M. album* and 600 bp for *M. flavoviride*. The PCR products were digested with the different restriction endonucleases *Afa* I, *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hpa* II and *Sau* 3A I; and the PCR-RFLP profiles showed clear differences amongst the species. The sequencing of the ITS-5.8S rDNA regions allowed for the design of specific primers for *M. anisopliae* var. *anisopliae*. The amplification was not observed with *M. album*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* strains. DNAs extracted from infected larvae by E₉ and C strains from Brazil and the strain 14 from Australia in individual bioassays were tested using previously designed specific primers. In all experiments, the fungus was detected after 48

hours of post-inoculation. This molecular technique allows a fast and secure detection and identification of the entomopathogen in bioassays, in pest management programs and epizootiology.

1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com o meio ambiente tem ressaltado a importância das pesquisas científicas que procuram diminuir a agressão constante que o ecossistema vem sofrendo por intervenção do próprio homem. Por esse motivo e outros como alto custo dos defensivos agrícolas e aumento da resistência das pragas a estes produtos existentes no mercado, o número de pesquisas envolvendo organismos capazes de promover o controle biológico de pragas agrícolas e de interesse na saúde pública tem aumentado muito. Entre estes organismos, destacam-se alguns microrganismos que são agentes naturais de controle destas pragas, podendo ser manipulados em laboratórios e/ou em escala industrial.

As limitações inerentes à maioria dos inseticidas químicos em controlar as populações de insetos indesejáveis fizeram esse interesse crescer (Roberts, 1989). Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados no controle microbiano (Alves, 1998). Dentro deste quadro destacam-se alguns gêneros: *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces* e *Verticillium*.

O potencial de uso de fungos para controle biológico de pragas foi percebido por Metschnikoff (1879) e Krassiltschic (1888) que produziram *Metarhizium anisopliae* em larga escala para o controle da praga do trigo *Anisopliae austriaca* e de um curculionídeo da beterraba, *Cleonus punctiventris*.

Cerca de 80% das doenças dos insetos têm como agentes etiológicos os fungos pertencentes a cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies (Alves, 1986).

A entomopatogenicidade, definida como a capacidade de produzir doença em insetos, depende de uma sequência de eventos de ordem mecânica e bioquímica que ocorrem de forma sincronizada pela deposição do conídio sobre a cutícula do inseto (adesão), seguida pela germinação, penetração, colonização, exteriorização das estruturas fúngicas e produção de esporos sobre a carcaça do hospedeiro (St.Leger et al., 1991b).

O deuteromiceto *Metarhizium anisopliae* é um importante agente microbiano utilizado no controle biológico. Sua ação é bastante conhecida e sua distribuição é global, ocorrendo em diferentes regiões, desde ambientes de clima temperado até clima tropical.

Para se avaliar a eficiência do fungo como agente microbiano de controle de pragas é necessária a realização de bioensaios com o inseto-alvo, e a recuperação do patógeno com o re-isolamento do mesmo após a morte do hospedeiro, o que demanda tempo.

Em ensaios de campo, é necessário o monitoramento da ação da linhagem do fungo sobre a população de insetos-alvo, podendo-se avaliar simultaneamente a atividade entomopatogênica de diferentes gêneros numa mesma área agrícola ou similar. Em bioensaios competitivos, situação na qual os insetos podem ser tratados com mais de uma linhagem do fungo ao mesmo tempo, a recuperação do patógeno deve ser seguida por outros procedimentos para a identificação da linhagem que foi eficiente.

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. Esta preocupação é exacerbada pela dificuldade de monitorar a dispersão e o estabelecimento do fungo quando liberado em condições de campo. Sendo *M. anisopliae* cosmopolita, são requeridas técnicas as quais possam distinguir entre linhagens nativas (autóctones) e introduzidas. Estas técnicas devem permitir que um grande número de amostras seja analisado com precisão e segurança, e de forma padronizada. Dessa forma, para determinar a eficácia de linhagens aplicadas e

seus efeitos no meio ambiente, técnicas especiais são necessárias para detectar a presença do fungo dentro dos insetos coletados no campo (Leal et al., 1997).

Um estudo detalhado dessa natureza, melhora a compreensão sobre a distribuição do entomopatógeno e o desenvolvimento da sua epizootia em populações de insetos em nível micro-ambiental e regional (Thomsen & Jensen, 2002).

Avanços na tecnologia molecular mostram grande potencial para a rápida detecção e identificação de fungos para propósitos médicos, científicos, agrícolas e comerciais. Numerosos alvos dentro do genoma de fungos têm sido avaliados em muitos trabalhos recentes, usando áreas da sequência dentro do DNA ribossomal (DNAr) (Rakotonirainy et al., 1994; Fouly et al., 1997; Driver et al., 2000; Anderson et al., 2001; Uetake et al., 2002). Esta região do genoma inclui os genes 18S, 5.8S e 28S os quais codificam para RNA ribossomal (RNAr) e que tem uma sequência relativamente conservada de nucleotídeos entre os fungos. Também se incluem áreas variáveis da sequência de DNA chamadas ITS (*internal transcribed spacer*). Embora não traduzida dentro de proteínas, as ITS codificam regiões que têm um papel crítico no desenvolvimento do RNAr funcional, com variações na sequência entre espécies, mostrando-se muito promissoras como “regiões-assinatura” para ensaios moleculares.

A aplicação de técnicas moleculares em bioensaios pode permitir uma maior agilidade na detecção e identificação do patógeno infectante levando a um diagnóstico precoce da micose no inseto.

O objetivo deste trabalho foi o de desenvolver *primers* específicos para a rápida detecção e identificação do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* dentro de insetos hospedeiros a partir de análises da região ITS1 – 5.8S – ITS2.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN

Baseando-se na morfologia e na produção de conídios, três espécies de *Metarhizium* são identificadas: *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *M. flavoviride* (Gams; Rozsypal) e *M. album* (Petch), sendo todas, potenciais agentes de controle microbiano de pragas de interesse agrícola e em saúde pública (Onofre et al., 2002).

A espécie *M. anisopliae* é composta por *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *majus*, entretanto, estudos recentes, baseados em sequências do gene ribossomal 28S e região espaçadora ITS, sugerem duas novas variedades, *M.a.* var. *lepidiotum* e *M.a.* var. *acridum* (Driver et al., 2000).

M. flavoviride apresenta duas variedades que são reconhecidas baseando-se na dimensão conidial: *M. flavoviride* var. *minus* Rombach, Humber & Roberts e *M. flavoviride* var. *flavoviride* Gams & Rozsypal.

O deuteromiceto *Metarhizium anisopliae* pertence à ordem Hypocreales, família mitosporic Clavicipitaceae e foi descrito por Metschnikoff em 1879 pela primeira vez como *Entomophthora anisopliae*. O primeiro trabalho de controle microbiano realizado por este pesquisador, foi para o controle de larvas de *Anisopliae austriaca*, sendo finalmente classificado por Sorokin em 1883 como *Metarhizium anisopliae*. Desde então, a utilização e ação deste patógeno vêm sendo estudadas sobre muitas espécies de insetos.

O potencial de uso de fungos para controle biológico de pragas foi sugerido por Metschnikoff (1879) e Krassiltschic (1888) que produziram *Metarhizium anisopliae* em larga escala para o controle da praga do trigo *Anisopliae austriaca* e de um curculionídeo da beterraba *Cleonus punctiventris*.

Veen (1968) já apontara este fungo como um agente de controle biológico com grandes potencialidades, tendo como hospedeiros mais de 200 espécies de insetos.

Metarhizium anisopliae apresenta geralmente conídios uninucleados (Tinline & Noviello, 1971), com pequena proporção de binucleados (Luna, 1985; Bagagli, 1987). Luna & Azevedo (1985) estudando várias linhagens de *M. anisopliae*, obtiveram indicações de que a grande variação na forma e tamanho de conídios parece ser característica do gênero, não se relacionando tão estritamente às condições de cultura.

Este fungo apresenta processo de heterocariose, o qual foi descrito por Tinline & Noviello (1971), sendo que o processo parassexual completo, com obtenção de diplóides e segregantes, foi descrito por Messias (1979), Messias & Azevedo (1980) e Al-aidroos (1980). Silveira (1983) obteve protoplastos de *M. anisopliae* e fusão entre protoplastos de mutantes morfológicos e auxotróficos. A separação de cromossomos do fungo pode ser verificada por meio da utilização da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE - "Pulsed Field Gel Electrophoresis") (Cordeiro, 1996).

M. anisopliae é um fungo de cultivo simples, necessitando quase que exclusivamente de uma fonte nutricional à base de amido; é cosmopolita, e sem dúvida é um dos fungos mais estudados em programas de manejo de pragas, uma vez que representa grande potencialidade como entomopatógeno (Onofre et al., 2002).

2.2 Patogenicidade e Virulência

Segundo Fuxa & Tanada (1987), a patogenicidade está mais relacionada a grupos ou espécies de patógenos, sendo uma característica "qualitativa", enquanto virulência determinaria o grau desta patogenicidade dentro de um grupo de espécies ou patógenos, caracterizando um termo "quantitativo".

Uma visão global da relação patogênica de fungos e insetos hospedeiros foi relatada nos trabalhos de Roberts (1989) e Messias (1989). Os autores resumem a importância, o estado de desenvolvimento e as formas de ação dos fungos entomopatogênicos, onde diferentes gêneros e espécies de fungos são citados.

O fungo *M. anisopliae* apresenta grande variabilidade natural. Vários trabalhos foram realizados com o objetivo de selecionar isolados para o controle de pragas como o cupim de montículo em pastagens, pragas de grãos armazenados e larvas de escarabeídeos que atacam a cana-de-açúcar, cigarrinha da cana, *Mahanarva posticata* (Alves, 1998).

A sua patogenicidade também tem sido verificada com elevada eficiência no controle de fêmeas ingurgitadas do carrapato *Boophilus microplus* (Onofre et al., 2002).

Segundo Fargues et al. (1975), o fungo *M. anisopliae* apresenta patogenicidade à 204 espécies de insetos pertencentes a 43 famílias dentre as ordens Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera Coleoptera, Homoptera e outras.

O desenvolvimento da doença em insetos pode ser relacionado com a germinação do conídio, penetração através da cutícula por ação mecânico-enzimática, invasão, colonização do corpo do inseto e produção de toxinas.

O contato do conídio com o inseto hospedeiro marca o início da doença; o conídio germina sobre a cutícula do inseto e penetra através do integumento. Uma estrutura denominada apressório é responsável pela fixação do fungo sobre o inseto e posterior penetração (Madelin, 1966; Roberts & Yendol, 1971).

Forças físicas, pressão mecânica e produção de exoenzimas estão envolvidas no mecanismo de penetração do fungo; assim, a habilidade dos fungos entomopatogênicos em produzir certas enzimas extracelulares ou exoenzimas como protease, lipase e quitinase, estaria relacionada à penetração do fungo no integumento do hospedeiro e ao processo de colonização (Balfour-Browne, 1960; Ferron, 1978 e Rosato et al., 1981).

Os eventos de penetração de *M. anisopliae* no hospedeiro podem ser resumidos na formação de um apressório (extremidade dilatada da hifa com alta atividade secretora enzimática, que permite a penetração da epicutícula), penetração da pro-cutícula (também mecânico-enzimática) e formação de células com abundância de nutrientes armazenados (clamidósporo) que parece manter a viabilidade do fungo no corpo do hospedeiro por longos períodos até a esporulação superficial (Zacharuch 1970 a,b,c, e 1973).

Imediatamente após o contato, tubos germinativos crescem extensivamente através da procutícula após a germinação do conídio, com a formação de apressórios. Conídio, tubo germinativo e apressório são geralmente fundidos em estruturas de infecção de variados tamanhos e arranjos (Schabel, 1978).

Estudos de microscopia eletrônica revelaram importantes detalhes do modo de infecção de *Heliothis zea* por *Beauveria bassiana*, evidenciando que a invasão do corpo do hospedeiro ocorre também pelos espiráculos (Pekrul & Gula, 1979).

Além da resistência mecânica, a cutícula também pode oferecer uma resistência química através de substâncias nela presentes que exercem ação inibitória sobre o fungo (Messias & Pupin, 1990).

Messias & Pupin (1990) relataram que lipídeos presentes na epicutícula de *Diatraea saccharalis*, entre eles os ácidos caprílico e capróico, inibem o crescimento de *M. anisopliae*. Substâncias com atividade inibidora sobre proteases de *M. anisopliae* foram isoladas de insetos por Kucera (1984). Atualmente os estudos sobre a ação de enzimas degradadoras, bem como os

mecanismos envolvidos, se encontram num estágio de elucidação bastante desenvolvido (St. Leger et al., 1986c; 1992; 1993; Leite, 1987; Braga et al., 1998; Aguiar, 1990; Silva, 1985).

Entre as enzimas estudadas em *M. anisopliae*, amilase, lipase, protease e quitinase, a protease (Pr1) parece ser a mais ativa na penetração do hospedeiro (St. Leger et al., 1992).

Apesar de vários autores haverem estabelecido uma correlação positiva entre a produção de exoenzimas e o processo de penetração dos fungos entomopatogênicos em diversos hospedeiros, alguns resultados conflitantes foram obtidos quando se considerou a virulência das linhagens (Silva, 1985; Leite & Messias, 1984; Leite, 1987; Aguiar, 1990; Paris & Ferron, 1979; Pekrul & Gula, 1979; Cheung & Gula, 1982).

Toxinas produzidas por fungos entomopatogênicos têm sido descritas como associadas à morte do hospedeiro. Vários compostos tóxicos foram isolados e identificados de culturas de *Beauveria*, *Cordyceps*, *Entomophthora*, *Metarhizium* e *Paecilomyces*. Destruixinas A, B, C e D e dimetildestruixina B foram isoladas de culturas de *M. anisopliae*. Beauvericina foi encontrada em *B. bassiana* e *P. farinosus*. Cordicepina foi isolada de *Cordyceps militaris* e outras substâncias tóxicas não identificadas foram relatadas em espécies entomógenas de *Aspergillus* (Ferron; 1978).

Estudos sobre a produção de toxinas por fungos entomopatogênicos têm sido relatados por Roberts (1966, 1966a, 1969), Al-Aidroos & Roberts (1978), Fargues et al. (1975), Kaijiang & Roberts (1986), Lugli (1987), entre outros.

Silva & Messias (1986) realizando bioensaios com o inseto *Rhodnius prolixus*, verificaram que mutantes de *M. anisopliae* que deixaram de produzir lipases e amilases, tiveram virulência menor que a das linhagens selvagens, enquanto que mutantes para a produção de proteases, não apresentaram níveis de virulência significativamente diferentes dos níveis das linhagens selvagens. Além disto, linhagens revertentes para a produção das duas primeiras enzimas tiveram seus níveis de virulência restaurados, concluindo os

autores que a virulência das linhagens se altera quando ocorrem modificações na produção de enzimas.

Segundo Alves (1998) os principais projetos de controle de pragas envolvendo *Metarhizium anisopliae* no Brasil envolvem o controle de: cigarrinha-da-cana (*Mahanarva posticata*, *M. fimbriolata*); cigarrinha-das-pastagens (*Deois flavopicta*, *Zulia entreriana*); cupim das pastagens (*Cornitermes cumulans*); cupim da cana-de-açúcar (gên. *Heterotermes*); broca-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus*); broca-dos-citros (*Diploschema rotundicolle*); percevejo-do-colmo do arroz (*Tibraca limbativentris*) e a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*).

Além de *M. anisopliae*, *M. flavoviride* também tem sido reconhecido nos últimos tempos como um eficaz agente controlador de gafanhotos e outros insetos, pois, isolados desta espécie apresentam virulência elevada, resistência à altas temperaturas e podem ainda ser facilmente produzidos em condições laboratoriais (Onofre et al., 2002), sendo atualmente utilizado em grande escala na África e EUA.

2.3 Marcadores moleculares

As técnicas de diagnóstico molecular foram inicialmente utilizadas na taxonomia de microrganismos e têm sido intensamente aplicadas em programas de melhoramento genético. O objetivo dessas técnicas é revelar a variabilidade em nível de DNA e, conseqüentemente, detectar diferenças entre indivíduos (Marques et al., 2002).

A técnica de PCR ("Polymerase Chain Reaction") utiliza a característica das DNA polimerases de sintetizar moléculas de DNA, usando um molde de DNA de fita simples a partir de uma reação de dupla fita obtida, utilizando oligonucleotídeos sintéticos (*primers*). Essa técnica causou um enorme impacto na Biologia Molecular, inicialmente , e depois em várias outras áreas sendo

uma das principais o diagnóstico de agentes infecciosos de maneira rápida e específica (Schrank & Vainstein, 2002).

Muitos trabalhos científicos que utilizam esta técnica, diretamente ou de técnicas dela derivadas, têm sido publicados desde a sua descrição. Estes trabalhos têm permitido avanços significativos tanto em áreas básicas, como aquelas que buscam o entendimento de processos biológicos fundamentais, como em áreas aplicadas, dentre as quais a identificação de genótipos, o diagnóstico de doenças, estudos filogenéticos e melhoramento genético de plantas, animais e microrganismos (Anderson & Stasovski, 1992; Ouellet & Seifert, 1993). A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade desta técnica tornaram-na uma poderosa ferramenta em estudos genéticos que envolvem um grande número de organismos vivos (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Por ser a PCR uma técnica simples, pouco tempo após sua descrição, diversos pesquisadores estavam aptos a realizar experimentos empregando modificações no princípio original, de maneira a expandir consideravelmente a aplicação desta técnica (Foster et al., 1993).

A variabilidade genética do gênero *Metarhizium* foi detectada por vários autores através da análise de RAPD (“Random Amplified Polymorphism DNA”) (Cobb & Clarckson, 1993; Fegan et al., 1993; Bidochka et al., 1994; Leal et al., 1994; Tigano-Milani et al., 1995; Fungaro et al., 1996; Freire et. al., 2001 e Alves et. al., 2001). Esta técnica também foi utilizada para diferenciar espécies, variedades e isolados do gênero *Hirsutella* (Strongman & Mackay, 1993; Mozes-Koch et al.,1995) assim como para diferenciar isolados em espécies do gênero *Zoophtora* (Hodge et al.,1995). Welsh & McClelland (1990) realizaram a PCR com *primers* de sequências arbitrárias para obter *fingerprintings* genômicos e os autores puderam demonstrar que diferentes linhagens pertencentes a várias espécies de bactérias podiam ser diferenciadas através da comparação do polimorfismo nos *fingerprintings* genômicos.

A separação de linhagens de diferentes isolados brasileiros de *M. anisopliae* var. *anisopliae* , *M. anisopliae* var. *majus* e *M. flavoviride* em grupos

fenéticos foi obtida por Tigano-Milani et al. (1995). Esses autores investigaram a variabilidade genética das linhagens e verificaram que os genótipos estão mais relacionados às espécies hospedeiras do que com a origem geográfica.

Freire et al. (2001) analisando cinco mutantes, e a linhagem selvagem de *Metarhizium anisopliae* que originou estes mutantes por radiação gama, detectaram diferenças entre a linhagem selvagem e os mutantes pela alta sensibilidade da técnica de RAPD, evidenciando polimorfismo nas amostras, com um coeficiente médio de similaridade de 75%.

Uma grande limitação observada na técnica de PCR-RAPD, é que há muita suscetibilidade à contaminação (interferência) por DNA não alvo, e a mesma só pode ser realizada de modo seguro com DNA de culturas puras (Leal et al., 1997; Thomsen & Jensen, 2002).

Análises de seqüências por meio de RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) é também uma outra ferramenta que pode ser utilizada nas análises de DNA. Variações no tamanho de fragmentos gerados por distintas amostras de DNA após clivagem com enzimas de restrição podem ser avaliados pela comparação entre o número e o tamanho dos fragmentos produzidos pela digestão do DNA com ou sem uma posterior etapa de hibridização com sondas marcadas (Marques et al., 2002).

Uma alternativa para a identificação e diferenciação de fungos envolve utilização de *primers* específicos.

Hegedus & Khachatourians (1996a) utilizaram *primers* específicos, correspondentes a segmentos de DNA específicos de *B. bassiana*, para identificação e diferenciação deste fungo através das técnicas de PCR e SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis) em isolados deste entomopatógeno infectando *Melanoplus sanguinipes* (gafanhotos migratórios). O perfil de restrição dos produtos de PCR, sequenciamento, e SSCP permitiram a diferenciação positiva de um isolado particular de *B. bassiana* em relação a outros.

A detecção deste fungo dentro de *M. sanguinipes* durante o processo de infecção usando PCR e hibridização foi conseguida pela utilização de sondas específicas previamente construídas. O fungo pode ser detectado no inseto, 5 dias após a inoculação. Neste estudo, foram testados 2 protocolos para obtenção de DNA com pureza suficiente para uma boa amplificação em PCR usando *primers* derivados de uma sonda específica de *B. bassiana*. O protocolo estabelecido foi então usado para detectar a presença do fungo dentro de insetos infectados, desde o dia 0 até o 10^o dia após a inoculação, onde se observou a correspondência entre o aumento na quantidade de produto de PCR e o tempo de infecção. Este estudo permitiu um aumento na sensibilidade de detecção, quando do isolamento de PCR/DNA amplificável de insetos infectados por fungos (Hegedus & Khacahtourians, 1996b).

Outro marcador molecular amplamente utilizado na identificação e diferenciação de espécies é o DNA ribossomal (DNAr). Os DNAr nos eucariotos estão presentes repetidas vezes, e cada unidade consiste de regiões codificadas para os genes RNAr 18S, 5.8S e 28S, e dois espaços internos (ITS 1 e ITS 2) que separam essas regiões. Cada unidade do DNAr é separada por um espaço intergênico (IGS). A unidade de DNAr apresenta componentes em sua sequência que envolve variações e podem ser usadas em estudos de sistemática para diferentes níveis taxonômicos (Fouly et al., 1997).

As regiões DNAr 18S e 28S são muito conservadas e podem ser utilizadas para diferenciação em nível de gênero e espécie (Berbee & Taylor, 1995; Gargas & Depriest, 1996). Por outro lado, as regiões espaçadoras ITS e IGS acumulam mais variabilidade, sendo mais utilizadas na diferenciação de espécies ou entre linhagens da mesma espécie (Ristaino et al., 1998; Esteve-Zarzoso et al., 1999).

Costa (1999) utilizou o gene 18S, 28S rDNA, a região espaçadora 18S-28S e o gene histona H3-1 como marcadores moleculares para efetuar estudos taxonômicos em *Neurospora* spp.. Este estudo permitiu a identificação de isolados deste fungo provenientes do Estado do Maranhão e São Paulo.

Diferenças quanto ao tamanho da região espaçadora IGS no fungo *Pyrenophora graminea*, agente causador da doença da folha da cevada, permitiram a identificação de dois grupos dentro deste gênero. Os produtos IGS-PCR possuíam 3,8 e 4,4 kb (Pecchia et al., 1998).

Ristaino et al. (1998) estudaram um método rápido de identificação para seis grupos taxonômicos do patógeno de plantas *Phytophthora* utilizando a comparação visual dos padrões de bandas de restrição para as enzimas *Rsa* I, *Msp* I e *Hae* III. A digestão do produto ITS obtido com as enzimas de restrição revelou perfis diferentes dentre as espécies testadas possibilitando, em todos os casos, a diferenciação inter e infra-específica. Os isolados foram caracterizados anteriormente por métodos tradicionais, através de características morfológicas. Os métodos moleculares foram, segundo os autores, ferramentas rápidas e fáceis para a identificação de espécies economicamente importantes dentro desse gênero.

As técnicas de amplificação e posterior sequenciamento do gene 5.8S com as regiões intergênicas (ITS 1 e ITS 2) também foram aplicadas para *Metarhizium*. A análise filogenética dos dados de sequenciamento mostrou que *M. anisoplaie* constitui um grupo monofilético, e *M. flavoviride* e *M. album* representam duas linhas evolucionárias separadas (Sosa-Gomez et al., 1998).

Essa mesma abordagem foi empregada em estudos com *Pleurotopsis longinqua* para análises de diferenciação genética entre isolados de três regiões geográficas diferentes através do perfil de restrição obtido da amplificação da região ribossomal ITS 1-5.8S-ITS 2. Após sequenciamento, os autores encontraram diferenças de apenas quatro pares de bases, sugerindo que esta distribuição distinta é evolutivamente recente (Hughes et al., 1998).

Anderson et al. (2002) utilizaram a técnica de RFLP para separar isolados do fungo *Pisolithus* onde a sequência ITS foi usada para refinar a distinção entre os agrupamentos filogenéticos encontrados.

Bindslev et al. (2002) utilizando a técnica de PCR *in situ* (ISPCR) conseguiram diferenciar espécies de fungos fitopatogênicos, de difícil

isolamento pelas características próprias desse tipo de material, onde ocorre a presença de diferentes microrganismos da mesma espécie, tornando muito problemática sua separação e posterior cultivo para identificação precisa.

Pela técnica de RFLP-PCR da região ITS 2 e com o desenho de *primers* específicos, Thomsen & Jensen (2002) conseguiram determinar *in vivo* diferenças em nível de espécie dentro do complexo de *Entomophthora muscae* em cadáveres de diferentes espécies de moscas, cujo gênero é de difícil distinção.

Os relatos descritos acima mostram o alto grau de sensibilidade e precisão das técnicas moleculares permitindo que fungos entomopatogênicos possam ser liberados no ambiente e facilmente monitorados com bastante segurança (Hegedus & Khachatourians, 1996b).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens

No presente trabalho utilizou-se, em todos os experimentos, linhagens de *M. anisopliae* (E₉, B/Vi, C e 14), *M. flavoviride* (204 e 209) e *Beauveria bassiana* (959, 2253 e 2629) pertencentes ao Banco de Germoplasma de Fungos Entomopatogênicos do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP. A linhagem de *M. album* (201) foi gentilmente cedida pela Dra. Miriam Tigano-Milani/CENARGEN-EMBRAPA. As linhagens estão listadas na Tabela 1.

3.2 Meios de cultivo

Os meios de cultivo utilizados para a manutenção e crescimento das linhagens e as soluções de rotina foram preparados e esterilizados.

3.2.1 Meio Mínimo (MMI)(Pontecorvo et al., 1953, modificado)

NaNO ₃ (Nitrato de sódio)	6,00 g
KCl (Cloreto de potássio)	0,52 g
MgSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de magnésio)	0,52 g
KH ₂ PO ₄ (Fosfato monobásico potássio)	1,52 g
Glicose (ou Dextrose)	10,0 g
FeSO ₄ .7H ₂ O (1% em Água)	Traços (2 gotas/L)
ZnSO ₄ (1% em Água)	Traços (2 gotas/L)
Água destilada	1.000 mL

Tabela 1. Linhagens de *Metarhizium* e *Beauveria* utilizadas no presente estudo.

Linhagem	Hospedeiro	Origem
<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>		
E ₉	<i>Deois flavopicta</i> (Homóptera: Cercopidae)	Espírito Santo, Brasil
B/Vi (mut. auxotrófico tiamina ⁻ de E ₉)		*UNICAMP, Brasil
C	<i>Mahanarva posticata</i> (Homóptera: Cercopidae)	Alagoas, Brasil
14	desconhecido	Austrália
<i>Metarhizium álbum</i>		
201 (**ARSEF 2082)	<i>Cofana spectra</i> (Homoptera: Cicadellidae)	Indonésia
<i>Metarhizium flavoviride</i>		
204 (ARSEF 2024)	<i>Otiorhynchus sulcatus</i> (Coleoptera: Curculionidae)	França
209 (ARSEF 2133)	<i>Ceutorhynchus macula alba</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Tchecoslováquia
<i>Beauveria bassiana</i>		
ARSEF 959	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepdoptera: Noctuidae)	Paraná, Brasil
ARSEF 2253	<i>Autographa gamma</i> (Lepdoptera: Noctuidae)	França
ARSEF 2629	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lepdoptera: Pyralidae)	Pernambuco, Brasil

*Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil

**Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi

Ajustou-se o pH para 6,8 com NaOH 2N ou HCl 1N, e adicionou-se 15 g de ágar para meio sólido

3.2.2 Meio Completo (MC) (Pontecorvo et al., 1953, modificado)

Acrescentou-se ao Meio Mínimo:

Peptona	2,00 g
Extrato de levedura	0,50 g
Caseína hidrolisada	1,50 g
Solução de vitaminas	1,0 mL

Ajustou-se o pH para 6,8. Para meio sólido, adicionou-se 15 g de ágar.

3.2.3 Solução de Vitaminas:

Ácido nicotínico	100 mg
Ácido p-aminobenzóico	10 mg
Tiamina (Aneurina)	50 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina (Cloridrato)	50 mg
Riboflavina	100 mg
Água Destilada	100 mL

Estocou-se em frasco escuro, sob refrigeração.

3.2.4 Meio de Arroz

Arroz beneficiado tipo I	50 g
Água destilada	40 mL

3.3 Soluções e Tampões

EDTA 0,5M pH 8,0

EDTA	372,24g
Água destilada	1.000 mL

Acertou-se o pH com NaOH em pastilhas.

Tris-HCl 1M

Tris	121,14g
Água destilada	1.000 mL

Acertou-se o pH para 7,2 e 8,0 com HCl concentrado.

Tampão de Extração (Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM)

Tris-HCl 1M pH 8,0	10 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	2 mL
Água Milli-Q	q.s.p. 1.000 mL

Acetato de Sódio 3M pH 8,0

Acetato de sódio tri-hidratado	408.10g
Água destilada	q.s.p. 1.000 mL

Tampão de Lise

Tris-HCl 1M pH 7,2	0,5 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	1,0 mL
SDS 10% (v/v)	3,0 mL
BME 10% (v/v)	1,0 mL
Água Milli-Q	4,5 mL

Tampão Tris Acetato (50X)

Tris base	242,00 g
Ácido acético glacial	57,10 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	100 mL

3.4 Obtenção de conídios para inoculação em meio líquido

Os conídios do fungo foram obtidos pelo cultivo em Meio Completo sólido, em incubação à 28^oC por 10 dias. Este material foi utilizado para inoculação em meio líquido adequado para produção de micélio.

3.5 Obtenção do micélio utilizado para extração do DNA

Para as extrações de DNA, os micélios do fungo foram obtidos pela inoculação dos respectivos conídios em frascos Erlenmeyers de 1 litro contendo 400 mL de Meio Mínimo líquido adicionado em 10% (v/v) de Meio Completo líquido, incubados à 28^oC, sob agitação de 150 rpm, por 72 horas.

O conteúdo de cada frasco foi filtrado em papel de filtro (Inlab tipo 10) e lavado com água destilada esterilizada. O micélio obtido foi acondicionado em placas de Petri muito bem vedadas com parafilme, congelado à -80^oC e posteriormente liofilizado (Liofilizador VIRTIS Co.), sendo mantido após, à -80^oC até o momento do uso.

3.6 Hospedeiro

O inseto hospedeiro utilizado no presente trabalho foi a *Diatraea saccharalis*, conhecida como a broca da cana-de-açúcar.

Foram utilizadas larvas de terceiro ínstar, cedidas periodicamente pelo Centro de Tecnologia da Copersucar, Piracicaba-SP.

3.7 Bioensaios

Para os experimentos de bioensaios, os conídios foram crescidos em Meio de Arroz, à 28°C por 10 dias.

Os bioensaios foram realizados separadamente para cada linhagem em estudo, infectando-se os insetos com o patógeno por caminhamento durante 10 minutos, com um potencial de inóculo de $3,5 \times 10^6$ conídios por inseto. Os insetos foram colocados em placas plásticas com 24 células individuais, juntamente com alimentação natural de colmo de cana-de-açúcar em cubo. Os experimentos foram conduzidos de forma que, a cada 24 horas num total de 72 horas, foram capturados em torno de 48 insetos por tratamento. Os insetos foram sacrificados imediatamente por congelamento à -20°C e posteriormente levados para -80°C, e nessa condição guardados em placas de Petri muito bem vedadas com parafilme, até a realização das extrações de DNA. Um grupo adicional foi mantido até a morte.

Larvas de *D. saccharalis* sadias, não infectadas pelo entomopatógeno foram mantidas nas mesmas condições citadas acima para extração de DNA e comparação como referência (controle).

3.8 Preparação dos insetos após os bioensaios, para extração de DNA (lavagem)

Os insetos coletados durante os bioensaios e guardados à -80°C, foram cuidadosamente lavados, inicialmente (3) três vezes com hipoclorito de sódio à 2,5% por 10 minutos com agitação moderada, depois lavados (3) três vezes com solução de Tween 80 à 0,1% (v/v), e por último, (3) três vezes em solução salina à 0,85%, sendo então colocados sobre papel de filtro esterilizado para secar em fluxo laminar.

Os insetos lavados, limpos e secos foram guardados em placas de Petri muito bem vedadas com parafilme e estocados à -80°C para posterior extração de DNA.

Após as lavagens, uma alíquota de 0,1 mL de solução salina da última lavagem foi então inoculada, em meio de cultura completo em placa de Petri e mantida à 28°C para certificação da eficiência da lavagem externa do hospedeiro.

Um grupo de insetos lavados foi colocado sobre o mesmo meio de cultivo para confirmar a ocorrência de infecção.

3.9 Extração de DNA em pequena escala

Os insetos coletados no segundo dia, ou seja, após 48h do início dos bioensaios foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido para o procedimento de extração de DNA.

As extrações de DNA em pequena escala foram realizadas segundo a metodologia descrita por Gaber & Yoder (1983). A um microtubo tipo Eppendorf de 1,5 mL foi adicionado micélio liofilizado e pulverizado em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido. A quantidade de micélio foi de aproximadamente 60 mg. A seguir, foram adicionados 600 μL de tampão de lise (TL), previamente aquecido, e a mistura foi incubada à 65°C , por 1 hora. Terminado o período de incubação, foram adicionados 600 μL de clorofórmio:fenol equilibrado (1:1). Posteriormente, a mistura foi submetida à centrifugação de 13.500 rpm (microcentrífuga Eppendorf) por 15 minutos. A fase aquosa contendo o DNA foi transferida para um novo microtubo. A extração fenólica foi realizada por mais duas vezes. A seguir, foram adicionados 10 μL de acetato de sódio 3M à fase aquosa, seguido da adição de 0,54 vezes o volume de isopropanol. O tubo foi mantido à -70°C por 15 minutos. Após a precipitação do DNA, procedeu-se uma centrifugação à 12.000 rpm por 3 minutos. O

sedimento foi lavado com etanol 70% (v/v) gelado por duas vezes. Após descarte do etanol, os tubos foram invertidos sobre papel absorvente e deixados secar por aproximadamente duas horas em estufa à 37^oC. O DNA foi suspenso em 100 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA). Posteriormente, 4 µL de RNase (solução estoque de 2,5 mg/mL) foram adicionados à solução de DNA e incubou-se em estufa à 37^oC por uma hora. Após, a solução foi mantida em geladeira durante a noite.

Após este período, 20 µL de cloreto de lítio 4M e 120 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (proporção 24:1) foram adicionados. Misturou-se as fases manualmente. O material foi centrifugado a 12.000 rpm por 8 minutos para separar as duas fases. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e adicionou-se 400 µL de etanol absoluto. Misturou-se por inversão e centrifugou-se à 12.000 rpm por 4 minutos. Descartou-se o sobrenadante. O sedimento foi lavado por 2 vezes com 500 µL de etanol 70%. Após secagem em estufa à 37^oC, o DNA foi suspenso em 100 µL de tampão TE, e estocou-se em freezer à -20^oC.

Esta mesma metodologia foi também utilizada para a extração de DNA dos insetos infectados e não infectados pelo fungo.

3.10 Amplificação do DNA por PCR

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene rDNA 18S e região intergênica ITS foram sintetizados pela GIBCO (Life Technologies) e encontram-se listados na Tabela 2. Eles foram suspensos em água Milli-Q esterilizada para concentração final de 200 µM. As soluções de trabalho foram utilizadas na concentração de 20 a 30 µM.

As amplificações de DNA foram realizadas em termociclador Perkin Elmer/PCR System 480 e MJ Research PTC 200.

As reações de amplificação foram efetuadas em volumes de 25 μ L contendo: 10 mM Tris-Cl, pH 8,3; 100 mM de uma mistura de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Amersham Biosciences); 0,4 mM do *primer*; 1UI de *Taq* DNA polimerase (Genotag) por reação, e 100 ng do DNA molde. O programa de amplificação do gene 18S das amostras consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 95°C/3 min.; seguido de 32 ciclos a 94°C/1 min.; 57°C/1 min. e 72°C/2 min; e um ciclo a 72°C/3 min. (extensão final). Para amplificação da região intergênica o programa foi de um ciclo de desnaturação inicial a 95°C/3 min.; seguido de 32 ciclos a 94°C/1 min.; 50°C/1 min. e 72°C/1 min; e um ciclo a 72°C/3 min. (extensão final). Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,3%/TAE 1X, corado com brometo de etídio (Maniatis et al., 1982), visualizados em fonte de luz U.V. e registrados pelo sistema de fotodocumentação digital Alpha Innotech 2200.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo.

<i>Primer</i>	Sequência (5' para 3')	Região	No. pb	Referência
NS1	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C	rDNA 18S	19	White <i>et al.</i> ,1990
NS8	TCC GGA GGT TCA CCT ACG GA	rDNA 18S	20	White <i>et al.</i> ,1990
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	região intergênica	19	White <i>et al.</i> ,1990
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	região intergênica	20	White <i>et al.</i> ,1990

3.11 Digestão dos produtos de PCR com endonucleases de restrição

Os produtos de PCR foram digeridos com as seguintes enzimas de restrição: *Afa* I, *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hpa* II e *Sau* 3A I. Foram utilizados 3 μ L do produto gerado em reações de 15 μ l com 5U de enzima por reação. As

condições de temperatura foram empregadas de acordo com as recomendações do fabricante (Amersham Biosciences).

A observação do perfil de restrição obtido foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 3%. Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,1 µg/mL), visualizados em fonte de luz U.V. e registrados pelo sistema de fotodocumentação digital Alpha Innotech 2200.

3.12 Análise dos padrões de *fingerprinting*

Os perfis obtidos por PCR-RFLP da região ITS-5.8S DNAr foram analisados através do sistema binário bandas presentes (1) ou ausentes (0) para cada linhagem. Os fragmentos com peso molecular abaixo de 100 pb não foram considerados nas análises. A matriz de similaridade foi construída utilizando-se o programa de similaridade para dados qualitativos (SIMQUAL), com o coeficiente de Dice. Os dendrogramas foram construídos utilizando-se o algoritmo de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) por meio do programa NTSYS-PC (Rohlf, 1992).

3.13 Purificação dos produtos de amplificação para sequenciamento

Os produtos de amplificação correspondentes à região ITS – 5.8S DNAr das linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (E₉, B/Vi, C e 14), *M. album* (201), *M. flavoviride* (204 e 209) e *B. bassiana* (959, 2253 e 2629) foram purificados utilizando-se o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Biosciences) de acordo com as recomendações do fabricante, para posterior sequenciamento.

Após as purificações, o DNA das diferentes linhagens foi quantificado em gel de agarose 1%.

3.14 Sequenciamento da região ITS1 - 5.8S – ITS2 DNAr

As reações para sequenciamento dos DNAs correspondentes à região ITS1 - 5.8S – ITS2 DNAr foram efetuadas por meio de PCR com o kit Big Dye (Perkin Elmer) utilizando-se o *primer* ITS 1 e a purificação da reação foi feita segundo o fabricante do kit. As amostras de DNA foram secas, suspensas em tampão apropriado e submetidas à eletroforese no seqüenciador automático, marca Perkin Elmer, modelo ABI Prism Model 377 (LGE/IB/UNICAMP).

3.15 Análise filogenética

As seqüências obtidas neste estudo foram alinhadas com seqüências correspondentes à região ITS1 - 5.8S - ITS4 do DNAr de *Metarhizium anisopliae* (números de acesso AF 516295, AF 134150), *M. album* (no. acesso AF 137067), *M. flavoviride* (no. acesso AF 138269) e *Beauveria bassiana* (no. acesso BBA 345090), recuperadas da base de dados GenBank, utilizando-se o programa ClustalW. As análises filogenéticas foram efetuadas utilizando-se o programa GDE (gopher://megasun.bch.umontreal.ca:70/11/GDE). As matrizes de distância foram calculadas utilizando-se o método DNADIST e o parâmetro Kimura 2 de correção, implementado no programa PHYLIP V. 3.5 (Felsenstein, 1989). As árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se o algoritmo baseado no método de Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987).

3.16 “Desenho” e Síntese dos oligonucleotídeos (*primers*) específicos

As regiões selecionadas para o desenho de *primers* específicos foram analisadas por meio do programa Gene Runner versão 3.05 (<http://www.generunner.com>). A especificidade dos *primers* foi então confirmada por comparação com outras seqüências disponíveis no banco de dados GenBank/EMBL/DDBJ. Posteriormente, esta especificidade foi confirmada em reações de PCR com gradiente de temperatura para se obter as condições ideais de amplificação. Os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose 1,4 %, corado com brometo de etídio.

4 RESULTADOS

4.1 Amplificação do gene 18S DNAr e da região ITS1 – 5.8S – ITS2 DNAr

4.1.1 Análise do gene 18S DNAr

O potencial do gene ribossomal 18S para diferenciação de *Metarhizium* em nível de espécie foi avaliado por meio de análises de RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”). Foram amplificados os DNAs genômicos das seguintes linhagens: *M. anisopliae* var. *anisopliae* (E₉, B/Vi, C e 14), *M. album* (201), *M. flavoviride* (204 e 209) e *B. bassiana* (959, 2253 e 2629).

A amplificação com o par de *primers* NS1 e NS8 (Figura 1) resultou numa banda de aproximadamente 1.800 pares de bases (pb) somente para as linhagens pertencentes ao gênero *Metarhizium*, não ocorreu amplificação nas linhagens de *Beauveria*. Após a amplificação, os produtos obtidos foram submetidos às digestões com as enzimas de restrição *Afa* I, *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hpa* II e *Sau* 3A I. O perfil de restrição obtido está demonstrado na Tabela 3 e as digestões com *Afa* I, *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III estão ilustradas na Figura 2. A diferenciação entre as espécies deste gênero foi possível apenas com enzima *Afa* I.

Primers for amplification of small-subunit (SSU) rDNA

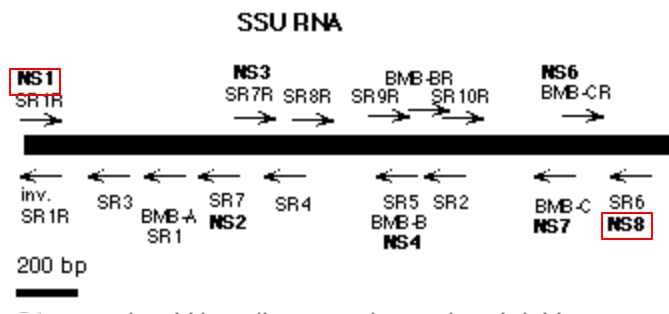


Figura 1 - Esquema do par de *primers* NS1 e NS8 da sub-unidade menor 18S.

Tabela 3. Perfil de restrição obtido a partir da digestão dos fragmentos de DNA correspondentes ao gene ribossômico 18S com diferentes enzimas.

Enzimas	Fragmentos em pares de bases	Linhagens
<i>Afa</i> I	120, 160, 460, 590, 900	<i>M. anisopliae</i> : E ₉ , B/Vi, C
	120, 160, 590, 900	<i>M. anisopliae</i> : 14
	160, 460, 590	<i>M. album</i> : 201
	150, 170, 400, 1000	<i>M. flavoviride</i> : 204 e 209
<i>Alu</i> I	120, 160, 350, 520, 560, 600	<i>M. anisopliae</i> : E ₉ , B/Vi
	120, 140, 160, 350, 520, 560, 600	<i>M. anisopliae</i> : C, 14
	120, 140, 350, 520, 600	<i>M. album</i> : 201 e <i>M. flavoviride</i> : 204 e 209
<i>Dde</i> I	100, 200, 310, 350, 500	<i>M. anisopliae</i> : E ₉ , B/Vi
	200, 310, 350, 500	<i>M. anisopliae</i> : C, 14
	240, 320, 900	<i>M. album</i> : 201 e <i>M. flavoviride</i> : 204 e 209
<i>Hae</i> III	100, 190, 260, 310, 500	<i>M. anisopliae</i> : E ₉ , B/Vi, C
	190, 260, 310, 500	<i>M. anisopliae</i> : 14; <i>M. album</i> : 201 e <i>M. flavoviride</i> : 204 e 209
<i>Hpa</i> II	200, 580, 750, 820	<i>M. anisopliae</i> : E ₉ , B/Vi, C
	200, 750, 820	<i>M. anisopliae</i> : 14
	200, 300, 650	<i>M. album</i> : 201 e <i>M. flavoviride</i> : 204 e 209
<i>Sau</i> 3A I	700, 850	<i>M. anisopliae</i> : E ₉ , B/Vi, C, 14
	700, 900	<i>M. album</i> : 201 e <i>M. flavoviride</i> : 204 e 209

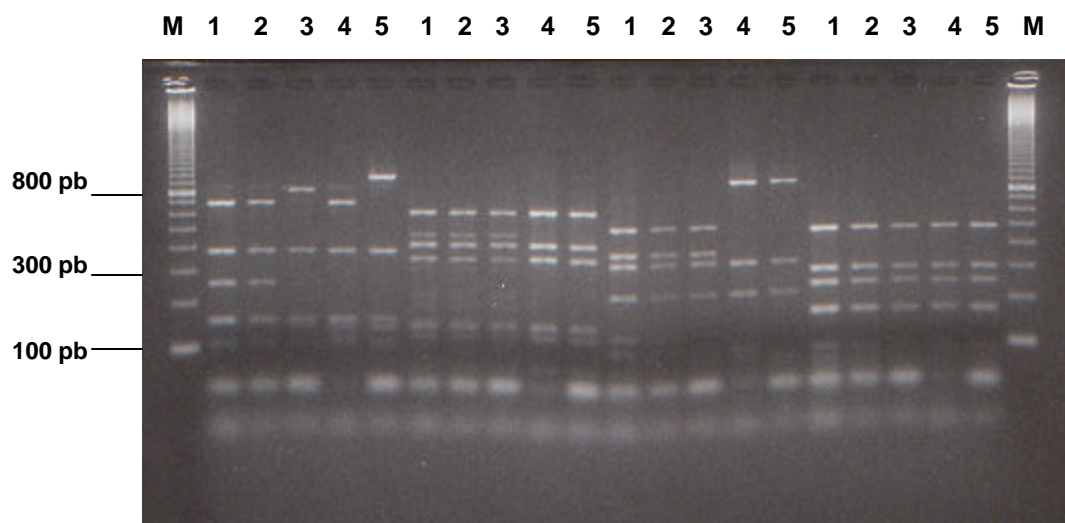


Figura 2 - Digestão do gene 18S com *Afa* I, *Alu* I, *Dde* I e *Hae* III, (M) marcador de peso molecular de 100pb (Pharmacia). *Metarhizium anisopliae* (1) E₉; (2) C; (3) 14; *M. album* (4) 201; *M. flavoviride* (5) 204.

4.1.2 Análise da região ITS1 - 5.8S – ITS2

A região ITS (Figura 3) também foi analisada nestas mesmas linhagens com o objetivo de se obter diferenciação clara entre as três espécies testadas, uma vez que nas análises do gene 18S somente a digestão com a enzima *Afa* I permitiu distinguir *M. anisopliae* de *M. album* e *M. flavoviride*. A amplificação com o par de *primers* ITS1 e ITS4 resultou num fragmento de aproximadamente 540 pb nas linhagens E₉, B/Vi, e C; de 600 pb na linhagem 14 de *M. anisopliae*; de 650 pb nas linhagens de *M. album* e de 600 pb na linhagem de *M. flavoviride*. Os produtos de amplificação foram digeridos com *Afa* I, *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hpa* II e *Sau* 3A I. O perfil de restrição obtido está demonstrado na Tabela 4 e ilustrado nas Figuras 4 e 5. A diferenciação entre essas espécies foi possível com todas as enzimas testadas

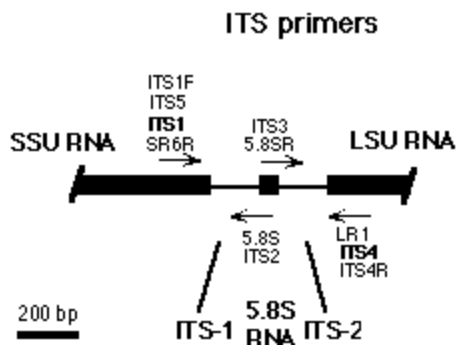


Figura 3.- Esquema dos *primers* utilizados para amplificação da região intergênica

Tabela 4. Perfil de restrição obtido a partir da digestão dos fragmentos de DNA, correspondentes à região intergênica, com diferentes enzimas.

Enzimas	Fragmentos em pares de bases	Linhagens
<i>Afa</i> I	540	<i>M. anisopliae</i> : E ₉ , B/Vi, C
	100, 500	<i>M. anisopliae</i> : 14
	180, 450	<i>M. album</i> : 201
	600	<i>M. flavoviride</i> : 209
<i>Alu</i> I	540	<i>M. anisopliae</i> : E ₉ , B/Vi, C
	200, 400	<i>M. anisopliae</i> : 14
	650	<i>M. album</i> : 201
	100, 450	<i>M. flavoviride</i> : 204 e 209
<i>Dde</i> I	150, 400	<i>M. anisopliae</i> : E ₉ , B/Vi, C
	180, 430	<i>M. anisopliae</i> : 14
	190, 450	<i>M. album</i> : 201
	160, 450	<i>M. flavoviride</i> : 204 e 209
<i>Hae</i> III	120, 410	<i>M. anisopliae</i> : E ₉ , B/Vi, C
	130, 450	<i>M. anisopliae</i> : 14
	100, 410	<i>M. album</i> : 201
	100, 390	<i>M. flavoviride</i> : 204 e 209
<i>Hpa</i> II	100, 360	<i>M. anisopliae</i> : E ₉ , B/Vi, C
	100, 370	<i>M. anisopliae</i> : 14
	100, 120, 250	<i>M. album</i> : 201
	100, 160, 340	<i>M. flavoviride</i> : 209

Tabela 4. Perfil de restrição obtido a partir da digestão dos fragmentos de DNA, correspondentes à região intergênica, com diferentes enzimas.

Enzimas	Fragmentos em pares de bases	Linhagens
<i>Sau</i> 3A I	170, 190, 210	<i>M. anisopliae</i> : E ₉ , B/Vi, C
	100, 120, 190, 210	<i>M. anisopliae</i> : 14
	210	<i>M. album</i> : 201
	180, 410	<i>M. flavoviride</i> : 209

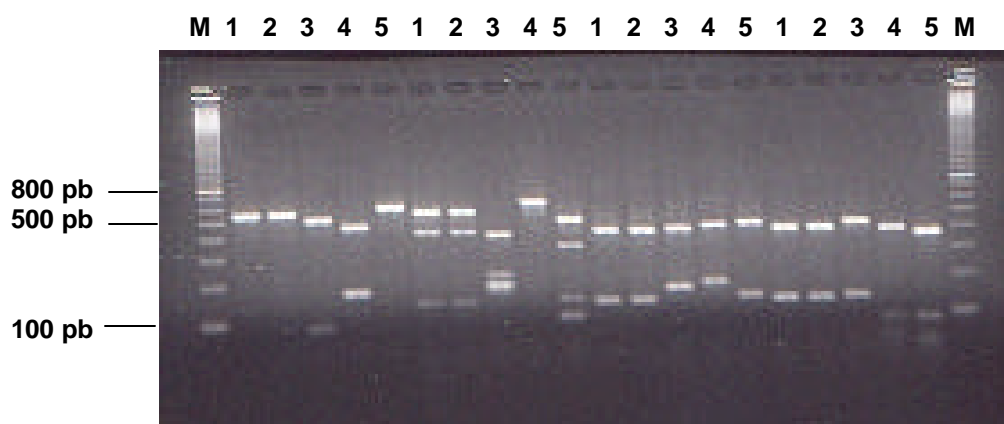


Figura 4 - Digestão da região espaçadora ITS com *Afa* I, *Alu* I, *Dde* I e *Hae* III, (M) marcador de peso molecular de 100pb (Pharmacia). *Metarhizium anisopliae* (1) E₉; (2) C; (3) 14; *M. album* (4) 201; *M. flavoviride* (5) 204.

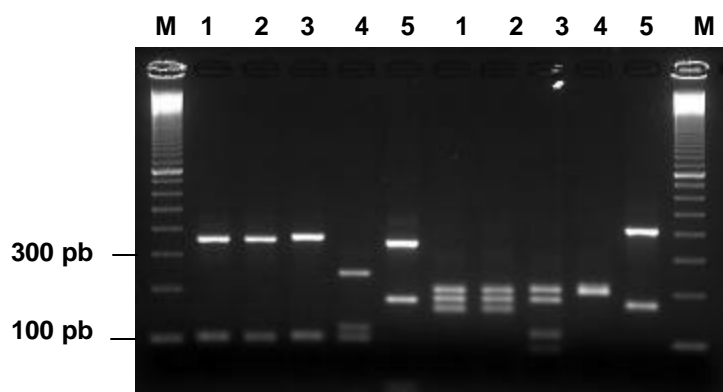


Figura 5 - Digestão da região espaçadora ITS com *Hpa* II e *Sau* 3A I. (M) marcador de peso molecular de 100pb (Pharmacia). *Metarhizium anisopliae* (1) E₉; (2) C; (3) 14; *M. album* (4) 201; *M. flavoviride* (5) 204.

4.1.3 Análise de PCR-RFLP da região ITS1 - 5.8S – ITS2

Os resultados obtidos no PCR-RFLP das diferentes espécies de *Metarhizium* foram analisados para construção de uma matriz de similaridade utilizando-se o coeficiente de Dice. A linhagem de *M.a. var. anisopliae* B/Vi foi excluída desta análise por ser um mutante auxotrófico da linhagem E₉ que apresentou perfis idênticos à mesma. O dendrograma obtido revelou três grupos muito distintos: o grupo I compreendeu as linhagens de *M.a. var. anisopliae* E₉, C e 14 sendo que as duas primeiras apresentaram 100 % de similaridade entre si e apenas 33% aproximadamente com a linhagem 14; o grupo II ficou representado pela linhagem 201 de *M. album*, com aproximadamente 24% de similaridade com a espécie de *M. anisopliae*; e o grupo III ficou composto pela linhagem 204 de *M. flavoviride* com apenas 5 % de similaridade com as demais espécies (Figura 6).

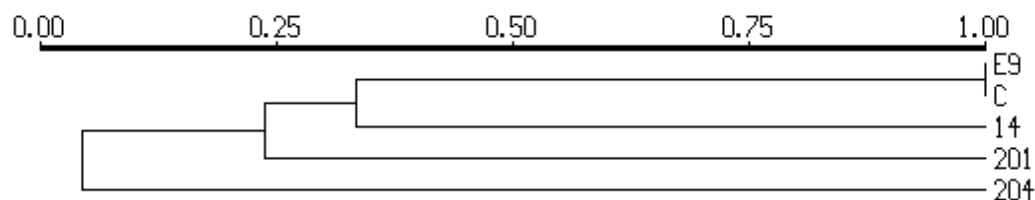


Figura 6 - Dendrograma de similaridade obtido com o coeficiente de Dice.

4.2 Sequenciamento da região ITS1 – 5.8S – ITS2 DNAr de diferentes espécies de *Metarhizium* e *Beauveria bassiana*

As diferenças detectadas na região ITS1 – 5.8S – ITS2 DNAr das linhagens de *Metarhizium* obtidas por PCR-RFLP indicaram a possibilidade de desenho de *primers* específicos desta região para a detecção e identificação de *M. anisopliae*. Linhagens de *M. album*, *M. flavoviride* e *B. bassiana* também foram incluídas. A quantidade de produto de amplificação da região nas linhagens de *Beauveria* foi inferior às outras linhagens, porém suficiente para o sequenciamento (Figura 7).

Após amplificação da região ITS1 – 5.8S – ITS2 DNAr das linhagens de *M.a* var. *anisopliae* (E₉; BVi; C e 14); *M. album* (201); *M. flavoviride* (204 e 209) e *Beauveria bassiana* (959, 2253 e 2629), os produtos resultantes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para purificação dos fragmentos por meio de um kit de purificação.

Os produtos purificados e quantificados foram submetidos à eletroforese em sequenciador automático do Laboratório de Genômica do Departamento de Microbiologia e Genética da UNICAMP. Os dados das seqüências obtidas encontram-se no Anexo.

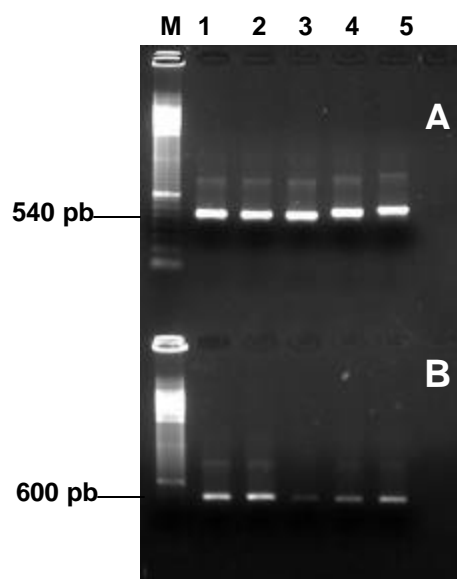


Figura 7 - Amplificação da região ITS em diferentes espécies de *Metarhizium* e *Beauveria*. (M) marcador de peso molecular de 100pb (Pharmacia). (A) *Metarhizium anisopliae*: (1) E₉; (2) BVi; (3) C; (4) 14; *M. album*: (5) 201; (B) *M. flavoviride* (1) 204; (2) 209; *Beauveria bassiana* (3) 959; (4) 2253 e (5) 2629.

4.3 Análise filogenética da região ITS1 - 5.8S - ITS2 do operon ribossômico

Sequências correspondentes à região ITS1 - 5.8S - ITS4 do DNAr das linhagens do presente estudo foram comparadas com seqüências de *M. anisopliae* (números de acesso AF516295 e AF134150), *M. album* (no. acesso AF137067), *M. flavoviride* (no. acesso AF138269) e *B. bassiana* (no. acesso BBA345090), depositadas na base de dados GenBank. O alinhamento e análise filogenética destas seqüências revelaram agrupamentos que confirmaram a identidade taxonômica das linhagens usadas neste trabalho. A linhagem de *M. album* 201 agrupou com a seqüência de uma linhagem da mesma espécie recuperada do banco de dados. Com relação à espécie *M. flavoviride*, foi

observado que as linhagens 204 e 209 formaram um agrupamento com a linhagem de *M. flavoviride* recuperada do GenBank, embora a linhagem 204 tenha se mostrado filogeneticamente mais distante. As linhagens E₉, B/Vi e C pertencentes à espécie *M. anisopliae* var. *anisopliae* mostraram-se filogeneticamente idênticas entre si e com relação à linhagem de *M. anisopliae* (AF516295). A linhagem 14, oriunda da Austrália, não se agrupou com as outras linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, mostrando-se isolada no dendrograma e filogeneticamente distante das demais linhagens utilizadas nesta análise. Estes dados corroboram os resultados obtidos nas análises de PCR-RFLP, onde as diferenças de tamanho e composição de sequência desta linhagem são refletidas como perfis polimórficos (Figuras 4 e 5). Quanto à espécie *Beauveria bassiana*, as linhagens utilizadas neste estudo formaram um agrupamento coerente com a linhagem cuja sequência foi recuperada da base de dados (Figuras 8 e 9).

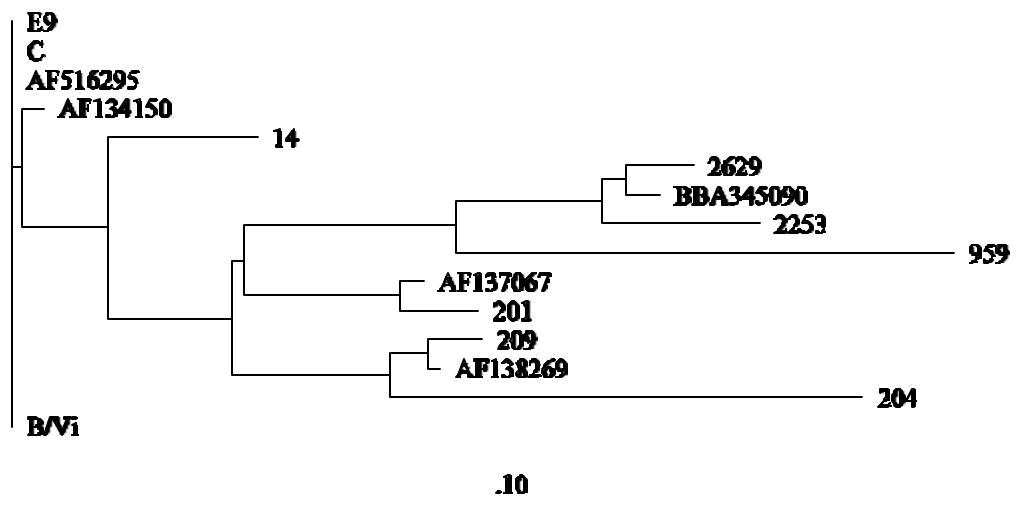


Figura 8 - Dendrograma resultante do alinhamento das seqüências ITS1 – 5.8S – ITS2 DNAr de diferentes espécies de *Metarhizium* e *Beauveria bassiana*.

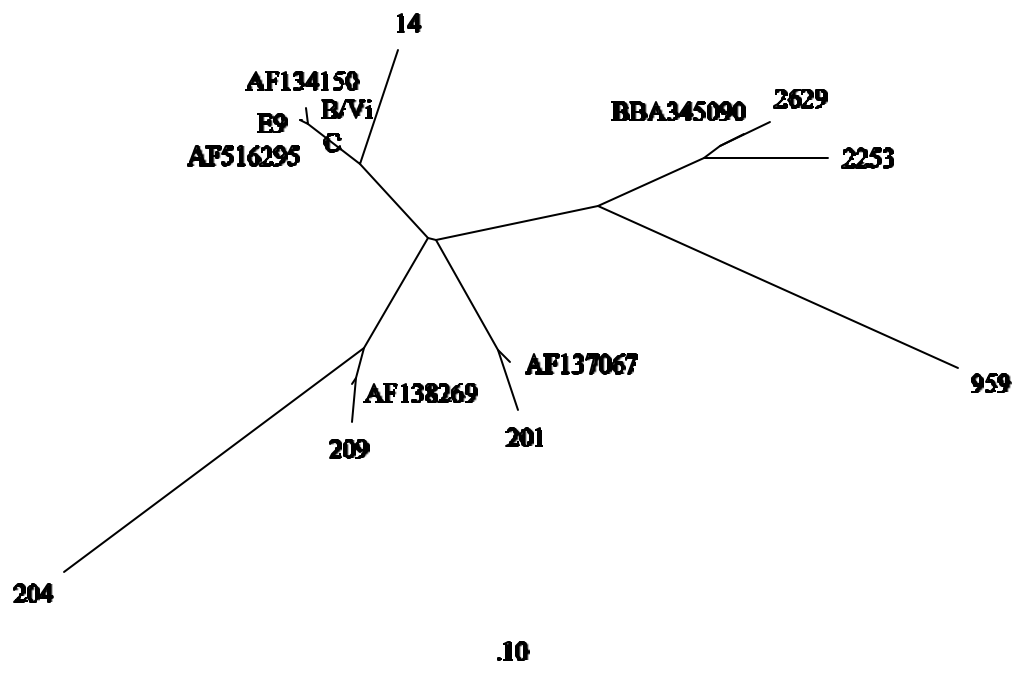


Figura 9 - Fenograma resultante do alinhamento das seqüências ITS1 – 5.8S – ITS2 DNAr de diferentes espécies de *Metarhizium* e *Beauveria bassiana*.

4.4 Desenho de *primers* específicos

Os dados de alinhamento por meio do programa ClustalW revelaram diferenças claras entre as linhagens seqüenciadas e, portanto, decidiu-se desenhar apenas o *primer forward* e utilizar o *primer* ITS 4 como *primer reverse*. As análises de alinhamento mostraram que a região ITS da linhagem 14 de *M. anisopliae* é muito diferente das demais analisadas e, assim, optou-se em desenhar *primers* distintos para essas linhagens.

O *primer forward* específico para as linhagens E₉, B/Vi e C de *M. anisopliae* foi denominado ITSMet (5' TCT GAA TTT TTT ATA AGT AT 3') com temperatura de anelamento (T_m) de 46,5^o C; e para a linhagem 14 o *primer* foi denominado ITS14 (5' GAA ACC GGG ACT AGG CGC 3') com T_m de 66,8^o C. Foram realizados experimentos de gradiente de temperatura de anelamento para verificar qual a melhor condição para os diferentes pares de *primers* a serem analisados. A linhagem de *M.a. var. anisopliae* E₉ foi utilizada nos testes com o par de *primers* ITSMet/ITS4 e a linhagem de *M.a. var. anisopliae* 14 nas amplificações com o par de *primers* ITS14/ITS4 (Figura 10). As amplificações resultaram num fragmento de aproximadamente 440 pb com o par de *primers* ITSMet/ITS4 e 490 pb com ITS14/ITS4.

Os resultados desses experimentos mostraram que 46^o C seria a temperatura de anelamento ideal para o par de *primers* desenhado para as linhagens E₉, B/Vi e C e 61^o C para o par de *primers* desenhado para a linhagem 14.

Após determinação das temperaturas ideais de amplificação, foram realizados experimentos para determinação de condições específicas de amplificação para diferenciar a linhagem 14 das demais pertencentes à espécie de *M. anisopliae var. anisopliae*. Assim, as linhagens E₉ e 14 foram testadas com os *primers* ITSMet/ITS4 e ITS14/ITS4 nas temperaturas de anelamento de 46^o C e 61^o C, respectivamente. O DNA extraído de inseto sadio foi também incluído nesses experimentos como controle negativo das amplificações.

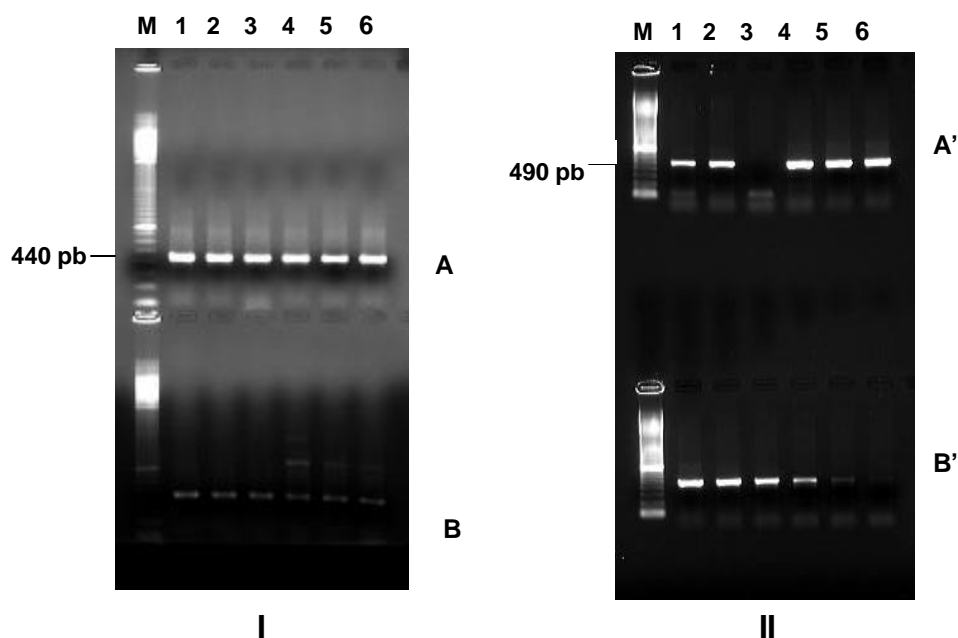


Figura 10 - (I) Gradiente de temperatura entre 40 e 55°C para teste de especificidade para *M. anisopliae* com o par de *primers* ITSMet/ITS4. (M) marcador de peso molecular de 100pb (Pharmacia). (A) (1) 40°C; (2) 40,4°C; (3) 41,2°C; (4) 42,5°C; (5) 44,2°C; (6) 46,4°C; (B) (1) 48,9°C; (2) 51°C; (3) 52,7°C; (4) 53,8°C; (5) 54,7°C; (6) 55°C. (II) Gradiente entre 50 e 62°C para teste de especificidade para a linhagem 14 com o par de *primers* ITS14/ITS4. (M) marcador de peso molecular de 100pb (Pharmacia). (A') (1) 50°C; (2) 50,3°C; (3) 50,9°C; (4) 52°C; (5) 53,4°C; (6) 55,2°C; (B') (1) 57,2°C; (2) 58,9°C; (3) 60,2°C; (4) 61,1°C; (5) 61,8°C; (6) 62°C.

A amplificação com o par de *primers* ITSMet/ITS4 a 46 ° C, específico para as linhagens E₉, B/Vi e C, resultou na amplificação do fragmento de 440 pb com menor intensidade na linhagem 14. Quando a temperatura de anelamento foi aumentada para 47° C, não ocorreu amplificação deste fragmento na linhagem 14, tornando-se a condição ideal para amplificação apenas das linhagens E₉, B/Vi e C. Com relação ao par de *primers* ITS14/ITS4, específico para a linhagem de *M.a. var. anisopliae* 14, os experimentos foram

efetuados com temperatura de anelamento de 60° C e 61° C e verificou-se que a 61° C não ocorre amplificação das linhagens de *M.a. var. anisopliae* E₉, B/Vi e C, tornando-se a condição ótima de especificidade para a amplificação da linhagem de *M.a. var. anisopliae* 14 (Figura 11).

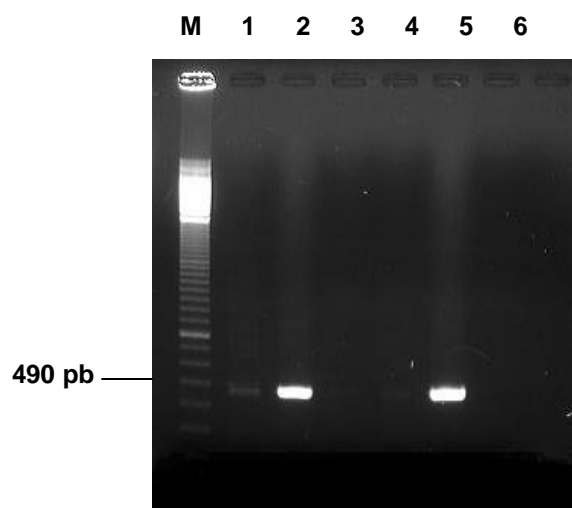


Figura 11 - Amplificação com o par de *primers* ITS14/ITS4 para teste de especificidade entre as linhagens E₉ e 14 de *M. anisopliae* e DNA do inseto sadio. (M) marcador de peso molecular de 100pb (Pharmacia). Temperatura anelamento de 60°C: (1) E₉; (2) 14; (3) inseto; Temperatura de anelamento de 61°C: (4) E₉; (5) 14; (6) inseto.

Foram desenhados também *primers* específicos para os fungos *Metarhizium flavoviride*, linhagem 209, e *Beauveria bassiana*, linhagens ARSEF 959, 2253 e 2629.

4.5 Detecção de *M. anisopliae* var. *anisopliae* em insetos infectados

Foram efetuadas extrações de DNA total de insetos infectados após 48h de exposição às linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* E₉, B/Vi, C e 14. Os experimentos de amplificação com os *primers* ITSMet/ITS4 e ITS14/ITS4 foram realizados utilizando-se o DNA de culturas puras das respectivas linhagens do fungo como controle positivo e DNA de insetos saudios como controle negativo (Figura 12).

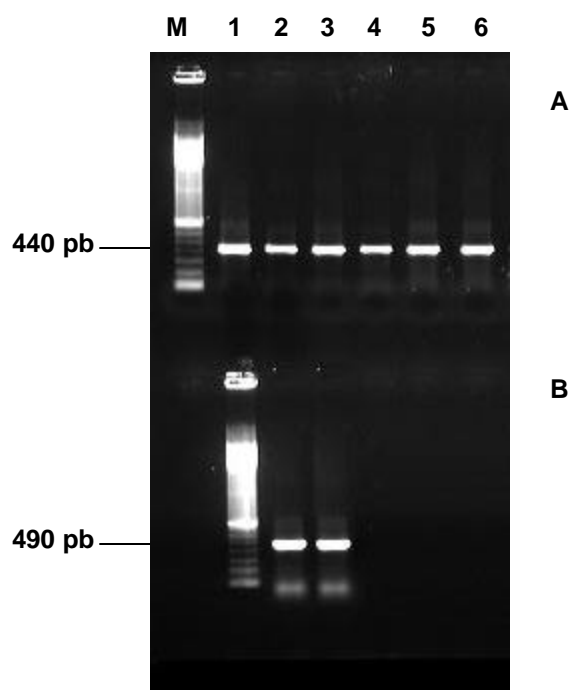


Figura 12 - Teste de amplificação com DNAs extraídos de insetos infectados utilizando-se os *primers* ITSMet/ITS4 (A) e (B) ITS14/ITS4.. (M) marcador de peso molecular de 100pb (Pharmacia) (A) (1) E₉; (2) E₉+inseto; (3) B/Vi; (4) B/Vi+inseto; (5) C; (6) C+inseto; (B) (1) 14; (2) 14+inseto.

4.6 RFLP dos fragmentos específicos obtidos para confirmação da detecção de *M.a. var. anisopliae* nos insetos infectados

A confirmação de que os fragmentos amplificados a partir do DNA extraído de insetos infectados correspondiam à região ITS de *M.a. var. anisopliae* foi efetuada por meio da utilização de enzimas de restrição, utilizando-se os DNAs extraídos de culturas puras do fungo como controle. Os produtos de amplificação foram digeridos com *Afa* I, *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Sau* 3A I e *Taq* I e os resultados obtidos estão ilustrados nas Figuras 13, 14, 15, e 16.

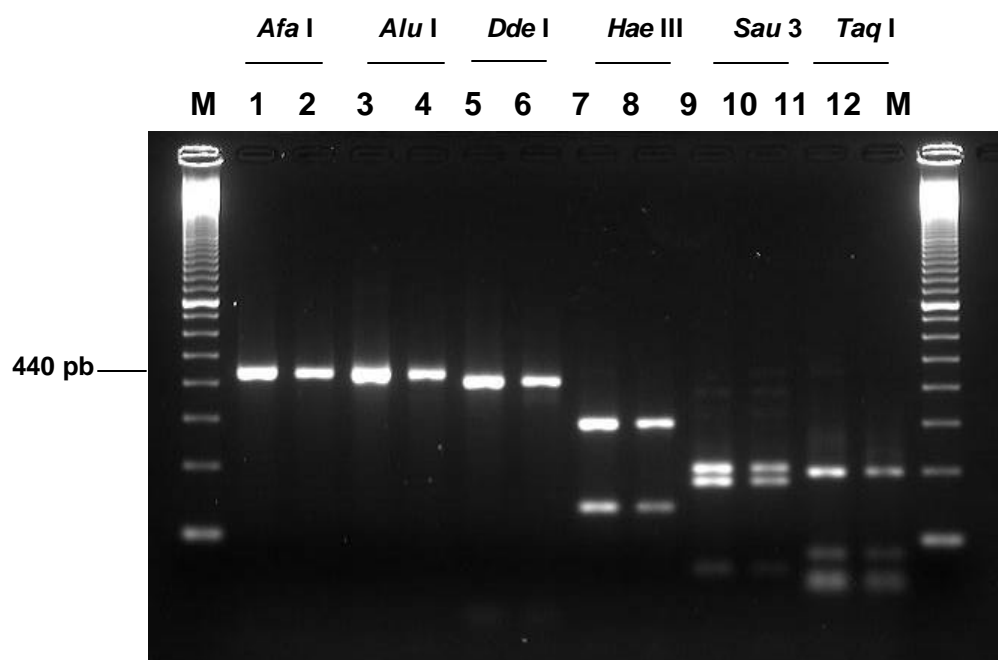


Figura 13 - Digestão dos produtos de amplificação gerados com o par de *primers* ITSMet/ITS4 com endonucleases de restrição. (M) marcador de peso molecular de 100pb (Pharmacia) (1) *E₉-Afa* I; (2) *E₉+inseto-Afa* I; (3) *E₉-Alu* I; (4) *E₉+inseto-Alu* I; (5) *E₉-Dde* I; (6) *E₉+inseto-Dde* I; (7) *E₉-Hae* III; (8) *E₉+inseto-Hae* III; (9) *E₉-Sau* 3A I; (10) *E₉+inseto-Sau* 3A I; (11) *E₉-Taq* I; (12) *E₉+inseto-Taq* I.

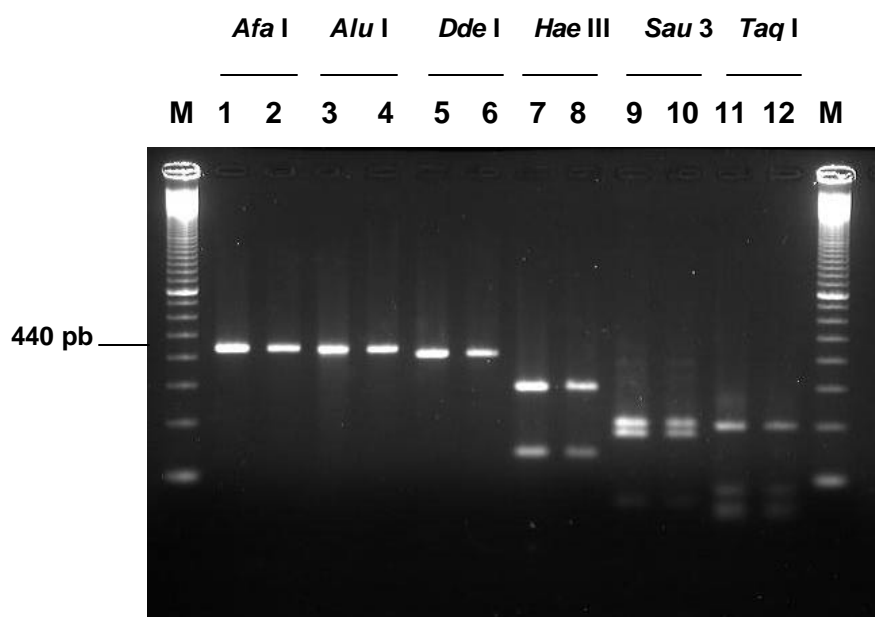


Figura 14 - Digestão dos produtos de amplificação gerados com os *primers* ITSMet/ITS4 com diferentes endonucleases de restrição. (M) marcador de peso molecular de 100 pb (Pharmacia) (1) B/Vi-*Afa* I; (2) B/Vi+inseto-*Afa* I; (3) B/Vi-*Alu* I; (4) B/Vi+inseto-*Alu* I; (5) B/Vi-*Dde* I; (6) B/Vi+inseto-*Dde* I; (7) B/Vi-*Hae* III; (8) B/Vi+inseto-*Hae* III; (9) B/Vi-*Sau* 3A I; (10) B/Vi+inseto-*Sau* 3A I; (11) B/Vi-*Taq* I; (12) B/Vi+inseto-*Taq* I.

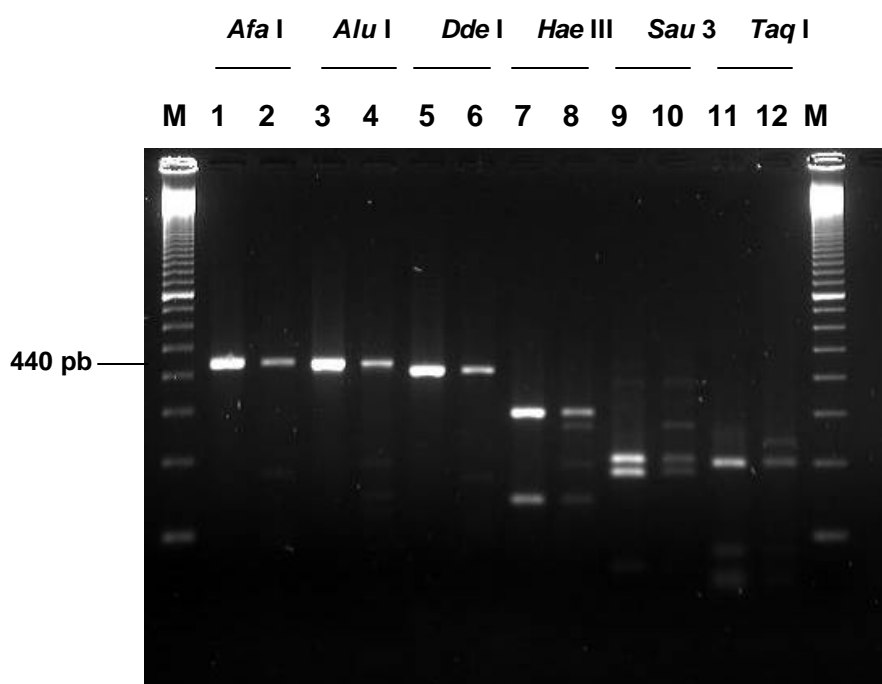


Figura 15 - Digestão dos produtos de amplificação gerados com o par de *primers* ITS*Met*/ITS4 com diferentes endonucleases de restrição. (M) marcador de peso molecular de 100pb (Pharmacia) (1) *GAfa* I; (2) C+inseto-*Afa* I; (3) C-*Alu* I; (4) C+inseto-*Alu* I; (5) C-*Dde* I; (6) C+inseto-*Dde* I; (7) C-*Hae* III; (8) C+inseto-*Hae* III; (9) C-*Sau* 3A I; (10) C+inseto-*Sau* 3A I; (11) C-*Taq* I; (12) C+inseto-*Taq* I.

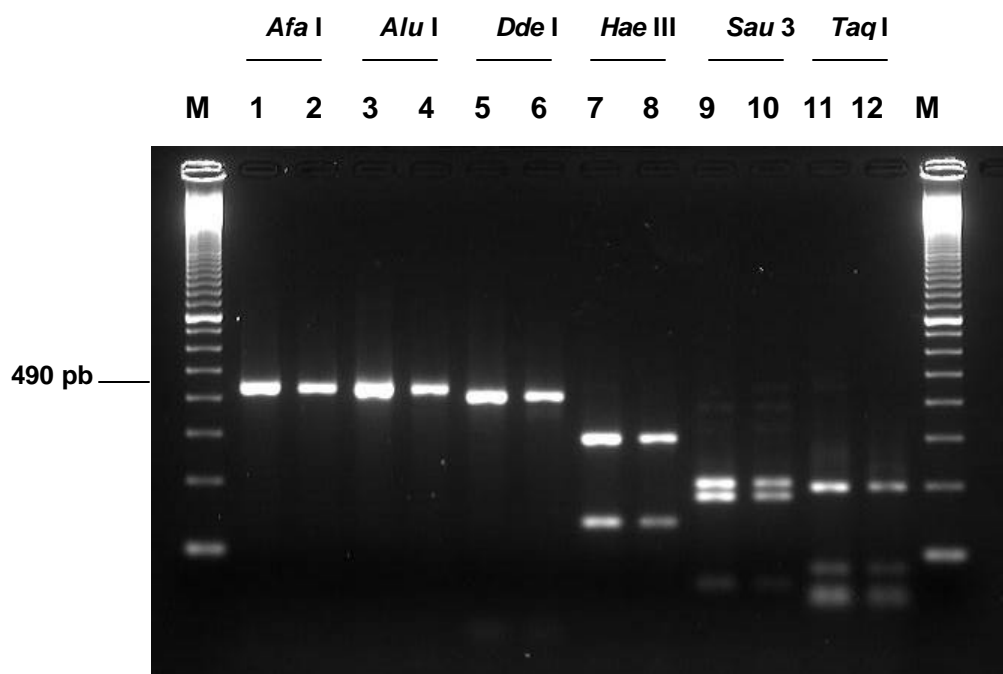


Figura 16 - Digestão dos produtos de amplificação gerados com o par de *primers* ITS14/ITS4 com diferentes endonucleases de restrição. (M) marcador de peso molecular de 100pb (Pharmacia) (1) 14-*Afa* I; (2) 14+inseto-*Afa* I; (3) 14-*Alu* I; (4) 14+inseto-*Alu* I; (5) 14-*Dde* I; (6) 14+inseto-*Dde* I; (7) 14-*Hae* III; (8) 14+inseto-*Hae* III; (9) 14-*Sau* 3A I; (10) 14+inseto-*Sau* 3A I; (11) 14-*Taq* I; (12) 14+inseto-*Taq* I.

5 DISCUSSÃO

Estudos relacionados à utilização de micoinseticidas biológicos têm sido realizados representando uma inovação alternativa para o controle de pragas. De forma paralela há uma grande preocupação em relação aos efeitos positivos e negativos inerentes a toda nova forma de controle. O monitoramento de todas as fases de uma implementação de projetos de manejo de pragas envolvendo microrganismos é uma necessidade, pois a produção e aplicação de tais organismos devem ser acompanhadas de procedimentos de padronização rigorosa e mecanismos de avaliação de dispersão e instalação de epizootias no meio ambiente, através de metodologia específica e com maior segurança possível.

Os poucos micoinseticidas prontos para utilização em escala comercial requerem ferramentas sensíveis e específicas para identificação tanto no estágio de produção como em situação de campo. Entre os exemplos de fungos disponíveis no mercado ou aqueles que estão em desenvolvimento em alguns países encontram-se os gêneros *Beauveria*, *Cordyceps*, *Entomophthora*, *Metarhizium*, *Nomureae*, *Paecilomyces* e *Verticillium* (Alves, 1998).

As vantagens em se utilizar o fungo *Metarhizium* no controle microbiano de pragas são a simplicidade de produção em larga escala das suas unidades infectivas, os conídios, a facilidade de aplicação destes em condições de campo, e atualmente o baixo custo decorrido de sua utilização, além do reduzido impacto ambiental.

A necessidade de se desenvolver uma metodologia bastante precisa de diagnóstico da doença causada pelo fungo, num período relativamente curto,

representa grande auxílio no monitoramento da introdução, dispersão e controle da ação entomopatogênica do fungo utilizado tanto para os insetos pragas como para os insetos não alvo, e, ainda, a segurança certificada da ação efetiva e específica do microrganismo em nível de gênero, e em muitos casos até em nível de espécie.

O objetivo deste trabalho foi construir *primers* específicos que funcionassem com precisão como marcadores moleculares para a detecção e identificação de *Metarhizium anisopliae*, durante o processo infeccioso em larvas de broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* utilizadas como inseto hospedeiro.

O período de 48 horas após o contato entre o patógeno e o hospedeiro, representou um espaço curto de tempo para a recuperação e identificação segura do entomopatógeno dentro do hospedeiro, dado que, por meio de metodologias microbiológicas e bioquímicas clássicas, um tempo muito maior seria necessário para a realização de testes de confirmação da efetiva infecção.

Historicamente, a identificação de fungos entomopatogênicos vinha sendo realizada somente baseada na conidiogênese celular, morfologia dos esporos, características bioquímicas, e propriedades imunológicas. Para *Beauveria bassiana*, diversas técnicas de genética molecular foram desenvolvidas (Kosir et al., 1991; Pfeifer & Khachatourians, 1993) incluindo a construção de uma série de probes de DNA genômico que exibem especificidade para *B. bassiana*, inclusive para discriminação entre isolados (Hegedus & Khachatourians, 1993a).

A identificação individual de linhagens através da utilização dos *fingerprintings* genômicos apresenta uma série de aplicações práticas para os programas de melhoramento genético de fungos entomopatogênicos. Ela torna possível o acompanhamento individual de linhagens utilizadas em ensaios de competição no campo e a distinção entre as linhagens ensaiadas e as autóctones. Ensaios de persistência ambiental também poderão ser conduzidos de maneira mais precisa e segura (Braga, 1997).

A amplificação de ácidos nucleicos pelo processo de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) revolucionou muitos procedimentos na biologia molecular, inclusive as metodologias relacionadas com identificação e tipagem de microrganismos. O protocolo de extração de DNA genômico total utilizado neste estudo produziu uma quantidade reduzida de DNA das larvas infectadas pelo fungo em comparação com as extrações efetuadas com material de culturas puras de *Metarhizium*, porém suficiente para os experimentos de amplificação. Dados de literatura mostram que a amplificação de DNA de amostras ambientais é freqüentemente difícil devido à presença de compostos inibitórios que interferem nos experimentos de PCR (Hegedus and Khachatourians, 1996b). Ainda, amostras de plantas (Do & Adams, 1991) e fungos (Pfeifer & Khachatourians, 1993) podem conter certos polissacarídeos que podem causar problemas na amplificação. No caso do isolamento de DNA de insetos, a cutícula pode apresentar um número significativo de compostos, considerados fortes inibidores da PCR (Hackman, 1974). Neste trabalho, o protocolo utilizado (Garber & Yoder, 1983) permitiu a obtenção de DNA de larvas infectadas com pureza suficiente para a amplificação direta dos produtos específicos, sendo que os produtos obtidos apresentaram concentração de DNA muito semelhante às obtidas com material de culturas puras.

Ferramentas moleculares, incluindo a análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP) do DNA mitocondrial e nuclear, amplificação de fragmentos específicos com o uso de oligonucleotídeos também desenhados especificamente, para uso em PCR da região espaçadora intergênica (ITS) e das subunidades do DNAr, têm sido utilizadas para analisar variações inter e infra-específicas em várias espécies de fungos (Bruns et al., 1991).

A amplificação de genes ribossomais e regiões espaçadoras ITS e IGS tem sido amplamente utilizada em estudos de taxonomia (Driver et al., 2000), de filogenia (Rakotonirainy et al., 1994), de diversidade genética (Anderson et al., 2001; Uetake et al. 2002) e na identificação e diferenciação de espécies (Fouly et al., 1997).

As linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. album* e *M. flavoviride* foram examinadas com relação ao gene ribossomal 18S e as análises de polimorfismos deste gene revelaram diferenças que puderam separar as espécies de *Metarhizium*, dependendo da enzima de restrição utilizada, entretanto, este marcador tem sido indicado para diferenciação em nível de gênero. Por outro lado, as regiões ITS e IGS são menos conservadas e, portanto, mais adequadas para estudos em nível de espécie e infra-específicos. No presente estudo, os produtos amplificados, correspondentes à região espaçadora ITS1 – 5.8S – ITS2, mostraram variação no tamanho entre as espécies de *Metarhizium* analisadas. A variação no tamanho de produtos de amplificação tem sido apontada como um bom marcador molecular para muitas espécies de fungos (Pechia et al., 1998; Fouly et al., 1997; Jiang & Hiruki, 1996). No presente trabalho, a amplificação da região espaçadora ITS1 – 5.8S – ITS2 resultou em fragmentos de tamanhos diferentes para as três espécies analisadas, sendo que dentro da espécie *M.a.* var. *anisopliae* a linhagem 14, oriunda da Austrália, apresentou fragmento maior que as linhagens da mesma espécie oriundas do Brasil.

Em estudos de variabilidade genética de fungos tem sido comum o uso de *primers* correspondentes à região ITS para a identificação de espécies (Anderson et al., 1998). O alto polimorfismo da região espaçadora obtido com as diferentes endonucleases de restrição (PCR-RFLP) permitiu concluir que esta região pode ser tranqüilamente utilizada como marcador molecular para diferenciação das espécies *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. album* e *M. flavoviride*. O dendrograma construído a partir desses dados mostrou claramente que a linhagem 14 de *M.a.* var. *anisopliae* é realmente diferente das demais da mesma espécie e que *M. album* e *M. flavoviride* constituem grupos bem distintos (Figura 6).

A variabilidade detectada nas seqüências ITS tem sido considerada como uma ferramenta muito útil na discriminação de diferentes espécies de fungos (Neueglise et al., 1994; Fouly et al., 1997; Jensen & Eilenberg, 2001;

Anderson et al., 2001; Thomsen & Jensen, 2002). Nossos dados de PCR-RFLP mostraram que a variação no tamanho e sítios de restrição na região ITS1 – 5.8S – ITS2 poderia ser utilizada para a construção de *primers* específicos para essas linhagens. Além das linhagens de *Metarhizium* utilizadas neste estudo, linhagens de *Beauveria bassiana* também foram incluídas nos experimentos de sequenciamento da região espaçadora, uma vez que este fungo também é amplamente utilizado no controle microbiano de pragas, e *primers* específicos para a detecção e identificação deste microrganismo também seria interessante. O seqüenciamento dessa região permitiu a comparação com seqüências de outras linhagens de *Metarhizium* depositadas no banco de dados GenBank e o alinhamento e análise filogenética confirmaram a identidade taxonômica dos isolados em estudo. Esses resultados corroboram com Rakotonirainy et al. (1994), que utilizando a técnica de seqüenciamento do gene 28S DNAr e análises filogenéticas, puderam separar *M. flavoviride* de *M. anisopliae*. Neste mesmo estudo foi verificado que linhagens da espécie *M. anisopliae* oriundas da Nova Zelândia são geneticamente muito distantes das linhagens típicas da mesma espécie. Os resultados obtidos neste estudo com a linhagem 14, oriunda da Austrália, sugerem que a espécie *M. anisopliae* pode conter um grupo de isolados que tenham evoluído geneticamente de forma diferente, entretanto, um número maior de isolados de áreas geográficas próximas devem ser investigados para confirmação de tal hipótese.

Os dados de seqüenciamento da região ITS1 – 5.8S – ITS2 obtidos neste estudo permitiram o desenho do *primer* ITSMet, específico para as linhagens de *M. anisopliae* oriundas do Brasil e ITSMet14 para a linhagem 14 oriunda da Austrália. A estratégia de utilizar o *primer* ITS4 como *primer reverse* mostrou-se adequada, pois os fragmentos específicos obtidos corresponderam aos fragmentos esperados.

Primers específicos têm sido desenvolvidos para a detecção e identificação de alguns fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* (Hegedus & Khachatourians, 1996b), *Gliocladium catenulatum* (Paavanen-

Huhtala et al., 2000) e *Metarhizium anisopliae* (Leal et al, 1997). O conjunto de *primers* ITSMet/ITS4, correspondente à região ITS de *M.a. var. anisopliae*, mostrou-se altamente específico para a diferenciação das espécies de *M. anisopliae*, *M. album* e *M. flavoviride*. Nos experimentos preliminares de amplificação com DNA obtido de culturas puras verificou-se o aparecimento de uma banda de amplificação de baixa intensidade para a linhagem 14, considerada muito distinta das linhagens de *M.a. var. anisopliae* oriundas do Brasil. Entretanto, este fato não ocorreu quando o DNA testado era proveniente de larvas infectadas pelo fungo. Embora relatos de literatura mostrem que amostras de DNA de insetos podem conter inibidores de amplificação por PCR (Hackman, 1974), a quantidade de DNA dos produtos obtidos nas amplificações utilizando-se os *primers* específicos foi muito similar à obtida com culturas puras. Em adição, *primers* específicos para *M. album*, *M. flavoviride* e *Beauveria bassiana* também puderam ser desenvolvidos.

Sistemas de detecção baseados no DNA para o estudo de patologia de insetos apresentam uma grande vantagem uma vez que o agente fúngico pode ser detectado dentro de insetos infectados ou tecidos, antes da sua morte ou princípio de mumificação e sem o uso de métodos não específicos como a microscopia (Hegedus & Khachatourians, 1996b). Hegedus & Khachatourians (1996b), trabalhando com *Beauveria bassiana*, verificaram que o fungo pode ser detectado depois de 5 a 7 dias pós-inoculação em *Melanoplus sanguinipes* (gafanhoto migratório), sugerindo que este nível de sensibilidade seria suficiente para detectar o fungo dentro dos insetos infectados antes da emergência das estruturas do patógeno para o exterior dos cadáveres.

Em nossos experimentos a presença do fungo *M. anisopliae* var. *anisopliae* dentro do hospedeiro *Diatraea saccharalis* pode ser detectada 48 horas após o contato patógeno-hospedeiro, por meio da utilização de amplificação por PCR com *primers* específicos; ou seja, o presente estudo desenvolveu um sistema simples, rápido, específico e seguro para detecção

deste fungo dentro do hospedeiro sem a necessidade da utilização de técnicas como hibridização e seqüenciamento.

6 CONCLUSÕES

- 1 o protocolo de extração de DNA utilizado permitiu a obtenção de DNA com de boa qualidade, sem degradação e possivelmente isento de inibidores, uma vez que não houve diferença na quantidade de DNA obtida nas amplificações com DNA de culturas puras e DNA de larvas infectadas;
- 2 a metodologia de polimorfismo da região ITS1 – 5.8S – ITS2 (PCR-RFLP) mostrou-se altamente eficiente para diferenciação das espécies de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *M. album* e *M. flavoviride*;
- 3 o alinhamento e análises filogenéticas permitiram o desenvolvimento de *primers* específicos para as diferentes espécies de *Metarhizium*;
- 4 o conjunto de *primers* ITSMet/ITS4 mostrou-se específico para as linhagens de *M.a.* var. *anisopliae* E₉, B/Vi e C;
- 5 o conjunto de *primers* ITSMet14/ITS4 foi desenvolvido especificamente para a detecção da linhagem 14 de *M.a.* var. *anisopliae* oriunda da Austrália, a qual mostrou-se distinta das outras linhagens da mesma espécie;
- 6 a técnica de restrição com endonucleases dos produtos de amplificação obtidos de DNA de larvas infectadas utilizando-se os *primers* específicos desenhados mostrou-se adequada para confirmação da identificação do fungo dentro do inseto;

- 7 a utilização dos *primers* específicos ITSMet e ITSMet14 na detecção e identificação de *M. anisopliae* var. *anisopliae* permitirá avaliar a padronização de produção deste entomopatógeno em nível de laboratório ou escala comercial, e, a eficiência, especificidade ao hospedeiro, persistência e distribuição temporal-espacial de linhagens do fungo no campo. Esta técnica poderá ser também de muita utilidade em monitoramento de linhagens de fungos liberados em campo como agentes microbianos de controle em determinados ecossistemas.

ANEXO: Alinhamento de sequências

ANEXO - Alinhamento das sequências de nucleotídeos da região ITS1 – 5.8S – ITS2 das linhagens de *M.a. var. anisopliae* E₉, B/Vi, C e 14; *M. album* 201; *M. flavoviride* 204 e 209; *Beauveria bassiana* 959, 2253 e 2629; e outras seqüências ITS disponíveis no banco de dados GenBank database: *M.a. var. anisopliae* (AF516295 e AF134150), *M. album* (AF137067), *M. flavoviride* (AF138269) e *Beauveria bassiana* (BBA345090). Os *primers* específicos desenvolvidos ITSMet and ITSMet14 estão assinalados em caixas coloridas.

AF516295	attgttgctt	---cgg----	-----	-----	-----	
AF134150	attgttgctt	---cgg----	-----	-----	-----	
E9	aaggttgcnt	t--cgg----	-----	-----	-----	
C	attgttgcnt	t--cgg----	-----	-----	-----	
B/Vi	attgttgctt	---cgg----	-----	-----	-----	
14	actgttgctt	cggcggaccg	acccccggg	aaa-----	-----c----	primer ITSMet14
2629	aa-gntgctt	cggcggactc	gccccagccc	gga-----	-----cgcgg	
BBA345090	atcgttgctt	cggcggactc	gccccagccc	gga-----	-----cgcgg	
2253	ag---ggtt	tgccggactc	gccccagccc	gga-----	-----cgcgg	
209	nccgttgctt	---cgg----	-----	-----	-----	
AF138269	accgttgctt	---cgg----	-----	-----	-----	
204	accgt-gctn	---cgg----	-----	-----	-----	
AF137067	ccagttgctt	cggcgggat	agccccgggg	tcaggttcgc	aagagcctgc	
201	tcagttgctt	cggcgggat	agccccgggg	tcaggttcgc	aagagcctgt	
959	atggttgctt	cggcggactc	gccccagcgt	ccggacggcc	ctgcgccggc	
	-cgggacttc	g-----cg	cccgccg-gg	gaccg--aa	ccttctgaat	
	-cgggacttc	g-----cg	cccgccg-gg	gacc--aa	ccttctgaat	
	-cgggacttc	g-----cg	cccgccg-gg	gaccg--aa	ccttctgaat	primer ITSMet
	-cgggacttc	g-----cg	cccgccg-gg	gaccg--aa	ccttctgaat	
	-cgggacttc	g-----cg	cccgccg-gg	gaccg--aa	ccttctgaat	
	-cgggactag	g-----cg	cccgcng-gg	gatctagtaa	catcttgaat	
	actggaccag	c-----gg	cccgcng-gg	gacctc--aa	actcttgtat	
	actggaccag	c-----gg	cccgccg-gg	gacctc--aa	actcctgtat	
	actggaccag	c-----gg	cccgcct-gg	gacctc--an	actcctgtat	
	-cgggtt---	-----cg	cccgccgagg	gaccgacaaa	caaactcttg	
	-cgggtt---	-----cg	cccgccgagg	gaccgacaaa	caaactcttg	
	--ggggtt--	-----cg	cccgccgagg	gaccgacaaa	caaacccttt	
	ccggaaccag	g-----cg	cctgccgggg	gaccaa--a-	actcttgtat	
	ncggaaccag	g-----cg	cctgccgggg	gaccaa--a-	actcttgtat	
	ccgntacctg	gagccaggcg	gcccgccg-gg	gacctc--a-	aacactgtat	
	ttttta-ata	a----gtatc	ttctgagtgg	--t-ta-aaa	aaa-tgaatc	
	ttttta-ata	a----gtatc	ttctgagtgg	--t-ta-aaa	aaaatgaatc	
	ttttta-ata	a----gtatc	ttctgagtgg	--t-ta-aaa	aaa-tgaatc	
	ttttta-ata	a----gtatc	ttctgagtgg	--t-ta-aaa	aaa-tgaatc	

ttttta-ata	a----gtatc	ttctgagtgg	--t-ta-aaa	aaa-tgaatc
cttctatata	atatggcatc	ttctgagtgg	--t-gggaaa	aaaatgaatc
tccagc-atc	ttct-gaata	cgccgcaagg	--c-aa-aac	aaa-tgaatc
tccagc-atc	ttct-gaata	cgccgcaagg	--c-aaaaac	aaa-tgaatc
tcagcatctt	ct---gaata	cgccgcaagg	--c-aaaaac	aaa-tgaatc
tattttctatc	t-atagcatg	t-ctgagtgg	aat-cataca	caaatgaatc
tattttctatc	t-atagcatg	t-ctgagtgg	aat-cataca	caaatgaatc
tttttctatc	t-atagcatg	t-ctgagggg	aat-cataca	caaatgaatc
ttctgt-acg	ataaggaatg	t-ctgagtgg	tttatagaag	aaaatgaatc
ttctgt-acg	ataaggaatg	t-ctgagtgg	tttatagaag	aaaatgaatc
ctcatcagtc	tctctgaatc	cgccgcaagg	c-----aac	aaaacgaatc

aaaactttca	acaacggatc	tcttggttct	ggcatcgatg	aagaacgcag
aaaactttca	acaacggatc	tcttggttct	ggcatcgatg	aagaacgcag
aaaactttca	acaacggatc	tcttggttct	ggcatcgatg	aagaacgcag
aaaactttca	acaacggatc	tcttggttct	ggcatcgatg	aagaacgcag
aaaactttca	acaacggatc	tcttggttct	ggcatcgatg	aagaacgcag
aaaactttca	acaacggatc	tcttggttct	ggcatcgatg	aagaacgcag
aaaactttca	acaacggatc	tcttggttct	ggcatcgatg	aagaacgcag
aaaactttca	acaacggatc	tcttggttct	ggcatcgatg	aagaacgcag
aaaactttca	acaacggatc	tcttggttct	ggcatcgatg	aagaacgcag
aaaactttca	acaacggatc	tcttggttct	ggcatcgatg	aagaacgcag
aaaactttca	acaacggatc	tcttggttct	ggcatcnatg	aanaacgcac
aaaactttca	acaacggatc	tcttggttct	ggcatcgatg	aagaacgcag
aaaactttca	acaacggatc	tcttggttct	ggcatcgatg	aagaacgcag
aaaactttca	acaacggatc	tcttggttct	ggcatcgatg	aagaacgcag

cgaaatgcga	taagtaatgt	gaattgcaga	attcagtgaa	tcacggaatc
cgaaatgcga	taagtaatgt	gaattgcaga	attcagtgaa	tcacggaatc
cgaaatgcga	taagtaatgt	gaattgcaga	attcagtgaa	tcacggaatc
cgaaatgcga	taagtaatgt	gaattgcaga	attcagtgaa	tcacggaatc
cgaaatgcga	taagtaatgt	gaattgcaga	attcagtgaa	tcacggaatc
cgaaatgcga	taagtaatgt	gaattgcaga	atccagtgaa	tcacggaatc
cgaaatgcga	taagtaatgt	gaattgcaga	at-cagtgaa	tcacggaatc
cgaaatgcga	taagtaatgt	gaattgcaga	attcagtgaa	tcacggaatc
cgaaatgcga	taagtaatgt	gaattgcaga	attcagtgaa	tcacggaatc
cgaaatgcga	taagtantgg	gaattgcaga	attcagngaa	tcacggaatc
cgaaatgcga	taagtaatgt	gaattgcaga	attcagtgaa	tcacggaatc
cgaaatgcga	taagtaatgt	gaattgcaga	attcagtgaa	tcacggaatc
cgaaacgcga	taagtaatgt	gaattgcaga	atthagtgaa	tcacggaatc

tttgaacgca	cattgcgccc	gtcagtatcc	tggcgggcat	gcctgttcga
tttgaacgca	cattgcgccc	gtcagtatcc	tggcgggcat	gcctgttcga
tttgaacgca	cattgcgccc	gtcagtatcc	tggcgggcat	gcctgttcga
tttgaacgca	cattgcgccc	gtcagtatcc	tggcgggcat	gcctgttcga
tttgaacgca	cattgcgccc	gtcagtatcc	tggcgggcat	gcctgttcga
tttgaacgca	cattgcgccc	gtcagtatcc	tggcgggcat	gcctgttcga
tttgaacgca	cattgcgccc	gccagcattc	tggcgggcat	gcctgttcga
tttgaacgca	cattgcgccc	gccagcattc	tggcgggcat	gcctgttcga
tttgaacgca	cattgcgccc	gccagcattc	tggcgggcat	gcctgttcga
tttgaacgca	cattgcgccc	gccagcattc	tggcgggcat	gcctgttcga

```

tttgaacgca cattgcgccc gccagtattc tggcgggcat gcctgttcga
tttgaacgcn catngcgccc cccagaatth tggngggcat gcctgttc-a
tttgaacgca cattgcgccc gctagtatth tagcgggcat gcctgttcga
tttgaacgca cattgcgccc gctagtatth tagcgggcat gcctgttcga
tttgaacgca cattgcgccc gccagcattc tggcgggcat gcctgtccga

-gcgtcatta cgcccc-tc- aagtcccct- gtgg----- ----acttgg
-gcgtcatta cgcccc-tc- aagtcccct- gtgg----- ----actttg
-gcgtcatta cgcccc-tc- aagtcccct- gtgg----- ----acttgg
-gcgtcatta cgcccc-tc- aagtcccct- gtgg----- ----acttgg
-gcgtcatta cgcccc-tc- aagtcccct- gtgg----- ----acttgg
agcgtcatta cgcccc-t-- aanccccct- gggg----- ----gtttgg
-gcgtcattt aaccc--tc- acctcccct- ggggg----- ----agnceg
-gcgtcattt caacc-tcg acctcccctt gggga----- ----ggtcgg
-gcgtcattt caacc-tcg acctcccctt gggga----- ----ggtcgg
-gcgtcatta caacc-tca agcccccccg ggtgacggga acgggcttgg
-gcgtcatta caacc-tc- aagccccccc ggtgacggga acgggcttgg
-gcgn-atta caacc-tc- aaggcccccc ggggacngga accggcttgg
-gcgtcattt caacc-tc- aagcccc--- ggcg----- ----gtttgg
-gcgtcattt caacc-tc- aagcccc--- ggcg----- ----gtttgg
agcgtnattt caaccctcn acgtcccct- gggaacg--- ----tcgggc

tg-ttgggga tcggcga--- ---ggctggt t--ttcc--- ----agcaca
tg-ttgggga tcggcga--- ---ggctggt t--ttcc--- ----agcaca
tg-ttgggga tcggcga--- ---ggctggt t--ttcc--- ----agcaca
tg-ttgggga tcggcga--- ---ggctggt t--ttcc--- ----agcaca
tg-ttgggga tcggcga--- ---ggctggt t--ttcc--- ----agcaca
tg-ttgggga tcggcga--- ---aa--nct t--tttc--- ----agcacg
cg-ttgggga ccggc-a--- ---gac----- ----cc
cg-ttgggga ccggc----- ----agcaca
cg-ttgggga ccggc----- ----agcaca
tg-ttgggga ccggccaact ggtgccctgc t--gtccc-g tacaagcgcc
tg-ttgggga ccggccaact ggtgccctgc tgcctccg-t agcagggcc
gggttnggga ccggcna-ct gngcccctgc tgtgcn-n anaagggcc
tg-ttggggg ccggcgaatgg tgttgggggc gatctcttcg tccccgcgcg
tg-ttggggg ccggaatggg tgttgggggc gatctcttcg tcc-cgcgcg
ctttggggga ccnggna--- ---ngaan-- ----accgcc

--gccgtccc ttaaattaat tgg-----cg gtctcgccgt ggccc-tcct
--gccgtccc ttaaattaat tgg-----cg gtctcgccgt ggccc-tcct
--gccgtccc ttaaattaat tgg-----cg gtctcgccgt ggccc-tcct
--gccgtccc ttaaattaat tgg-----cg gtctcgccgt ggcc--tcct
--nccgtccc ttaaattaat tgg-----cg gtctcgccgt ggccc-tcct
ccgccggnc ttaaatttat tggg----cg ggctccccgt ggcctttcct
--gccggccc tgaatggaag tgg-----cg gccgt-ccgc ggcga--cct
ccgccggccc tgaatggag tgg-----cg gccgtccgc ggcga--cct
ccgccggcc ctaaattggag tgg-----cg gccgtccgc ggcga--cct
ggcccggccc cgaaatgaaa ttgg----cg gcctcgctgc ggcct-ccct
ggggcgcccc cgaaatgaa tgg-----cg gcctcgctgc ggcct-ccct
ggggcccccc caaaanaan ttgg---gg gcccctntcc ggcct-nccc
c-gccgcccc cgaaatgaa tg-----cg gcctcgccgc ggcc--tcct
c-gcngcccc cgaaataaat tgg-----cg gcctcgccgc ggct---cct
ggggcccna aaaatcnaag tngggaacc gttncgccng ggaac--ctt

```

```

ctgcgca-gt agtaaaaca- ----ct--cg caacaggagc cc-ggcgcgg
ctgcgca-gt agtaaagca- ----ct--cg caacaggagc cc-ggcgcgg
ctgcgca-gt agtaaaaca- ----ct--cg caacaggagc cccggcgcgg
ctgcgca-gt agtaaaaca- ----ct--cg caacaggagc cc-ggcgcgg
ctgcgcaagt agtaaaaca- ----ct--cn caacaggagc c--ggcgcgg
ctgcgcaaga agtaactcc- ----ct--cg caacgggagc cc-ggcgcgg
ctgcg----t agtaatacag ----ct--cg caccggaacc cc-gacgcgg
ctgcg----t agtaatacag ----ct--cg caccggaacc cc-gacgcgg
ctgcg----t agnaatacag ----ctt-cg caccggaacc cc-cacgcgg
ctgcgta--- agtaacacaa ----atctcg cagctggagc gc-ggcgcgn
ctgcg----t agtagcacia ----atctcg cagctggagc gc-ggcgcgg
ttnggaaaaa annaaaatt- ----nn--cc aacttggana gggggggggg
ctgcg----t agtaacatgt tgccccttcg caacaggagc cc-ggcgcgg
ctgcg----t annaacatgt tgccct--tc caacaggagc c--ggcgcgg
ttngn----n agaaactcna g---nttnn ccggggnaac cc-gaagnnn

```

```

tcca-ctgcc gtaaaacccc c---caactt t-tt-ata-g
tcca-ctgcc gtaaaacccc c---caactt t-tt-ata-g
-cca-ctgcc gtaaaacccc c---caactt t-tt-ata-g
tccanctgcc gtaaaacccc c---caactt t-tt-ata-g
-cca-ctgcc gnaaaacccc c---caactt t-tt-ataag
-ccanctgcc gaaaaacccc caatcaactt tgmtt-aca-g
-cca-cgcc gtaaaacacc c----aactt c--t-gaacg
-cca--cgcc gtaaaacacc c----aactt c--t-gaacg
-gca-cgccc gttaaaaccc c---caactt c--t-gaacg
--cacctgcc gtaaaacgca c----aacct t-tt-ttaag
-cca-ctgcc gtaaaacgca c---caactt tttt-aaa-g
ggcannggcg ataaaaaac ccccnccttt tttt-aaa--
-cca-ctgcc gtaaaaacca c---caactt ttttcacaag
--ca-ctgnc gtaaacacc -----actt t--ttccaag
gccn-tngcc gaaaaaagcc c-----annt a--aaaaacn

```


REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, N.T.O. Variabilidade em linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) SOROKIN quanto a germinação de conídios, conteúdo proteico, atividade enzimática. Campinas, 1990. 163p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
- AL-AIDROOS, K.; ROBERTS, D.W. Mutantes of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence toward mosquito larvae. **Canadian Journal of Genetic Cytology**, v.22, p.211–212, 1978.
- AL-AIDROOS, K. Demonstration of a parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Genetic Cytology**, v.22, p.309-314, 1980.
- ALVES, S.B. Agentes entomopatogênicos no controle microbiano. In: ALVES, S.B. (Coord.). **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. p.73-126.
- ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.
- ALVES, S.B.; VIEIRA, S.A.; MACEDO, D.; LOPES, R.B. Diversidade genética de isolados de *Metarhizium anisopliae* detectada por PCR-RAPD e patogenicidade à *Diatraea saccharalis*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 7., Poços de Caldas, 2001. **Resumos**. Poços de Caldas: SBE, 2001. p.175.

- ANDERSON, I.; CHAMBERS, S.M.; CAIRNEY, J.W.G. Molecular determination of genetic variation in *Pisolithus* isolates from a defined region in New South Wales, Australia. **New Phytology**, v.138, p.151-162, 1998.
- ANDERSON, I.C.; CHAMBERS, S.M.; CAIRNEY, W.G.J. ITS-RFLP and ITS sequence diversity in *Pisolithus* from central and eastern Australian sclerophyll forests. **Mycological Research**, v.11, p.1304-1312, 2001.
- ANDERSON, J.B.; STASOVSKI, E. Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. **Mycologia**, v.84, n.4, p.505-516, 1992.
- BAGAGLI, E. Parameiose em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN. Piracicaba, 1987. 123p. Dissertação (M.S.) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- BALFOUR-BROWNE, F.L. The green muscardine diseases of insects with special reference to an epidemic in a swarm of Locusts in ERITREA. **Proceedings of Royal Entomological Society of London**, v.12, p.1298-1301, 1960.
- BERBEE, M.L.; TAYLOR, J.W. From 18S ribosomal sequence data to evolution of morphology among the fungi. **Canadian Journal of Botany**, v.73, p.S677-S683, 1995.
- BINDSLEV, L.; OLIVER, R.P.; JOHANSEN, B. *In situ* PCR for detection and identification of fungal species. **Mycological Research**, v.106, p.277-279, 2002.
- BIDOCHKA, M.J.; McDONALD, M.A.; St. LEGER, R.J.; ROBERTS, D.W. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetics**, v.25, p.107-113, 1994.

- BRAGA, G.U.L. Caracterização fisiológica e molecular de linhagens de *Metarhizium anisopliae*. Campinas, 1997. 128p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
- 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.
- BRUNS, T.D.; WHITE, T.J.; TAYLOR, J.W. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology Systematic**, v.22, p.525-564, 1991.
- CHEUNG, P.Y.K.; GRULA, E.A. In vivo events associated with entomopathology of *Beauveria bassiana* for the corn earworm (*Heliothis zea*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.39, p.303-313, 1982.
- COBB, B.D.; CLARKSON, J.M. Detection of molecular variation in the insect pathogenic fungus *Metarhizium* using RAPD-PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v.12, p.319-324, 1993.
- COSTA, A.S. Taxonomia polifásica de *Neurospora* produtoras de aroma. Campinas, 1999. 109p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
- DO, N.; ADAMS, R.P. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. **BioTechniques**, v.10, p.162-166, 1991.
- 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.2, p.134-150, 2000.

- ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.329-337, 1999.
- FARGUES, J.; DURIEZ, T.; ANDRIEV, S.; POPEYE, R.; ROBERT, P. Étude immunologique comparée de souches de *Metarhizium anisopliae* (DELACR.) sien champignon hyphomycète entomopathogène. **Comptes Rendus Hebdomadaires de Séances Del' Academie des Sciences**, v.281, Sér.D, p.1781-1784, 1975.
- FARGUES, J.; ROBERT, P.H. Persistence des conidiospores des hyphomycetes entomopathogenes *B. bassiana*, *M. anisopliae* et *Paecilomyces fumosoroeus* dans le sol, en conditions controle'es. **Agronomie**, v.5, n.1, p.73-80, 1985.
- FEGAN, M.; MANNERS, J.M.; MACLEAN, D.J.; IRWIN, J.A.G.; SAMUELS, K. D.Z.; HOLDOM, D.G.; LI, D.P. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high-degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, v.139, p.2075-2081, 1993.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v.3, p.783-791, 1985.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Classes de marcadores moleculares para análise genética. In: FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: Embrapa, Cenargen, 1996. p.13-68.
- FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Annual Review of Entomology**, v.23, p.409-442, 1978.

- FOSTER, L.M.; KOZAK, K.R.; LOFTUS, M.G.; STEVENS, J.J.; ROSS, I.K. The Polymerase Chain Reaction and its application to filamentous fungi. **Mycological Research**, v.97, n.7, p.769-781, 1993.
- 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.
- FREIRE, L.L.C.; COSTA, A.B.L.; GÓES, L.B.; OLIVEIRA, N.T. de. 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.
- FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Diversity among soil and insect of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. **Letters in Applied Microbiology**, v.22, n.6, p.389-392, 1996.
- FUXA, J.R.; TANADA, Y. The pathogen population. In: TANADA, Y.; FUXA, J.R. (Ed.). **Epizootiology of insects diseases**. New York: John Willey and Sons, 1987. cap.5, p.112-140.
- GARBER, R.C.; YODER, O.C. Isolation of DNA from filamentous fungi and separation into nuclear, mitochondrial, ribosomal, and plasmid components. **Analytical Biochemistry**, v.135, p.416-422, 1983.
- GARGAS, A.; DEPRIEST, P.T. A nomenclature for fungal PCR *primers* with examples from intron-containing Ssu rDNA. **Mycologia**, v.88, n.5, p.745-748, 1996.
- HACKMAN, R.H. Chemistry of the insect cuticle. In: ROCKSTEIN, M. (Ed.). **The physiology of insecta**. New York: Academic Press, 1974. p.215-270.

- HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Construction of cloned DNA probes for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in grasshoppers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.62, p.233-240, 1993a.
- HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Identification of molecular variants in mitochondrial DNAs of members of the genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Tolyposcladium*, and *Metarhizium*. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, p.4283-4288, 1993b.
- HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Detection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* within infected migratory grasshoppers (*Melanoplus sanguinipes*) using Polymerase Chain Reaction and DNA probe. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.67, p.21-27, 1996b.
- HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Identification and differentiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using Polymerase Chain Reaction and Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.67, p.289-299, 1996a.
- HODGE, K.T.; SAWYER, A.J.; HUMBER, R.A. RAPD-PCR for identification of *Zoophthora radicans* isolates in biological control of potato leafhopper. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.65, n.1, p.1-9, 1995.
- HUGHES, K.W.; TOYOHARA, T.L.; PETERSEN, R.H. DNA sequence and RFLP analysis of *Pleurotopsis longinqua* from three disjunct populations. **Mycologia**, v.90, n.4, p.595-600, 1998.

- JENSEN, A.B.; EILENBERG, J. Genetic variation within the insect-pathogenic genus *Entomophthora*, focusing on the *E. muscae* complex, using PCR-RFLP of the ITS II and LSU rDNA. **Mycological Research**, v.105, p.307-312, 2001.
- JIANG, L.; HIRUKI, C. Polymerase Chain Reaction amplification and restriction analysis of the ribosomal DNA of *Olpidium radicale*. **Journal of Microbiological Methods**, v.26, p.87-93, 1996.
- KAIJIANG, L.; ROBERTS, D.W. The production of destruxins by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* var. *major*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.47, p.120-122, 1986.
- KAVA-CORDEIRO, V. Cariótipos eletroforéticos de linhagens selvagens e mutantes do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN. Curitiba, 92p. Tese (M.S.) – Universidade Federal do Paraná.
- KOSIR, J.M.; MacPHERSON, J.M.; KHACHATOURIANS, G.G. Genomic analysis of virulent strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, using restriction fragment length polymorphisms. **Canadian Journal of Microbiology**, v.37, p.534-541, 1991.
- KUCERA, M. Partial purification and properties of *Galleria melonella* larvae proteolytic inhibitors acting on *Metarhizium anisopliae* toxic protease. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.43, p.190-196, 1984.
- 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, n.9, 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, n.3, p.257-265, 1997.
- LEITE, B.; MESSIAS, C.L. Atividade enzimática para linhagens de *Metarhizium anisopliae*. **Ciência e Cultura**, v.36, p.814, 1984.
- LEITE, B. Variabilidade de linhagens de *Metarhizium anisopliae*, quanto à atividade enzimática, resistência à luz ultra-violeta e virulência ao vetor da doença de Chagas *Panstrongylus megistus*. Campinas, 1987, 139p. Tese (M.S.) – Universidade Estadual de Campinas.
- LUNA, E.A.; AZEVEDO, J.L. Obtenção de possíveis diplóides entre linhagens de *Metarhizium anisopliae*. **Ciência e Cultura**, v.37, p.721, 1985. /Apresentado à 12. Reunião Anual da SBPC, Belo Horizonte, 1985 - Resumo/
- LUNA, E.A. Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) SOROKIN. Rio de Janeiro, 1985. 260p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- MADELIN, M.F. Fungal parasites of insects. **Annual Review of Entomology**, v.11, p.423-448, 1966.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545p.
- MARQUES, E.K.; IKUTA, N.; LUNGE, V.R.; FONSECA, A.S.K. Diagnóstico molecular e biotecnologia. In: SERAFINI, A.M.; BARROS, N.M.; AZEVEDO,

- J.L. (Ed.). **Biotecnologia**: avanços na agricultura e na agropecuária. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p.101-130.
- MESSIAS, C.L. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) SOROKIN. Piracicaba, 1979. 73p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L. Parassexuality in the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. **Transactions of British Mycological Society**, v.75, p.473-477, 1980.
- MESSIAS, C.L. Fungos, sua utilização para controle de insetos praga de importância médica e agrícola. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.57-59, 1989.
- MESSIAS, C.L.; PUPIN, A.M. The cuticular componentes from *Diatraea saccharalis* and their effect on "in vitro" growth of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 5., Adelaide, 1990. **Proceedings**. Adelaide: SIP, 1990. p.315.
- MOZES-KOCH, R.; EDELBAUM, O.; LINERH, A. ; STEJNBERG, A.; UZIEL, A.; GERSON, U.; SELA, I. Identification of *Hirsutella species* isolates within a species and intraespecific heterokaryons by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). **Journal of Plant Disease Protection**, v.102, p.284-290, 1995.
- NEUVEGLISE, C.; BRYGOO; Y.; VERCAMBRE; B.; RIBA; G. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. **Mycological Research**, v.98, p.322-328, 1994.

- ONOFRE, S.B.; VARGAS, L.R.B.; ROSSATO, M.; BARROS, N.M.; BOLDO, J.T.; NUNES, A.R.F.; AZEVEDO, J.L. Controle biológico de pragas na agropecuária, por meio de fungos entomopatogênicos. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p.295-328.
- OUELLET, T.; SEIFERT, K.A. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. **Phytopathology**, v.83, n.9, p.1003-1007, 1993.
- PAAVANEN-HUHTALA, S.; AKINAINEN, H.; YLIMATTILA, T. Development of strain-specific primers for a strain of *Gliocladium catenulatum* used in biological control. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p.187-198, 2000.
- PARIS, S.; FERRON, P. Study of the virulence some mutants of *Beauveria brongniartii* (= *Beauveria tenella*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.7, p.71-77, 1979.
- PECCHIA, S.; MERCATELLI, E.; VANNACCI, G. PCR amplification and characterization of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA in *Pyrenophora graminea*. **FEMS Microbiology Letters**, v.166, p.21-27, 1998.
- PEKRUL, S.; GRULA, A. Mode of the corn earworm *Heliothis zea* by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning Electron Microscopy. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.34, p.238-247, 1979.
- PFEIFER, T.A.; KHACHATOURIANS, G.G. Isolation of DNA from entomopathogenic fungi grown in liquid cultures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.61, p.113-116, 1993.

- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMONS, J.M; Mac DONALD, K.D.;
BUTTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in
Genetics**, v.5, p.141-238, 1953.
- RAKOTONIRAINY, M.S.; CARIOU, 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.225-230, 1994.
- RISTAINO, J.B.; MADRITCH, M.; TROUT, C.L.; PARRA, G. PCR amplification
of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus
Phytophthora. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, n.3, p.948-954,
1998.
- ROBERTS, D.W. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium
anisopliae*. I. Production in submerged and surface cultures, and an
inorganic and organic nitrogen media. **Journal of Invertebrate Pathology**,
v.8, p.212-221, 1966a.
- ROBERTS, D.W. Toxins from the entomopatogenous fungus *Metarhizium
anisopliae*. II. Symptoms and detection in moribund hosts. **Journal of
Invertebrate Pathology**, v.8, p.222-227, 1966b.
- ROBERTS, D.W. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium
anisopliae*: isolation of destruxins from submerged cultures. **Journal of
Invertebrate Pathology**, v.14, p.82-88, 1969.
- ROBERTS, D.W.; YENDOL, W.G. Use of fungi for microbial control of insects.
In: BURGESS, H.D. (Ed.). **Microbial control of insects and mites**. New
York: Academic Press, 1971. p.125-149.
- ROBERTS, D.W. World picture of biological control of insects by fungi.
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.84, n.3, p.89-100, 1989.

- ROHLF, F.J. **NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system** (software). Version 150. New York: Exeter Publisher, 1992.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Evolution of Biology**, v.4, p.406-425, 1987.
- SCHABEL, H.G. Percutaneous infection of *Hylobius pale* by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.31, p.180-187, 1978.
- SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Metodologia da tecnologia do DNA recombinante: uma visão geral de seus princípios. In: SERAFINI, L.A; BARROS, N.M; AZEVEDO, J.L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p.13-44.
- SILVA, J.C.; MESSIAS, C.L. Virulence of mutants and revertents of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* toward *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.48, p.368-374, 1986.
- SILVA, J.C. Virulência de mutantes exoenzimáticos de *Metarhizium anisopliae* e seus revertentes a *Rhodnius prolixus*. Campinas, 1985. 161p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
- SILVEIRA, W.D. Obtenção e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN. Piracicaba, 1983. 153p. Dissertação (M.S.) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- SOSA-GÓMEZ, D.R.; TIGANO, M.S.; ARANTES, O.M.N. Caracterização de entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.731-764.

- St. LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.47, p.295-302, 1986a.
- St. LEGER, R.J.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. Calcium and calmodulin-mediated protein synthesis and protein phosphorylation during germination, growth and protease production by *M. anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, v.135, p.2141-2154, 1989.
- St. LEGER, R.J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. Prepenetration events during infection of host cuticle by *M. anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.58, p.168-179, 1991.
- St. LEGER, R.J.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.61, p.81-84, 1993.
- STRONGMAN, D.B.; MACKAY, R.M. Discrimination between *Hirsutella longicolla* var. *longicolla* and *Hirsutella longicolla* var. *cornuta* using Random Amplified Polymorphic DNA fingerprinting. **Mycologia**, v.85, n.1, p.65-70, 1993c.
- 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, n.5, p.794-802, 2002.
- TIGANO-MILANI, M.S.; GOMES, A.C.M.M.; SOBRAL, B.W.S. Genetic variability among brazilian isolates of the entomopathogenic fungus *M.anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.65, p.206-210, 1995.

- TINLINE, R.D.; NOVIELLO, C. Heterokaryosis in the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycologia**, v.63, p.701-712, 1971.
- UETAKE, Y.; ARAKAWA, M.; NAKAMURA, H.; AKAHIRA, T.; SAYAMA, A.; CHEAH, L.H.; OKABE, I.O.; MATSUMOTO, N. Genetic relationship among violet root rot fungi as revealed by hyphal anastomosis and sequencing of the rDNA ITS regions. **Mycological Research**, v.106, p.156-163, 2002.
- VEEN, K.H. Recherches sur la maladie, due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. **Mendelingen Landbouwhogeschool**, v.68, p.1-77, 1968.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary *primers*. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.24, p.7213-7218, 1990.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.D.; LEE, S.B.; TAYLOR, J.W. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal DNA genes. In: INNIS, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. **PCR PROTOCOLS: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p.315-322.
- ZACHARUCK, R.Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (Coleoptera). I. Dormant and germinating conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.15, p.63-80, 1970a.
- ZACHARUCK, R.Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (Coleoptera). II. Conidial germ tubes and apressoria. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.15, p.81-91, 1970b.

ZACHARUCK, R.Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (Coleoptera). III. Penetration of the host integument. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.15, p.372-396, 1970c.

ZACHARUCK, R.Y. Penetration of the cuticular layers of elateridae larvae (Coleoptera) by the fungus *Metarhizium anisopliae* and notes on a bacterial invasion. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.21, p.101-106, 1973.