

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INSETICIDA DE *Metarhizium anisopliae* CONTRA
Dysdercus peruvianus E *Anticarsia gemmatalis***

TESE DE DOUTORADO

IRINA LUBECK

Porto Alegre, 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INSETICIDA DE *Metarhizium anisopliae* CONTRA
Dysdercus peruvianus E *Anticarsia gemmatilis***

TESE SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR DO
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL COMO
REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR.

IRINA LUBECK

ORIENTADORA: PROF DR. MARILENE HENNING VAINSTEIN

PORTO ALEGRE, 2008.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Fungos com Importância Médica e Biotecnológica, no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a minha orientadora, Dra. Marilene Henning Vainstein, pela oportunidade e confiança, também sou grata ao professor Dr. Augusto Schrank, pelo auxílio e co-orientação.

O período que permaneci no Centro de Biotecnologia foi fundamental para a minha formação acadêmica. Hoje reconheço que as dificuldades e os tropeços só me fortaleceram e me tornaram uma pessoa mais persistente, dedicada e confiante. Pensando agora nestes últimos anos, vejo que em minha lembrança só permaneceram os bons momentos e que, embora seja necessária a continuação de minha jornada, levarei comigo sempre a saudade.

Agradeço à grande família composta pelo complexo dos laboratórios 217, 220 e 222. Deixo colegas, mas levo comigo amigos verdadeiros. Considero-me extremamente privilegiada por ter tido a oportunidade de trabalhar com o Charley e a Lívia, exemplos a serem seguidos. Não menos importantes são a Roberta, irmã mais velha, consultora para assuntos místicos e companheira inseparável nas trapalhadas; a Juli, a Letícia e a Carolina, pelo incentivo e amizade. Agradeço também à Lis, pela doçura e paciência, e à Ângela, Luciana e Juliano, pelo coleguismo.

Agradeço à paciência e à tolerância dos meus alunos de iniciação científica Bárbara e Juliano.

Às amigas Karla, Cristiane, Cassiana e Jacqueline, pela distração e otimismo.

Cabe aqui também agradecer o auxílio recebido pelos laboratórios do Prof. Dr. Termignoni e da Profa. Dra. Célia Carlini, especialmente às acadêmicas Adriana Seixas e Lúcia Vargas.

Agradeço ao Paulo e especialmente ao Milton por garantirem o fornecimento de material limpo e estéril. Também expresso a minha gratidão à Silvinha e ao Luciano, por tentarem facilitar ao máximo os procedimentos burocráticos inerentes a uma pós-graduação.

Agradeço, ainda, a todos que participaram dessa jornada e que acreditam na pesquisa brasileira, destacando os órgãos de fomento como CAPES e CNPq.

Por fim, agradeço a minha família, que constitui um alicerce firme e seguro e me impulsiona na busca de conhecimento. Desculpo-me pelas noites de choradeira que só trouxeram preocupação aos meus familiares e que agora são irrelevantes.

Deixo, por fim, a todos um muito obrigado e a certeza de que tudo valeu a pena.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	VIII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 CONTROLE BIOLÓGICO	15
1.2 O ENTOMOPATÓGENO <i>METARHIZIUM</i> E SEUS HOSPEDEIROS	17
1.2.1 Características e Taxonomia do gênero <i>Metarhizium</i>	17
1.2.2 Capacidade entomopatogênica e acaricida de <i>M. anisopliae</i>	19
1.2.3 Pragas da agricultura candidatas ao controle por fungos entomopatogênicos	23
1.2.3.1 <i>Anticarsia gemmatalis</i>	24
1.2.3.2 <i>Dysdercus peruvianus</i>	25
1.3 INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO	27
1.3.1 Ciclo biológico de <i>Metarhizium</i> em hospedeiros	27
1.3.2 Secreção de enzimas	32
1.3.2.1 Proteases	33
1.3.2.2 Quitinases	35
1.3.3 Resposta do Hospedeiro às Infecções	37
2 OBJETIVO	42
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3 MATERIAL & MÉTODOS	43

3.1 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTIVO	43
3.1.1 Meio BDA (Ágar-Batata)	43
3.1.2 Meio de Cove (MC)	43
3.1.3 Solução de Sais	43
3.1.4 Solução de elementos-traços	43
3.1.5 Preparação das cutículas	44
3.2 MICRORGANISMOS	44
3.2.1 Manutenção das Linhagens de <i>Metarhizium anisopliae</i>	45
3.2.2 Cultivo de <i>M. anisopliae</i> em diferentes fontes de carbono, para avaliação da atividade enzimática	46
3.3 ENSAIOS ENZIMÁTICOS	47
3.3.1 Determinação da atividade de quitinases	47
3.3.2 Determinação da atividade de proteases	47
3.3.3 Determinação de proteína total	48
3.4 BIOENSAIOS	48
3.4.1 Bioensaios com <i>D. peruvianus</i>	48
3.4.2 Bioensaios com <i>A. gemmatalis</i>	49
3.5 ANÁLISE DA RESPOSTA A INFECÇÃO PELOS HOSPEDEIROS <i>D. peruvianus</i> E <i>A. gemmatalis</i>	50
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4 RESULTADOS	51
4.1 SECREÇÃO ENZIMÁTICA DE <i>M. anisopliae</i> EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO	51
4.1.1 Quitinases	51

4.1.2 Proteases	58
4.2 AVALIAÇÃO DE PATOGENICIDADE	61
4.2.1 Avaliação da patogenicidade utilizando como modelo o percevejo <i>D. peruvianus</i>	61
4.2.1.1 Avaliação da resposta celular de <i>D. peruvianus</i>	68
4.2.1.2 Avaliação do papel da cutícula na resposta de <i>D. peruvianus</i> à infecção fúngica	72
4.2.2 Avaliação da patogenicidade utilizando como modelo a lagarta <i>A. gemmatalis</i>	74
4.2.2.1 Avaliação da resposta celular de <i>A. gemmatalis</i>	78
5 DISCUSSÃO	85
6 CONCLUSÕES	95
7 PERSPECTIVAS	96
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXO I: Artigo “Evaluation of <i>Metarhizium anisopliae</i> strains as potential biocontrol agents of the tick <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> and the cotton stainer <i>Dysdercus peruvianus</i> ”	107
ANEXO II: Artigo “Evaluation of <i>Metarhizium anisopliae</i> strains as potential biocontrol agent of the velvetbean caterpillar <i>Anticarsia gemmatalis</i> and arthropod cell evaluation”	119

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

DNA	Ácido desoxirribonucléico
rDNA	DNA ribossomal
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
EDTA	Ácido etilodiaminotetracético, sal sódico
BDA	Ágar Batata
BR	Brasil
CG	Cenargen
cm ²	Centímetro quadrado
EUA/USA	Estados Unidos da América
FAPRI	<i>Food and Agricultural Policy Research Institute</i>
g	Grama, aceleração da gravidade
° C	Graus Celsius
h	Hora
ITS	<i>Internal Transcribed spacers</i>
m/v	Massa por volume
MC	Meio de Cove
<i>Mpl1</i>	<i>Metarhizium peripilin-like protein</i>
<i>Mos</i>	<i>Metarhizium osmosensor-like protein</i>
4-UM-(GlcNAc) ₂	4-methylumbelliferyl-β-D-N,N'-diacetylchitobioside
4-UM-(GlcNAc) ₃	4-methylumbelliferyl-β-D-N,N',N'-triacetylchitotrioside
μg	Micrograma
μm	Micrômetro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
mL	Militro
mm	Milímetro
mM	Milimolar

MAPA	Ministério da Pecuária Agricultura e Desenvolvimento
min	Minuto
M	Molar
NAcGlc	<i>N</i> -acetilglicosamina
nm	nanômetro
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PRRS	<i>Pattern-recognition receptors</i>
pmol	Picomol
Tween	Polisorbitano
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcento
kDa	Quilodaltons = 1.000 daltons
RPM	Rotações por minuto
seg	Segundos
TL	Tempo letal mediano
U	Unidade de atividade enzimática
v/v	Volume por volume

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Possíveis hospedeiros do entomopatógeno <i>M. anisopliae</i>	20
Tabela 2:	Biopesticidas comercializados para o controle de pragas	21
Tabela 3:	Linhagens de <i>M. anisopliae</i> utilizadas durante o trabalho	45
Tabela 4:	Tempo letal para a morte de 50% de <i>D. peruvianus</i> após a exposição a diferentes linhagens de <i>M. anisopliae</i>	63
Tabela 5:	Tempo letal para a morte de 100% de <i>D. peruvianus</i> após a exposição a diferentes linhagens de <i>M. anisopliae</i>	64
Tabela 6:	Dose letal média para a morte de 50 e 100% de fêmeas de <i>D. peruvianus</i> após a exposição por três dias a diferentes concentrações das linhagens E6, CG47 e Nordeste de <i>M. anisopliae</i>	68
Tabela 7:	Tempo letal médio para a morte de 50 e 100% de machos de <i>D. peruvianus</i> após a inoculação parenteral de esporos de <i>M. anisopliae</i> .	74
Tabela 8:	Tempo letal médio para a morte de 50% de <i>A. gemmatalis</i> após a exposição a diferentes linhagens de <i>M. anisopliae</i>	75
Tabela 9:	Dose letal média para a morte de 50 e 100% de <i>A. gemmatalis</i> após três dias de exposição a diferentes concentrações das linhagens CG97, CG125, C12 e Nordeste de <i>M. anisopliae</i>	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Características morfológicas de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	18
Figura 2:	Diferentes estágios de desenvolvimento de <i>A. gemmatalis</i>	24
Figura 3:	<i>D. peruvianus</i> e sua cultura alvo, o algodão	27
Figura 4:	Fotomicrografia de tegumento de artrópode	28
Figura 5:	Ciclo biológico de <i>M. anisopliae</i> no meio ambiente e interação com artrópodes	31
Figura 6:	Processo de penetração e início do desenvolvimento de <i>M. anisopliae</i> em hospedeiros	32
Figura 7:	Mecanismo de ação das quitinases	36
Figura 8:	Microscopia eletrônica de varredura de hemócitos	40
Figura 9:	Microscopia óptica mostrando a formação de nódulo com melanização em <i>Ceratitis capaitata</i>	41
Figura 10:	Linhagens de <i>M. anisopliae</i>	46
Figura 11:	Bioensaios com <i>D. peruvianus</i>	49
Figura 12:	Atividade de quitinases após 24h de cultivo de <i>M. anisopliae</i>	54
Figura 13:	Atividade de quitinases após 48h de cultivo de <i>M. anisopliae</i>	55
Figura 14:	Atividade de quitinases após 72h de cultivo de <i>M. anisopliae</i>	56
Figura 15:	Atividade de quitinases após 96h de cultivo de <i>M. anisopliae</i>	57
Figura 16:	Atividade de proteases após 24h de cultivo de <i>M. anisopliae</i>	58
Figura 17:	Atividade de proteases após 48h de cultivo de <i>M. anisopliae</i>	59
Figura 18:	Atividade de proteases após 72h de cultivo de <i>M. anisopliae</i> .	60
Figura 19:	Atividade de proteases após 96h de cultivo de <i>M. anisopliae</i> .	60
Figura 20:	Mortalidade de <i>D. peruvianus</i> infectado por diferentes linhagens de	65

M. anisopliae

- Figura 21:** Avaliação da ovopostura de fêmeas de *D. peruvianus* expostas a diferentes linhagens de *M. anisopliae* 66
- Figura 22:** Desenvolvimento de *M. anisopliae* em *D. peruvianus* após a morte dos insetos em bioensaios 67
- Figura 23:** Contagem de hemócitos totais após diferentes tempos de exposição de *D. peruvianus* a linhagens de *M. anisopliae* 70
- Figura 24:** Tipos celulares encontrados em esfregaços de hemolinfa de *D. peruvianus* após 4h de exposição à linhagem CG47 71
- Figura 25:** Tipos celulares encontrados em esfregaços de hemolinfa de *D. peruvianus* após 72h de exposição à linhagem CG47 72
- Figura 26:** Efeito de *M. anisopliae* em machos de *D. peruvianus* 73
- Figura 27:** Efeito de *M. anisopliae* sobre *A. gemmatalis* 76
- Figura 28:** Desenvolvimento de *M. anisopliae* em *A. gemmatalis* 78
- Figura 29:** Contagem de hemócitos totais após diferentes tempos de incubação de *A. gemmatalis* com diferentes linhagens de *M. anisopliae* 79
- Figura 30:** Tipos celulares encontrados em esfregaços de hemolinfa de *A. gemmatalis* após 4h de incubação 81
- Figura 31:** Tipos celulares encontrados em esfregaços de hemolinfa de *A. gemmatalis* após 24h de incubação 83
- Figura 32:** Fotomicrografia de hemolinfa de *A. gemmatalis* mostrando a formação de agregados celulares após desafio com diferentes linhagens de *M. anisopliae* 84

RESUMO

O controle biológico pode ser definido como a utilização de antagonistas naturais para a diminuição ou redução de determinado organismo indesejado. Atualmente, esta estratégia constitui uma ferramenta segura e efetiva tanto para o controle de pragas da agricultura e da pecuária, quanto para vetores de doenças que atingem a saúde pública. O fungo filamentoso *Metarhizium anisopliae* tem se destacado neste âmbito devido às suas características entomopatogênicas e acaricidas, sendo utilizado comercialmente no Brasil para o controle da cigarrinha da cana-de-açúcar e estudado, mundialmente, como potencial biopesticida. Não se sabe quais são os fatores que definem a predileção do fungo a determinados hospedeiros, mas se acredita que fatores tais como uma maior adaptação do patógeno, a composição e a morfologia da cutícula possam influenciar. Neste trabalho foi avaliada a capacidade entomopatogênica de 8 linhagens de *M. anisopliae* sobre dois artrópodes: o percevejo manchador do algodão *Dysdercus peruvianus* e a lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis*. Todas as linhagens testadas de *M. anisopliae* foram mais efetivas contra *D. peruvianus*, quando comparadas à *A. gemmatalis*. A linhagem CG47 mostrou-se eficaz contra ambos os artrópodes testados. As linhagens C12, CG47, CG97 e Nordeste foram ativas contra *A. gemmatalis*, sendo C12 a mais virulenta. A secreção de proteases e quitinases durante o cultivo do fungo, em presença de cutículas de artrópodes, foi avaliada e parece ter sido influenciada pelo tipo de fonte de carbono disponível no meio de cultivo. A secreção de quitinases, ao contrário das proteases, pareceu não sofrer repressão tão acentuada, com a utilização de fontes facilmente metabolizáveis como a glicose; e, embora existam grandes diferenças entre as linhagens na capacidade de secreção de ambas as enzimas, a virulência observada nos bioensaios pareceu não estar correlacionada com a capacidade quitinolítica ou proteolítica das diferentes linhagens. Levando-se em conta que o processo de infecção de *M. anisopliae* em hospedeiros é multifatorial e dependente também dos artrópodes-alvo, foi feita a contagem total de hemócitos, sendo possível verificar um aumento destas células de defesa logo após o desafio com o patógeno. Neste trabalho, fica evidente o potencial de determinadas linhagens de *M. anisopliae* para o controle de *D. peruvianus* e *A. gemmatalis*. Também é sugerida a utilização do percevejo manchador do algodão como um novo modelo de pesquisa para os estudos que envolvem as interações patógeno-hospedeiro, mediante a análise de novos fatores de virulência desse patógeno e da resposta do hospedeiro à infecção.

ABSTRACT

Biological control can be defined as the utilization of natural enemies to reduce or to diminish some unwanted organism. Nowadays, this strategy is a safe and effective tool to control plagues from agriculture and pecuary and also for vectors of some important diseases of public health. The filamentous fungi *Metarhizium anisopliae* have been standed out in this field because its entomopathogenic and acaricide characteristics, being commercially used in Brazil to control the sugar cane bugs and being studied worldwide as a potential biopesticide. The factors that define the fungi specificity for some hosts are not known, although, is believed that factors as a greater adaptation of the pathogen and the cuticle composition and morphology may influence. In this work the entomopathogenic activity of 8 strains of *M. anisopliae* was evaluated against two arthropods: the cotton stainer *Dysdercus peruvianus* and the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*. All *M. anisopliae* strains tested were more efficient against *D. peruvianus* when compared to *A. gemmatalis*. Strain CG47 was active for both arthropods tested. Strains C12, CG47, CG97 and Nordeste were active against *A. gemmatalis* and C12 was the most virulen strain. Protease and chitiunase secretion during fungi growth with arthropod cuticles was tested and seem to be influenced by the kind of carbon source available in the media. Chitinase secretion, on the contrary to proteases seem not to respond so effectively to repression by the utilization of simple carbon compounds as glucose and, despite there are big differences between strains in the capacity to secrete both enzymes, the virulence observed during bioassays seemed not to be correlacionated to their proteolytic or chitinolytic activity. Aware that the *M. anisopliae* infection process on hosts is multifactorial and also depends on arthropod response, the total hemocytes count were made and was possible to detect an increase on cellular counts after challenge with the pathogen. In this work is evident the potential of some *M. anisopliae* strains to control *D. peruvianus* and *A. gemmatalis* and it also suggests the utilization of the cotton stainer as a model for researches about host-pathogen interactions, studies about pathogen virulence factors as well studies to elucidate the host response to infection.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico pode ser definido como a utilização pelo homem de antagonistas naturais com o objetivo de diminuir o número de indivíduos de populações indesejadas (pragas) para números subclínicos ou para níveis aceitáveis (GRONVOLD *et al.*, 1996).

O controle biológico pode ser realizado pelo aumento ou proteção de um antagonista natural ou pela introdução de um competidor exótico (GRONVOLD *et al.*, 1996). No primeiro caso, o controle se baseia na potencialização de situações normalmente existentes em determinado ambiente, onde o antagonista é somente re-inoculado para o desenvolvimento de epizootias e diminuição gradual de uma determinada praga. Porém, o controle também pode visar à diminuição rápida de determinado indivíduo, sendo neste caso o antagonista aplicado massivamente e, por isso, este tipo de controle biológico é denominado inundação (SHAH & PELL, 2003). A importação e aplicação de um organismo fora de seu ambiente natural, com o objetivo de controlar uma espécie de peste, consiste no controle biológico clássico. No entanto, conforme descrito por HOWARTH (1996), esse tipo de estratégia depende da adaptação do biocontrolador ao ambiente exógeno, como também de sua relação com as espécies nativas.

Outra divisão importante do controle biológico diz respeito à intensidade com que ele é utilizado, ou seja, a aplicação de um biopesticida pode ser completa, não ocorrendo a adição de químicos; pode ser substancial, neste caso 75 a 100% do controle é realizado de forma natural; ou pode ser parcial, sendo reduzido o controle químico de 25 a 50% (GRONVOLD *et al.*, 1996).

Muitos são os agentes com potencial para o controle de pragas, dentre eles os vírus, as bactérias, os parasitos e os fungos. O biopesticida bacteriano mais utilizado e estudado é o *Bacillus thuringiensis*, uma bactéria gram-negativa, formadora de esporos e amplamente distribuída na natureza. Um grande número de isolados de *B. thuringiensis* é comercialmente produzido por sua ação contra insetos das ordens Lepidóptera, Coleóptera e Díptera (SUDAKIN, 2003). Essa bactéria produz, durante a esporulação, inclusões intracelulares repletas de protoxinas que, quando ingeridas, são solubilizadas e convertidas

em toxinas ativas no intestino médio dos hospedeiros. Estas proteínas tóxicas são divididas em duas famílias: toxinas citolíticas (Cyt) e δ -endotoxinas (Cry) (GÓMEZ *et al.*, 2007). As proteínas Cry são ativas contra insetos das ordens Lepidóptera, Coleóptera e Díptera, e as proteínas Cyt atuam principalmente em Dípteros. A ação de ambas resulta em uma série de eventos que culminam na morte do inseto (ARONSON & SHAI, 2001; LACEY *et al.*, 2001). No que diz respeito aos agentes virais, a família *Baculoviridae* possui representantes altamente especializados na infecção de insetos e, por este motivo, são utilizados como biopesticidas. Porém, a utilização de vírus como biocontroladores é restrita, devido ao fato de matarem lentamente seus hospedeiros e principalmente por sua difícil obtenção para a formulação de produtos comerciais (SZEWCZYK *et al.*, 2006).

Os fungos compõem um grupo especial de microrganismos para o controle biológico, pois se destacam no controle de insetos-alvo, devido a sua fácil produção para fins comerciais, como também pela sua capacidade de invadir, de forma ativa, seus hospedeiros, não necessitando de sua prévia ingestão para desenvolverem o efeito tóxico (MCCOY & TIGANO-MILANI, 1992).

Os fungos entomopatogênicos são responsáveis por causar epizootias naturais em artrópodes, levando a uma diminuição da população do inseto praga. O controle biológico associado à aplicação de biopesticidas ocorre por fatores intrínsecos ao patógeno, tais como virulência, capacidade de crescimento e esporulação em faixas amplas de temperatura e pH, vigor dos conídios; por fatores relacionados ao ambiente, tais como incidência de raios ultravioletas, temperatura, umidade e presença de antagonistas microbianos e, por último, por fatores inerentes ao hospedeiro, tais como comportamento social e mecanismos de defesa (LACEY *et al.*, 2001).

Para o aumento da eficiência das epizootias artificialmente induzidas pelo homem, é necessária a compreensão dos determinantes de patogenicidade e de virulência do agente controlador, observando-se a sua relação com o meio ambiente e com o hospedeiro, e também o desenvolvimento de técnicas apropriadas para a produção, manutenção e aplicação de formulações comerciais (LACEY *et al.*, 2001).

No ano de 2006, a população mundial atingiu 6,5 bilhões de pessoas e estima-se que em 2050 este número aumente para 9,2 bilhões. O número crescente de indivíduos faz com que também aumente a demanda de produção de alimentos, porém, para que as necessidades mundiais de produção de alimentos sejam supridas, seria necessário que, em

50 anos, se obtivesse o dobro da produção atual. Tal fato é bastante preocupante, visto que a maioria das terras cultiváveis do mundo já está ocupada. Dessa forma, a produção de alimentos em maior volume e de maneira ambientalmente segura constitui um desafio global, e o controle biológico representa uma maneira ecologicamente correta para o controle de pragas e, conseqüentemente, para o aumento da produção (NICHOLSON, 2007).

1.2 O ENTOMOPATÓGENO *METARHIZIUM* E SEUS HOSPEDEIROS

1.2.1 Características e Taxonomia do gênero *Metarhizium*

O entomopatígeno *M. anisopliae* é um fungo filamentosso distribuído mundialmente, capaz de infectar mais de 50 famílias de insetos e ácaros, como também é adaptado para o crescimento em raízes de plantas (ST. LEGER, 2008). Foi isolado pela primeira vez em 1879 e, em 1883, Sorokin o descreveu como *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, permanecendo assim até os dias atuais (ALVES, 1998).

M. anisopliae apresenta micélio septado e hialino, com conidióforos característicos, dos quais emergem conídios cilíndricos organizados em colunas (Figura 1). A espécie desenvolve-se principalmente de forma vegetativa pela produção de esporos via reprodução assexuada, ainda que a reprodução parassexual, caracterizada por heterocariose e recombinação somática, também possa ocorrer. Este gênero fúngico é capaz de apresentar multiplicação ótima em temperaturas entre 24 e 30 °C e pH 6,9 (ALVES, 1998).

Inicialmente, CURRAN *et al.* (1994) classificaram o gênero *Metarhizium*, de acordo com análises morfológicas e a coloração de seus conídeos, em três espécies: *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride* e *Metarhizium album*. *M. anisopliae* e *M. flavoviride* foram ainda divididos em duas variedades: *M. anisopliae* var. *majus*, com conídeos medindo entre 10 e 14µm, e var. *anisopliae*, com conídios de 5 a 8µm (Figura 1); *M. flavoviride* var. *flavoviride*, com conídeos de 6 a 11 x 3 a 5µm, e var. *minus* com conídeos de 4 a 7 x 2 a 3µm.

Em 2000, DRIVER e colaboradores utilizaram, além das características morfológicas, abordagens moleculares para a reavaliação taxonômica do gênero *Metarhizium*. Nesse estudo, a análise das seqüências obtidas pelo seqüenciamento de ITS

(*internal transcribed spacers*) e da região D3 do rDNA 5,8S e do rDNA 28S levaram à manutenção da divisão do gênero em três espécies, como anteriormente proposto por CURRAN *et al.* (1994). Entretanto, as espécies *M. anisopliae* e *M. flavoviride* passaram a possuir outras variedades. A espécie *M. anisopliae* passou a ser composta por quatro variedades: var. *acridum* Driver & Milner, var. nov.; var. *lepidiotum* Driver & Milner, var. nov.; var. *anisopliae* e var. *majus*. Já *M. flavoviride* foi dividido novamente em cinco variedades: Tipo E; var. *novazealandicum* Driver & Milner, var. nov.; var. *flavoviride*; var. *minus*; var. *pemphigum* Driver & Milner, var. nov. (DRIVER *et al.*, 2000).

Em 2001, LIU *et al.*, mediante análise de seqüências ITS de amostras de estroma de *Cordyceps* coletadas a campo e culturas de *Metarhizium* spp., identificaram a espécie *Cordyceps brittlebankisoides* como sendo a forma teleomórfica de *M. anisopliae* var. *majus* e, com isso, o fungo *M. anisopliae* passou a ser considerado um ascomiceto.

Recentemente uma nova linhagem de *Metarhizium* foi isolada de cupins na China e classificada como uma nova variedade de *M. anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) (DONG *et al.*, 2007).

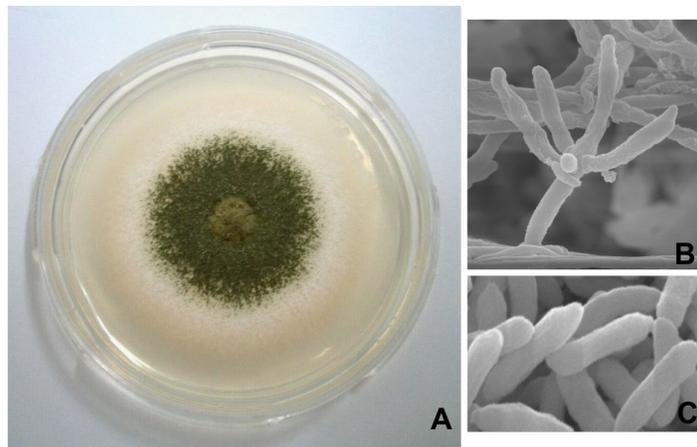


Figura 1. Características morfológicas de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. (A) Cultivo em meio complexo, mostrando uma colônia esporulada. (B) Microscopia eletrônica de varredura (MEV), mostrando um conidióforo e (C) MEV dos conídeos.

1.2.2 Capacidade entomopatogênica e acaricida de *M. anisopliae*

O emprego de produtos químicos para o controle de pragas da agricultura e vetores de doenças é ainda o método mais utilizado. No entanto, a pouca disponibilidade de produtos seguros e de baixo custo, o desenvolvimento de resistência, a presença de resíduos na natureza e alimentos, a ação não seletiva e as exigências do mercado consumidor para produtos saudáveis levaram a um aumento no interesse da utilização de antagonistas naturais como forma de controle (ZAIM & GUILLET, 2002; SUDAKIM, 2003). A utilização de microrganismos como pesticidas em potencial foi descoberta há mais de cem anos, quando o russo Metchnikoff observou que o besouro *Anisoplia austriaca*, uma praga de cereais, tinha a sua população diminuída pela ocorrência de epizootias naturais. O microbiologista buscou identificar patógenos naturais e, em 1879, isolou o fungo agora denominado *M. anisopliae* (LORD, 2005).

Nos últimos anos, a seleção de linhagens mais virulentas de *M. anisopliae* tem sido feita em insetos das ordens Coleóptera, Hemíptera e Díptera, como também em ácaros (LIU *et al.*, 2003; ANGEL-SAHAGÚN *et al.*, 2005; MARANINNO *et al.*, 2006). A Tabela 1 mostra a relação de alguns artrópodes já estudados como possíveis hospedeiros do entomopatógeno *Metarhizium*.

No Brasil, o fungo *M. anisopliae* vem sendo utilizado desde 1970 para o controle da cigarrinha da cana-de-açúcar, cobrindo, aproximadamente, uma área de 500 mil hectares por safra. No entanto, ainda existem limitações para o uso de pesticidas biológicos, tais como a necessidade de um período maior que o dos agrotóxicos para a obtenção de resultados e a dependência das condições climáticas, já que são organismos vivos (ALVES, 1998).

O emprego de inseticidas microbianos já está regulamentado em diversos países, inclusive no Brasil. As medidas prescritas por entidades normativas incluem o registro dos produtos e a avaliação da segurança em relação aos usuários, impactos no meio ambiente e implicações na saúde pública. FARIA & WRAIGHT (2007) publicaram uma listagem com cobertura mundial dos biopesticidas e bioacaricidas registrados, em processo de registro ou distribuição comercial, ou não registrados e comercializados desde 1960. Nas últimas décadas foram desenvolvidos 171 inseticidas/acaricidas, sendo 35,7% destes formulados com o fungo *M. anisopliae* (Tabela 2).

Tabela 1: Possíveis hospedeiros do entomopatógeno *M. anisopliae*.

Artrópode-Alvo	Ação biológica (cultura atingida, hospedeiro ou doença transmitida)	Sensibilidade do Hospedeiro	Tipo de Estudo	Referência
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Bovinos, ovelhas, cabras e antílopes	média/alta	<i>in vitro/a</i> campo	KAAYA <i>et al.</i> , 1996
<i>Amblyomma variegatum</i>	Bovinos	baixa	<i>in vivo</i>	KAAYA <i>et al.</i> , 1996
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Bovinos	alta	<i>in vitro/a</i> campo	LEMON & JONSON, 2008.
<i>Tetranychus truncatus</i> , <i>T. turkestani</i>	Algodão	alta	<i>in vitro/a</i> campo	SHI <i>et al.</i> , 2008.
<i>Anopheles gambiae</i>	Vetor do <i>Plasmodium</i> , agente etiológico da malária	média/alta	<i>in vitro/a</i> campo	FARENHORST <i>et al.</i> , 2008. SCHOLTE <i>et al.</i> , 2006.
<i>Nezara viridula</i> <i>Euschistus heros</i> <i>Piezodorus guildinii</i>	Soja	baixa	<i>in vitro/a</i> campo	SOZA-GÓMEZ & NOSCARDI, 1998.
<i>Capnodis tenebrionis</i>	Pêssego	alta	<i>in vitro/a</i> campo	MARANINNO <i>et al.</i> , 2006.
<i>Haematobia irritans</i>	Doença (miíase) em humanos e animais	média	<i>in vitro/a</i> campo	ANGEL- SAHAGÚN <i>et al.</i> , 2005.

Tabela 2: Biopesticidas comercializados para o controle de pragas (tabela adaptada de BUTT, 2001 e FARIA & WRAIGHT, 2007).

Produto	Fungo	Alvo	Produtor
Mycotal	<i>Verticillium lecanii</i>	Mosca branca	Koppert, Holanda
Vertalec	<i>V. lecanii</i>	Afídeos	Koppert, Holanda
Biogreen	<i>M. anisopliae</i>	Larva de escaravelho em pastagens	Biocare Technology, Austrália
Bio-Path	<i>M. anisopliae</i>	Gafanhotos	EcoScience, EUA
Bio-Blast	<i>M. anisopliae</i>	Cupins	EcoScience, EUA
Cobican	<i>M. anisopliae</i>	Cigarrinha da cana - de -açúcar	Probiagro, Venezuela
Conidia	<i>Beauveria bassiana</i>	Broca do café	Live Systems Technology, Colômbia
Ostrinil	<i>B. bassiana</i>	Broca do milho	Natural Plant Protection, França
Cornguard	<i>B. bassiana</i>	Broca do milho europeu	Mycotech, EUA
Mycotrol GH	<i>B. bassiana</i>	Gafanhotos	Mycotech, EUA
Mycotrol WP & Botanigard	<i>B. bassiana</i>	Mosca branca e afídeos	Mycotech, EUA
Naturalis-L	<i>B. bassiana</i>	Pragas do algodoeiro	Troy Biosciences, EUA
Proecol	<i>B. bassiana</i>	Lagarta	Probiagro, Venezuela
Boverin	<i>B. bassiana</i>	Besouro do Colorado	Antiga URSS
Boverol e Boverosil	<i>B. bassiana</i>	Besouro do Colorado	Antiga Tchecoslováquia
Engerlingspilz	<i>B. bassiana</i>	Besouros	Andermatt, Suíça
Schweizer	<i>B. brongniartii</i>	Besouros	Eric Schweizer, Suíça
Melocont	<i>B. brongniartii</i>	Besouros	Kwisda, Áustria

Produto	Fungo	Alvo	Produtor
Green Muscle	<i>M. flavoviride</i>	Gafanhotos	CABI Bioscience, UK
PFR-97	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Mosca branca	ECO-Tek, EUA
Pae-Sin	<i>P. fumosoroseus</i>	Mosca branca	Agrobionsa, México
Laginex	<i>Lagenidium giganteum</i>	Larvas de mosquito	AgraQuest, EUA
Bovenat	<i>B. bassiana</i>	Mosca branca	Natural Rural, Brasil
Boveril WP ESALQ 447	<i>B. bassiana</i>	Mosca branca	Itaforte Industrial de Bioprodutos Agro-florestais Ltda, Brasil
BMNAT	<i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i>	Cigarrinhas, cupins, pulgões, percevejos, gafanhotos, lagartas, etc.	Natural Rural, Brasil
Biocerto para Cigarrinhas	<i>M. anisopliae</i>	Cigarrinhas	Biocerto Indústria e Comércio de Produtos Agropecuários Ltda, Brasil
Metanat	<i>M. anisopliae</i>	Cigarrinhas, cupins, pulgões, percevejos, gafanhotos, etc.	Natural Rural, Brasil
Metarril	<i>M. anisopliae</i>	Cigarrinhas	Itaforte Industrial de Bioprodutos Agro-florestais Ltda, Brasil

1.2.3 Pragas da agricultura candidatas ao controle por fungos entomopatogênicos

1.2.3.1 *Anticarsia gemmatalis*

A. gemmatalis é um inseto da Ordem Lepidóptera, da família Noctuidae, que ataca leguminosas, principalmente a soja, sendo por este motivo chamada de lagarta da soja. As lagartas adultas da família Noctuidae apresentam-se, morfologicamente, como mariposas de coloração variada (pardo-acinzentada) e hábito noturno. As fêmeas fazem a ovopostura durante a noite e, após três a cinco dias, os ovos eclodem, dando origem às lagartas, que passam a se alimentar das folhas (PRAÇA *et al.*, 2006). As lagartas geralmente apresentam coloração verde, com cinco estrias brancas longitudinais sobre o dorso e, em condições de alta densidade, apresentam a coloração negra. Possuem de cinco a seis ínstaes larvais e podem medir de 40-50 mm de comprimento (Figura 2). A capacidade de consumo da *A. gemmatalis* cresce com a idade da lagarta e, ao final da fase de desenvolvimento larval, que dura de 12 a 14 dias, um indivíduo pode consumir em média 90 cm² de folhas por ciclo (PRAÇA *et al.*, 2006).

Após o 5^o - 6^o ínstar larval, as lagartas param de se alimentar, ficam encolhidas, com aspecto umedecido e coloração rósea no dorso até a formação das pupas que, quando maduras, adquirem a coloração marrom escuro. Este período dura de 7 a 9 dias no solo. O ciclo de vida de *A. gemmatalis* dura, em média, 30 dias e pode, em um único ciclo da cultura da soja, desenvolver três gerações (PRAÇA *et al.*, 2006).

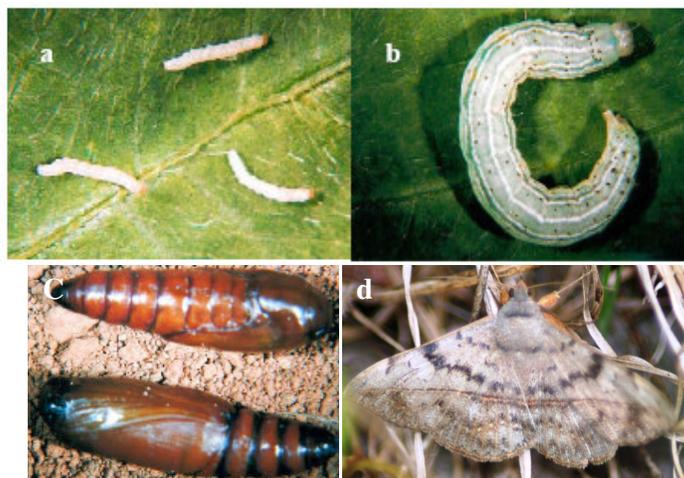


Figura 2: Diferentes estágios de desenvolvimento de *A. gemmatalis*. A, larvas de segundo ínstar; B, lagarta de quinto ínstar; C, pupas e D, mariposa (PRAÇA *et al.*, 2006).

A soja, *Glycine max*, é uma leguminosa de alto valor nutricional, rica em óleo e proteínas, sendo uma fonte importante de divisas para vários países, inclusive o Brasil. A produção de soja no Brasil está em torno de 50 milhões de toneladas, com área plantada de aproximadamente 22 milhões de hectares, sendo o segundo maior país produtor, consumidor e exportador de soja, perdendo somente para os Estados Unidos (MAPA, 2008).

Durante todo o seu ciclo, a soja é atacada por várias pragas, sendo seis as mais importantes: lagarta da soja (*A. gemmatalis*), lagarta-mede-palmo (*Pseudoplusia includens*), broca das axilas (*Epinotia aporema*), percevejo verde (*Nezara viridula*), percevejo pequeno (*Piezodorus guildinii*) e percevejo marrom (*Euschistus heros*). Dentre as pragas da soja, *A. gemmatalis* é uma das mais importantes, pois causa grandes danos à lavoura, que vão desde o desfolhamento até a destruição completa da planta. A lagarta da soja é um inseto mastigador e se alimenta de folhas jovens. Quando a folhagem é removida, a lagarta ataca outras partes da planta, como pecíolos e a haste. O desfolhamento compromete o enchimento das vagens, devido à diminuição da área foliar responsável pela fotossíntese, com conseqüente redução da produção de grãos. Quando se

alimentam, além de remover os tecidos vegetais, que contêm nutrientes, as lagartas injetam toxinas nas plantas (KNAAK & FIÚZA, 2005; PRAÇA *et al.*, 2006).

O controle das pragas da soja é realizado desde a década de 70 e, atualmente, é desenvolvido pelo programa integrado de manejo, que busca a diminuição da utilização de produtos químicos. O controle biológico tem sido extensivamente estudado para o controle destas lagartas e abrange o emprego de bactérias, fungos, vírus e parasitóides (AVANCI *et al.*, 2005). Baculovírus é utilizado anualmente em dois milhões de hectares cultivados com soja no Brasil e, em 20 anos, representou uma economia estimada entre R\$ 300 e 400 milhões. A utilização do *Baculovirus anticarsia* para o controle da *A. gemmatalis* trata-se de um dos melhores e maiores programas de controle biológico do mundo, desenvolvido pela Embrapa – Soja (MOSCARDI, 1999). Outro microrganismo muito eficiente que pode ser utilizado contra a lagarta da soja é *B. thuringiensis*, subespécie *kurstaki*. Esta bactéria age rapidamente, após ser ingerida pelas lagartas, que param de se alimentar em um a dois dias e morrem em cerca de dois a quatro dias. Embora *B. thuringiensis* seja um microrganismo de ação rápida, sua persistência no campo é curta, portanto não sendo visível a reincidência natural do agente após a morte das lagartas (LACEY *et al.*, 2001).

1.2.3.2 *Dysdercus peruvianus*

Hemípteras do gênero *Dysdercus* são os mais abundantes da família Pyrrhocoridae e parasitam, principalmente, plantas da família Malvaceae (algodão). A cópula pode durar de 1 a 7 dias e ocorre após a fêmea atingir a fase adulta, ficando macho e fêmea unidos pelo ápice do abdômen e voltados em direções opostas. A fêmea, depois de fecundada, prepara um ninho no solo para a postura, onde deposita os ovos. Em várias posturas, uma fêmea é capaz de produzir uma média de 246 ovos. Destes emergem as formas jovens que, após passarem por quatro estágios, tornam-se adultos (Figura 3). O ciclo dura em média 40 dias se contado desde o dia da primeira postura até a obtenção da primeira fêmea adulta (GONÇALVES, 2000).

Representantes do gênero *Dysdercus* Guérin Menéville, 1831 (Hemíptera: Pyrrhocoridae) são fitófagos e foram registrados atacando algodoeiro em diversas regiões do mundo, tais como no Brasil, na Argentina e no Paraguai, ainda que, de sua dieta

principal, também fazem parte plantas das famílias Amaranthaceae, Bombacaceae, Compositae, Rubiaceae e Sterculiaceae (GONÇALVES, 2000).

A adoção de técnicas de manejo de pragas do algodoeiro como lagartas, reduzindo a aplicação de agroquímicos, fez com que aumentasse a população dos percevejos do gênero *Dysdercus*. Estes, por sua vez, podem causar prejuízos consideráveis, que se relacionam à perda de peso da semente, à redução do teor de óleo, à possível inoculação de microrganismos nas sementes e, por fim, a manchas nas fibras do algodão, sendo por este fato denominados percevejos manchadores do algodão (MILANO *et al.*, 1999; STANISÇUASKI *et al.*, 2005).

A produção de algodão no Brasil está em torno de 3,66 milhões de toneladas, com área colhida de aproximadamente 1,25 milhões de hectares e rendimento de 2,91 Kg/ha. A cultura do algodão está em expansão e o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) possui o programa *Produtividade do Algodão e outras fibras*, que tem por objetivo a profissionalização de agricultores em cotonicultura em regiões de seca, através da incorporação de 16,6 mil hectares abandonados nas regiões Norte e Nordeste e de uma produção de aproximadamente 25 mil toneladas. Um relatório a respeito das projeções do agronegócio mundial e brasileiro, feito pelo MAPA (2008), mostra que, segundo a *Food and Agricultural Policy Research Institute* (FAPRI), a produção de algodão deverá crescer a uma taxa de 1,9% anual no período de 2006/07 a 2016/17 e que o Brasil será o quinto maior produtor mundial desta semente.

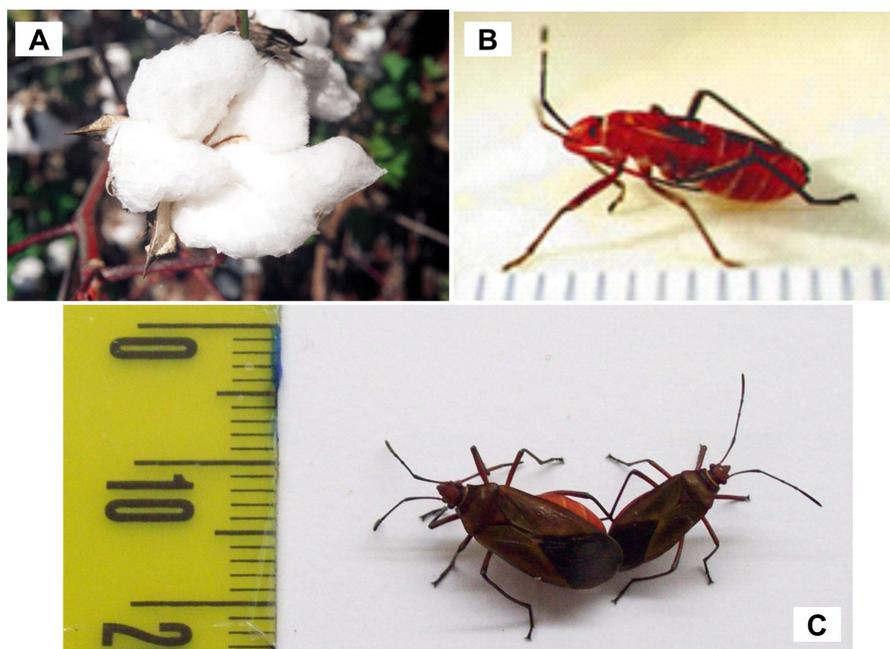


Figura 3: *D. peruvianus* e sua cultura-alvo, o algodão. A, está representada uma maça de algodão; B, uma ninfa de quarto estágio de desenvolvimento e C, fêmea e macho adultos copulando (Figura adaptada de GONÇALVES, 2000).

1.3 INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO

1.3.1 Ciclo biológico de *Metarhizium* em hospedeiros

O ciclo biológico de *M. anisopliae* em hospedeiros é iniciado com a adesão dos propágulos infectivos (conídeos) na superfície de seus alvos. Este processo inicial compreende três fases: adsorção, consolidação da interação e crescimento, e germinação. Estes eventos culminam na penetração ativa do fungo via tegumento do hospedeiro e colonização da hemolinfa do artrópode (CLARKSON & CHARNLEY, 1996; CASTRILLO *et al.*, 2005).

Sabe-se que a invasão dos entomopatógenos em organismos susceptíveis é um processo multifatorial que requer a atividade de inúmeras moléculas fúngicas. Estas podem ser secretadas para a interação física com o hospedeiro, podem permanecer aderidas à

superfície, ou até mesmo permanecerem no interior do patógeno. Existem várias moléculas que participam de forma direta ou indireta do processo infeccioso, estando entre elas substâncias efetoras da infecção, toxinas, enzimas imunossupressoras, transportadores que protegem o fungo das defesas dos artrópodes e componentes de vias de transdução de sinais, os quais são importantes para a adaptação do patógeno aos ambientes adversos (PEDRINI *et al.*, 2007).

O reconhecimento de um hospedeiro como susceptível envolve a interação entre fatores químicos e topográficos. A cutícula dos artrópodes é formada por três camadas: epicutícula, procutícula e epiderme. A epicutícula é a camada mais externa, bastante delgada (0,1 - 3µm) e formada por várias lâminas, cada uma com uma composição química particular. A face mais externa da epicutícula é formada por lipídeos que são resistentes à degradação enzimática e à água (PEDRINI *et al.*, 2007). Já a procutícula compõe a maior parte da cutícula e possui fibrilas de quitina embebidas em uma matriz protéica, juntamente com lipídeos e quinonas (Figura 4) (KANG *et al.*, 1999).

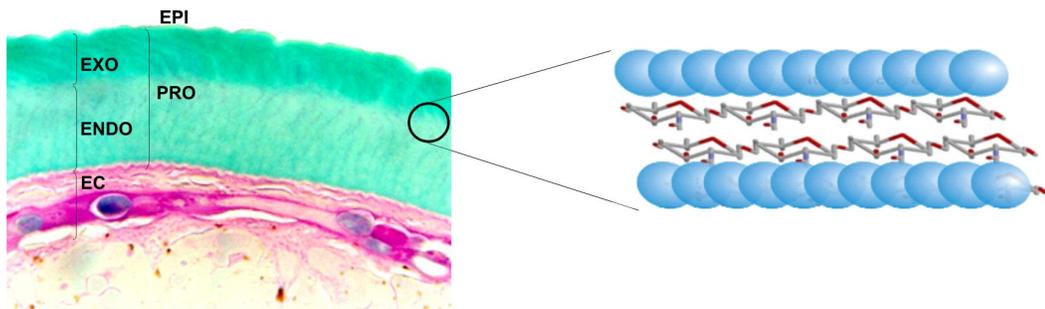


Figura 4: Fotomicrografia de tegumento de artrópode. ENDO: endocutícula, EXO: exocutícula, EPI: epicutícula, PRO: procutícula e EC, células epidérmicas. Detalhe mostra um esquema representando fibrilas de quitina. PAS-verde Luz, 640X (Figura adaptada de Arruda, 2005).

A adsorção e a aderência iniciais são consideradas um processo dependente, sobretudo de interações hidrofóbicas entre os conídios e a superfície do hospedeiro. Esta etapa inicial parece ser um dos pontos limitantes para o sucesso da infecção, e a identificação de genes que codificam e regulam hidrofobinas foi, recentemente, alvo de interesse científico. WANG & ST. LEGER (2007) e FANG *et al.* (2007) isolaram os genes

mad1 e *cag8*, respectivamente, sendo que a geração de mutantes nulos para ambos diminuiu a virulência de *M. anisopliae*. Ainda, a adesina MAD1 parece também influenciar não só a aderência, mas também a germinação dos conídios, a formação de blastosporos e a diferenciação dos corpos hifais (WANG & ST. LEGER, 2007).

Uma vez aderido, o conídeo germina e desenvolve, em sua extremidade distal, uma estrutura diferenciada e especializada na penetração, denominada apressório. Um grampo de penetração é formado a partir do apressório e, via pressão mecânica e secreção enzimática, ultrapassa a principal barreira física à infecção, a cutícula (CASTRILLO *et al.*, 2005). Recentemente, a identificação em *M. anisopliae* de um gene que codifica uma perilipina *Mpl1* (*Metarhizium perilipin-like protein*), proteínas envolvidas na estocagem de lipídeos em mamíferos, permitiu verificar a importância desta proteína na formação de apressório funcional. Linhagem mutante deste gene ($\Delta Mpl1$) apresentou apressórios com menor turgor, em decorrência de um menor acúmulo de lipídeos nessas estruturas e, conseqüentemente, foram menos virulentas para larvas de *Manduca sexta* (WANG & ST. LEGER, 2007a). A patogenicidade de *Magnaporthe grisea*, um ascomiceto fitopatogênico, também é influenciada por genes que possam estar envolvidos nas fases iniciais de infecção. Neste fungo, a inativação do gene *MgRho3* que codifica uma proteína da superfamília Ras envolvida na regulação da polarização celular, excitose e secreção vesicular faz com que sejam gerados apressórios com morfologia alterada e defectivos na penetração de mudas de arroz (ZHENG *et al.*, 2007).

Após a transposição da cutícula, as hifas se tornam espessas e formam blastosporos, os quais nutrem o fungo com a degradação das fontes de carbono presentes na hemolinfa do hospedeiro. Durante o desenvolvimento de *M. anisopliae* passam a ser produzidos pelo fungo metabólitos secundários, tais como ácido cítrico e oxálico, e também toxinas (BIDOCHKA *et al.*, 1997).

A adaptação dos entomopatógenos à hemolinfa dos hospedeiros e a capacidade de evadir do sistema imunológico tornam estes fungos altamente adaptados e especializados na infecção de uma grande variedade de artrópodes. Sabe-se que a infecção de *M. anisopliae* em *M. sexta* leva a alterações drásticas na composição lipídica do patógeno, além do acúmulo de solutos para o aumento da pressão osmótica interna e o aumento da expressão de genes na resposta não oxidativa. WANG *et al.* (2008) identificaram um gene que codifica um osmosensor responsável pela resistência de *M. anisopliae* a ambientes

com grande osmolaridade como a hemolinfa. O silenciamento gênico de *Mos1* (*Metarhizium osmosensor like protein*), pela técnica de RNAi, gerou linhagens com menor tolerância à pressão osmótica, formação de apressório com função alterada e deficiência na germinação. Também WANG & ST. LEGER (2006) haviam descrito a secreção de uma proteína antiadesiva, MCL1, que confere uma capa hidrofílica negativamente carregada ao redor das estruturas fúngicas, a qual promove a repulsão pelas células de defesa do artrópode, como também mascara substâncias imunogênicas da parede celular, como a β -glicana.

Além dos mecanismos dispostos pelos fungos para a penetração e proteção contra as defesas dos hospedeiros, muitos agentes biocontroladores possuem ainda a habilidade de sintetizar inúmeras substâncias tóxicas. As destruxinas compõem uma família de peptídeos cíclicos tóxicos, isolados pela primeira vez em 1961 do fungo *Oospora destructor* (*M. anisopliae*) (PEDRAS *et al.*, 2002). Estes hexapeptídeos tóxicos possuem uma ampla variedade de atividades biológicas, porém as mais estudadas são os efeitos inseticidas e fitotóxicos. As destruxinas A, B e E apresentam maior poder inseticida, e a sua administração, via aplicação tópica, ingestão ou injeção em insetos, causa paralisia tetânica e morte (PEDRAS *et al.*, 2002; HUA *et al.*, 2006). As destruxinas também apresentam efeito imunossupressor e em *Drosophila melanogaster*, a destruxina A suprime a expressão de genes envolvidos na resposta humoral contra patógenos, levando a um aumento da susceptibilidade a infecções (PAL *et al.*, 2007).

Uma das características que fazem biocontroladores fúngicos, incluindo *M. anisopliae*, agentes profícuos para o controle de pragas é a sua adaptação ao solo. A seleção de linhagens não só mais adaptadas às condições bióticas presentes no hospedeiro, mas também às condições abióticas, definem a capacidade de manutenção do antagonista natural em um determinado agrossistema (MEYLING & EILENBERG, 2006). Recentemente, ST. LEGER (2008) ressaltou a capacidade de *M. anisopliae* em colonizar e sobreviver na rizosfera de plantas, sendo este um ambiente propício para a interação entre plantas, insetos e microrganismos e um alvo ambiental importante para a manutenção e persistência do fungo no meio ambiente. O papel de *M. anisopliae* como endófito natural ainda não foi determinado, contudo se sabe que *B. bassiana* é capaz de colonizar tecidos vegetais sem causar danos aos mesmos (VEGA, 2008). Tal fato salienta a capacidade de manutenção de entomopatógenos em ambientes fora dos hospedeiros-alvo e,

conseqüentemente, o aumento das chances de manutenção destes fungos na natureza. As Figuras 5 e 6 mostram o ciclo biológico de *M. anisopliae* no meio ambiente e durante a infecção em hospedeiros, respectivamente.

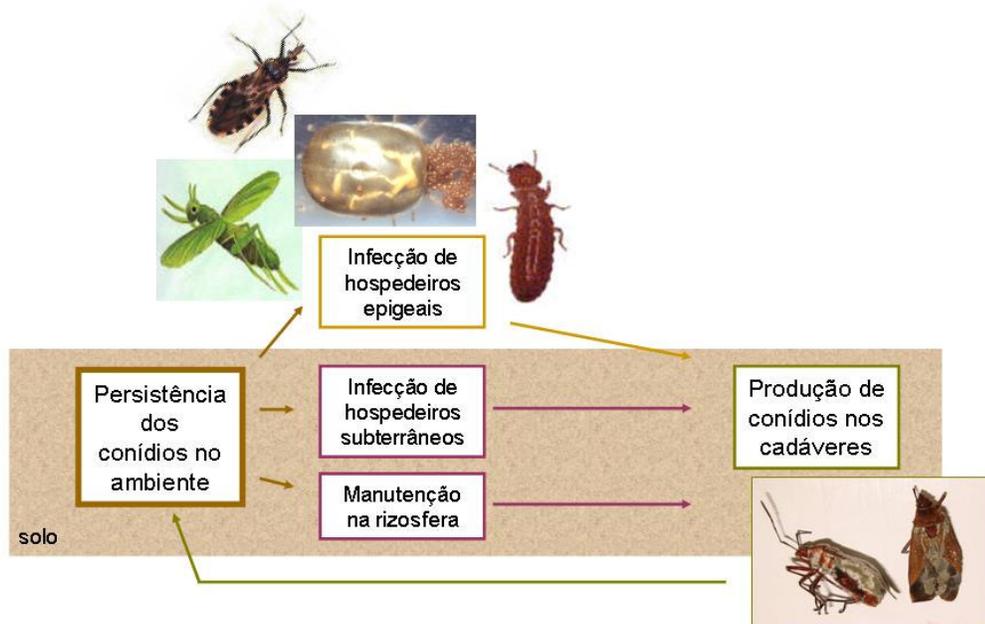


Figura 5: Ciclo biológico de *M. anisopliae* no meio ambiente e interação com artrópodes (Figura adaptada de MEYLING & EILENBERG, 2007).

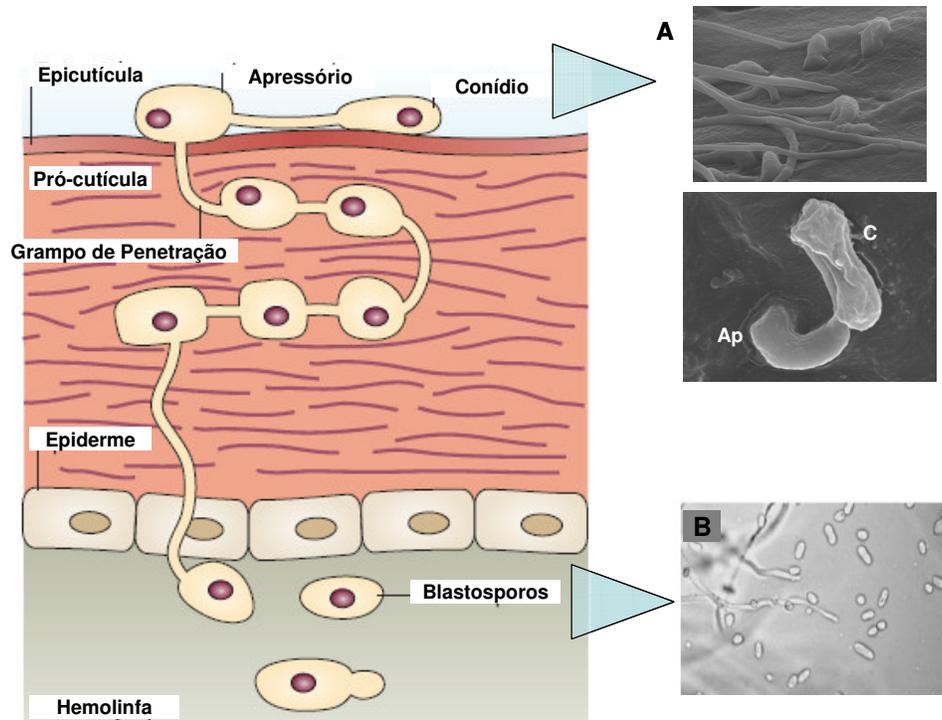


Figura 6: Processo de penetração e início do desenvolvimento de *M. anisopliae* em hospedeiros. Painel superior (A), fotos de microscopia eletrônica de varredura mostrando o crescimento de *M. anisopliae* sobre a superfície de um hospedeiro-alvo e início da penetração, Ap indica apressório e C, conídeo; painel inferior (B), microscopia óptica mostrando a formação de blastosporos por *M. anisopliae* (Figura adaptada de ARRUDA, 2005; THOMAS & READ, 2007 e WANG & ST. LEGER, 2007).

1.3.2 Secreção de enzimas

A produção e secreção de enzimas que degradam a cutícula durante a penetração do hospedeiro é bastante estudada. O fungo *M. anisopliae* produz uma série de enzimas hidrolíticas como proteases, quitinases e lipases, que agem de forma sinérgica para

infecção de artrópodes-alvo (ST. LEGER *et al.*, 1986a; ST. LEGER *et al.*, 1986b; ST. LEGER *et al.*, 1989a; ST. LEGER *et al.*, 1998; BARATTO *et al.*, 2003; MORAES *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005). Algumas das primeiras enzimas produzidas pelo fungo no momento da penetração, concomitantemente com a diferenciação da porção terminal da hifa em apressório, são as endoproteases e as aminopeptidases. A secreção de proteases e quitinases pelo entomopatógeno parece ser fundamental para o sucesso de penetração. *M. anisopliae* produz várias enzimas quitinolíticas, sendo a linhagem E₆ produtora de pelo menos seis enzimas com capacidade de degradar quitina (PINTO *et al.*, 1997; 1998; SILVA *et al.*, 2005).

1.3.2.1 Proteases

A penetração de *M. anisopliae* em hospedeiros requer a secreção de proteases, já que a cutícula dos mesmos é composta por grande quantidade de proteínas. Para tanto, *M. anisopliae* dispõe de um arsenal proteolítico composto por proteases do tipo subtilisina (Pr1), proteases do tipo tripsina (Pr2), cisteíno proteases (Pr4), metaloproteases e várias famílias de exo-peptidases. As proteases são secretadas não só no momento inicial da penetração, mas também após a transposição da cutícula (ST. LEGER *et al.*, 1998; GILLESPIE *et al.*, 1998). A grande quantidade de proteases produzidas durante o processo de infecção pode ser explicada pela composição química da cutícula de artrópodes. Entretanto, o significado biológico desta classe de enzimas vai além da fase inicial de penetração, podendo serem vitais para a utilização de proteínas do hospedeiro como fonte nutricional, destruição de proteínas antifúngicas do hospedeiro, como também para a ativação de precursores de toxinas do patógeno (ST. LEGER, 1994).

Dentre as proteases produzidas por *M. anisopliae*, a Pr1A é certamente a com maior destaque, pois a utilização de inibidores específicos para a mesma diminuiu a virulência de *M. anisopliae* em *M. sexta* (ST. LEGER, 1988). Além disso, a identificação de mutantes espontâneos deficientes em Pr1A e avaliados quanto à sua patogenicidade e virulência mostraram-se sensivelmente menos virulentos (WANG *et al.*, 2002). Ainda, ST LEGER *et al.* (1996) identificaram um aumento da virulência sobre *M. sexta* de uma linhagem com múltiplas cópias do gene desta subtilisina sob o controle de um promotor constitutivo, quando comparado com a linhagem selvagem. Insetos desafiados com a

linhagem mutante tiveram uma redução de 25% no tempo de morte e uma diminuição de 40% no consumo de alimento.

As proteases do tipo subtilisina, Pr1, compõem uma família com vários membros, sendo já descritas as PR1 de A até K. Vários trabalhos descrevem a sua importância no desenvolvimento de *Metarhizium* em diversos ambientes, tais como em exudatos de plantas, meios com restrição de nutrientes e meios com cutícula ou hemolinfa de insetos e, embora seja detectada a expressão destas subtilisinas em todas as condições, existem diferenças no tipo de enzima específico requerido em cada situação particular (WANG *et al.*, 2005).

BAGGA *et al.* (2004) fizeram uma avaliação global da diversidade das subtilisinas em *M. anisopliae*, e uma análise da similaridade da seqüência de nucleotídeos de regiões exon/intron permitiu o agrupamento destas enzimas em quatro grupos: subtilisina Pr1C (bacteriana); subfamília extracelular 1 (Pr1A, Pr1B, Pr1G, Pr1I e Pr1K); subfamília extracelular 2 (Pr1D, Pr1E, Pr1F e Pr1J) e uma subtilisina endocelular (Pr1H). As proteases da família Pr1 podem ter divergido na execução de múltiplas tarefas, podendo desempenhar diversos papéis na patogênese, como a adaptação a diferentes hospedeiros e a ambientes externos (BAGGA *et al.*, 2004).

Em 2005, a realização de uma análise da expressão gênica global de uma linhagem de *M. anisopliae*, cultivada em cutícula de *M. sexta* ou em meio com privação de nutrientes, permitiu a identificação de grupos de genes com aumento ou diminuição da expressão em ambas as condições. Verificou-se que Pr1A e Pr1B são induzidas tanto em meio pobre quanto em meio com cutícula, porém, na segunda condição, o aumento da expressão é mais marcante. Ainda, Pr1C e Pr1D tiveram a sua expressão rapidamente aumentada após 1h de cultivo em cutícula de *M. sexta* e Pr1E e Pr1K, após 4 e 8h, respectivamente (FREIMOSER *et al.*, 2005).

A identificação de inibidores de proteases produzidos pelos artrópodes durante o processo infeccioso constitui uma prova irrefutável da importância desta classe enzimática para a infecção de *M. anisopliae* em hospedeiros (SASAKI *et al.*, 2008).

1.3.2.2 Quitinases

Quitinases são enzimas encontradas em vírus, bactérias, fungos, insetos, plantas superiores e mamíferos com capacidade de hidrolisar a quitina, um polímero de *N*-acetilglicosamina com ligações do tipo β -1,4, amplamente distribuído na natureza. A atividade de quitinases é associada a diversas funções biológicas, como, por exemplo, ao desenvolvimento estrutural na parede de fungos, e pode ser utilizada como mobilizadora de fontes de carbono durante períodos de escassez de nutrientes, além de ser componente estrutural da concha de crustáceos, nematóides e exoesqueleto de insetos (MERZENDORFER & ZIMMICH, 2003; DAHIYA *et al.*, 2006).

As quitinases podem ser classificadas de acordo com o sítio de clivagem do substrato em duas categorias principais: as endoquitinases (EC 3.2.1.14), que clivam sítios randômicos internamente na cadeia polissacarídica, liberando multímeros de *N*-acetilglicosamina (NacGlc), como quitotetraose, quitotriose e di-acetilquitobioside; e as exoquitinases, que clivam as extremidades não redutoras de polímeros ou multímeros de NacGlc. As exoquitinases são ainda subdivididas em quitobiosidases (EC 3.2.1.29) e *N*-acetilglicosaminidases (EC 3.2.1.30). A clivagem de di-acetilquitobioside é realizada pelas quitobiosidases, e as acetilglicosaminidases clivam oligômeros oriundos da ação de endoquitinases e quitobiosidases, gerando monômeros de NacGlc (Figura 7) (DAHIYA *et al.*, 2006).

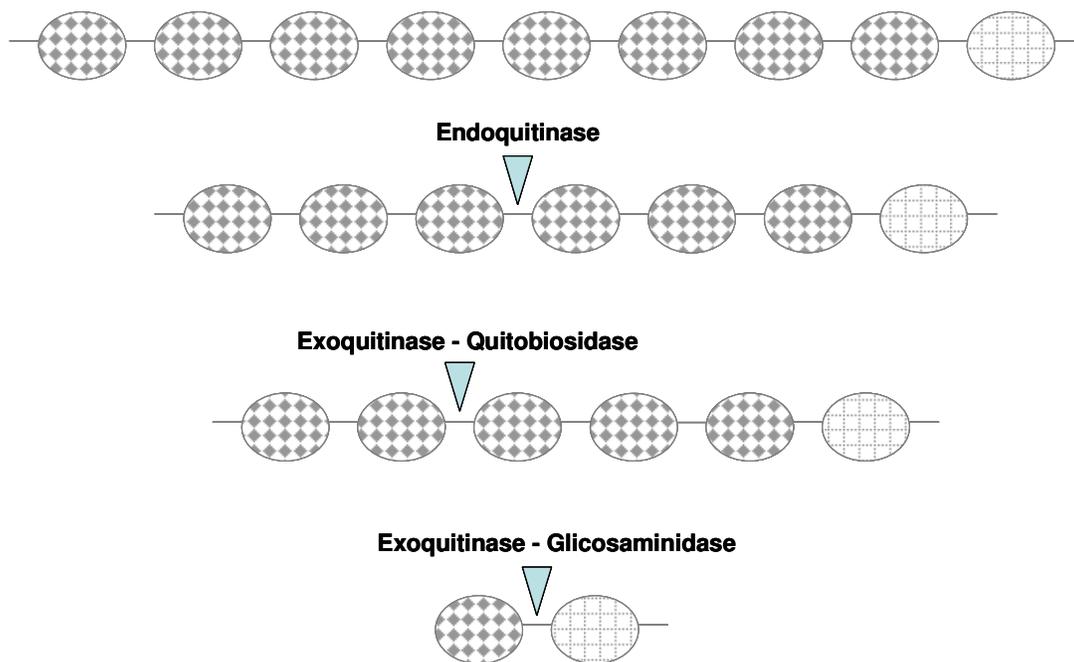


Figura 7: Mecanismo de ação das quitinases. As fibras de quitina estão representadas pelas esferas com losangos e as com quadriculado representam a extremidade redutora. As setas indicam o sítio de ação das endoquitinases e exoquitinases (modificado de PALMA, 2006).

Além do papel fisiológico das quitinases, acredita-se que estas sejam induzidas durante o processo de infecção de *Metarhizium* em hospedeiros, já que a principal barreira física dos mesmos à infecção fúngica é a cutícula. SILVA *et al.* (2005) verificaram, em gel de atividade, que a linhagem E6 de *M. anisopliae* possui pelo menos 6 isoformas destas hidrolases, as quais apresentaram massa molecular de 30, 33, 43,5, 45, 60 e 110 kDa. Não se sabe a função individual destas enzimas na patogênese de *Metarhizium* em artrópodes. Entretanto, a enzima CHIT30, originalmente purificada por PINTO *et al.* (1997) e analisada por SILVA *et al.* (2005), parece ser um fator de virulência importante para o entomopatógeno, pois é capaz de degradar inteiramente a quitina, já que tem atividade de endo e exoquitinase. Ainda, STAATS (2007) construiu mutantes nulos para o gene codificante da quitinase CHIT30 e observou que a linhagem mutante apresentava menor

virulência ao inseto manchador do algodão *D. peruvianus* em relação à linhagem selvagem E6.

Em outros sistemas fúngicos, as quitinases são sabidamente fatores de virulência. Em *B. bassiana*, por exemplo, a construção de uma linhagem superexpressando uma quitinase híbrida, contendo o domínio catalítico da enzima CHIT1 de *B. bassiana* e o domínio de ligação de quitina de uma quitinase de *Bombyx mori* (*Bbchit1* – *BmChBD*), aumentou a virulência a *Myzus persicae* do fungo transformante em relação à linhagem selvagem (FAN *et al.*, 2007).

A ação pontual das quitinases em processos específicos como o de infecção a patógenos requer a existência de um mecanismo de regulação bastante sensível. O modelo de regulação de quitinases em *M. anisopliae* segue o modelo de repressão/indução, em que a quitina e produtos de sua degradação induzem a secreção enzimática e a presença de fontes de carbono facilmente metabolizáveis como a glicose as reprime (MORAES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005). No entanto, a elucidação completa dos mecanismos que regulam a secreção das quitinases ainda não foi realizada e alguns trabalhos mostram que transcritos de genes que codificam quitinases aparecem durante o cultivo com glicose (BARATTO *et al.*, 2006; PALMA, 2006). Não obstante, as quitinases atuam em pHs ácidos, e a quitinase CHIT30 é induzida também durante choque térmico, indicando que existem outros fatores, como pH e temperatura, que participam da regulação da atividade desta classe enzimática (ST. LEGER *et al.*, 1998; STAATS, 2007).

1.3.3 Resposta do Hospedeiro às Infecções

O estabelecimento de uma infecção depende da interação entre patógeno e hospedeiro. Linhagens mais virulentas do patógeno possuem fatores que as auxiliam a sobrepujar as respostas geradas pelo hospedeiro contra agentes estranhos. O sucesso evolutivo dos insetos é, em parte, decorrente da capacidade de constituir um sistema de defesa sofisticado, efetivo e altamente adaptável contra inúmeros microrganismos, inclusive contra os fungos patogênicos (BOGUS *et al.*, 2007). A primeira linha de defesa contra invasores nos artrópodes é, como nos vertebrados, as barreiras físicas do sistema imunológico. Estas são compostas principalmente pelo tegumento intestinal e pela cutícula, uma barreira formada por carboidratos e proteínas que confere proteção contra danos

físicos e ataques de agentes patogênicos (LAVINE & STRAND, 2002; OTTAVIANI, 2005). Os invertebrados não possuem anticorpos verdadeiros e nem resposta imune adaptativa, porém, a resposta imune inata é bastante ativa, sendo composta por mecanismos humorais e celulares cuja atividade é dependente da capacidade de reconhecimento de substâncias como próprias e não-próprias e que atuam sobre o patógeno após a sua passagem através da cutícula (LAVINE & STRAND, 2002; MULLEN & GODSWORTHY, 2006).

A resposta imune humoral é dada pela ação de proteínas antimicrobianas como lisozima, lecitinas, cecropinas, defensinas e radicais reativos de oxigênio e nitrogênio produzidos pelo corpo gorduroso e, em menor grau, pelas células de defesa. MULLEN & GODSWORTHY (2006) estudaram a resposta de cupins contra *M. anisopliae* e, após o estímulo imunogênico, verificaram a ativação da enzima fenoloxidase, o que resultou na produção de quinonas citotóxicas, as quais podem sofrer polimerização e formar melanina. ROYET & DZIARSKI (2007) salientam que, juntamente com o processo de fagocitose, o papel da enzima fenoloxidase na produção de reativos tóxicos e formação de melanina é uma das formas de resposta imunológica mais importante nos insetos.

Outra ferramenta relevante contra patógenos é a capacidade que certos artrópodes possuem de ajustar a sua temperatura corporal a valores extremos que possam prejudicar ou impossibilitar o desenvolvimento de invasores. Aliado a isto, o aumento de temperatura corporal gerado nos processos febris em resposta à infecção pode contribuir de forma substancial para a não adaptação do agente patogênico (ELLIOT *et al.*, 2002; BOGUS *et al.*, 2007).

A resposta imune celular é mediada pela ação dos hemócitos ou imunócitos que desempenham papel fundamental no combate a invasores, pela sua atuação na fagocitose, encapsulamento e compartimentalização de moléculas estranhas (BOGUS *et al.*, 2007; BORGES *et al.*, 2008).

Hemócitos são células de defesa capazes de reconhecer substâncias estranhas pela interação direta de receptores de superfície (*pattern-recognition receptors* – PRRs) com componentes moleculares dos invasores (*pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs) ou, indiretamente, pelo reconhecimento de receptores humorais que opsonizam as moléculas estranhas, facilitando assim a fagocitose (LAVINE & STRAND, 2002; ROYET & DZIARSKI, 2007).

A classificação celular dos hemócitos é dificultada, pois a sua proliferação ocorre na hemolinfa, estando presentes nestes tipos celulares de diferentes estágios de maturação. De qualquer modo, os imunócitos podem ser divididos em seis tipos celulares principais: pró-hemócitos, plasmatócitos, células granulares, cistócitos ou coagulócitos, esferócitos e oenocitóides (Figura 8) (OTTAVIANI, 2005). Plasmatócitos e granulócitos são os tipos celulares principalmente envolvidos nos processos fagocitários (LING & YU, 2006; BORGES *et al.*, 2007), sendo conservados evolutivamente e caracterizados pelo reconhecimento, internalização e destruição de moléculas estranhas (BLANDIN & LEVASHINA, 2007). Em 2007, BORGES e colaboradores identificaram cinco tipos de imunócitos no Hemíptera *Rhodnius prolixus*: pró-hemócitos, plasmatócitos, oenocitóides, adipócitos e granulócitos. Os pró-hemócitos apresentaram-se como células ovóides com um núcleo proeminente; os plasmatócitos possuíam padrão polimórfico e, nos granulócitos, foi possível observar a presença de grânulos. Dentre as células observadas, somente plasmatócitos pareceram estar envolvidos na fagocitose de partículas estranhas.

A nodulação e o encapsulamento consistem na formação de agregados celulares ao redor de partículas estranhas. Tanto no encapsulamento de alvos maiores, como parasitos, fungos e protozoários, quanto na formação de nódulos ao redor de populações de microrganismos (Figura 9), os granulócitos e plasmatócitos são ativados passando a ter um fenótipo de células adesivas (LAVINE & STRAND, 2002). Após um contato inicial com os agentes estranhos, os granulócitos sofrem degranulação, liberando assim substâncias adesivas que se depositam ao redor dos agentes que as estimularam; como também, estimulam os plasmatócitos a formar uma cápsula que se torna melanizada pela ação dos granulócitos (OTTAVIANI, 2005).

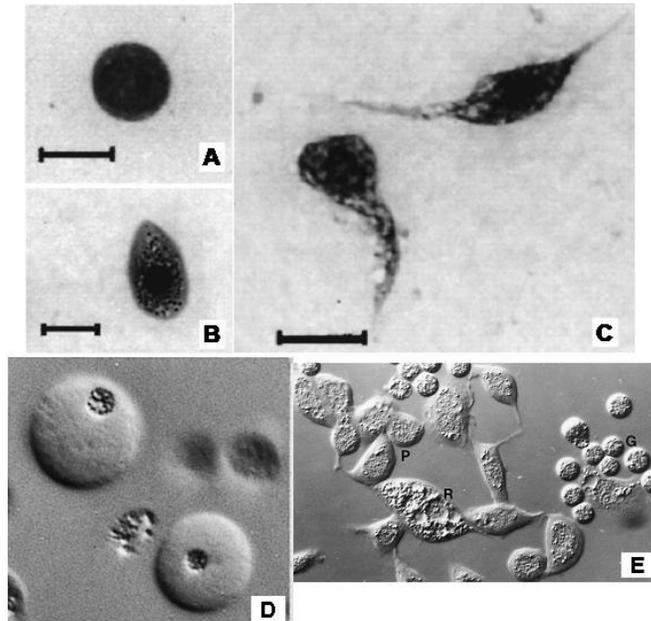


Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura de hemócitos. Os painéis A, B e C mostram células do Hemíptera *R. prolixus*, em que as letras representam: A, pró-hemócitos; B, granulócitos e C, plasmatócitos. Os painéis D e E mostram: granulócitos, G; plasmatócitos, P e células refratárias, R de *Lymantria dispar*. Barras indicam 10µm (Figura adaptada de BUTT & SHIELDS, 1996 e BORGES *et al.*, 2008).

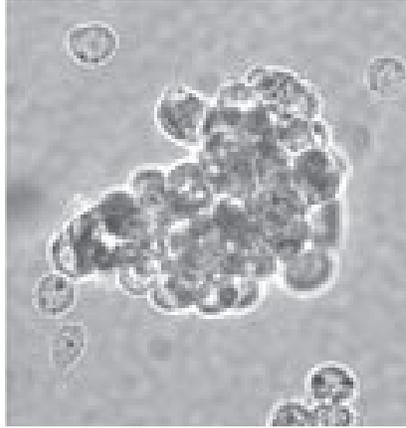


Figura 9: Microscopia óptica mostrando a formação de nódulo com melanização em *Ceratitis capaitata*. A fotografia foi realizada após 60min do desafio com a bactéria *Escherichia coli*. Figura extraída de SIDERI *et al.*, 2007.

2 OBJETIVO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o potencial do fungo *M. anisopliae* como agente biocontrolador de *D. peruvianus* e *A. gemmatalis*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar as atividades de quitinases e proteases de diferentes linhagens de *M. anisopliae*, em presença de cutículas de artrópodes.

Realizar bioensaios com diferentes linhagens de *M. anisopliae*, nos hospedeiros *D. peruvianus* e *A. gemmatalis*.

Avaliar a resposta celular dos hospedeiros durante o processo infectivo.

3 MATERIAL & MÉTODOS

3.1 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTIVO

3.1.1 Meio BDA (Ágar-Batata)

Glicose	2% (m/v)
Caldo de batata cozida	20% (v/v)*
Ágar	1,5% (m/v)

Completar com água destilada para 100 mL e ajustar para pH 6,0.

Autoclavar a 120 °C, durante 20min.

*O caldo de batata cozida foi preparado com o cozimento de 200 g de batata em aproximadamente 800 mL de água destilada por, em média, 10 min.

3.1.2 Meio de Cove (MC)

Nitrato de sódio	0,6% (m/v)
*Glicose	1% (m/v)
Ágar	2% (m/v)

Completar com água destilada para 100 mL e ajustar o pH para 6,0 com NaOH 1M.

Autoclavar a 120 °C, durante 20 min, e adicionar assepticamente:

Solução de sais 2% (v/v)

Solução de elementos-traços 0,04% (v/v)

* Nos meios que continham cutícula de artrópodes, a glicose foi substituída pela fonte de carbono desejada.

3.1.3 Solução de Sais

KCl	2,6% (m/v)
MgSO ₄ 7H ₂ O	2,6% (m/v)
KH ₂ PO ₄	7,6% (m/v)

3.1.4 Solução de elementos-traços

Na ₂ B ₄ O ₇ 7H ₂ O	0,004% (m/v)
---	--------------

FeSO ₄	0,001% (m/v)
MnSO ₄ 2H ₂ O	0,08% (m/v)
NaMnO ₄ 2H ₂ O	0,08% (m/v)
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,08% (m/v)

Adicionar HCl 12 M até a dissolução e completar com água destilada para 100 mL.

3.1.5 Preparação das cutículas

As cutículas dos artrópodes estudados no presente trabalho foram obtidas de formas adultas de *Ripichefalus (Boophilus) microplus*, *D. peruvianus* e *A. gemmatalis*. Para *R. (B.) microplus*, foi feito corte na extremidade posterior das teleógenas dos carrapatos e feita secção medial total, separando o ácaro em duas partes. As cutículas de *D. peruvianus* e *A. gemmatalis* sofreram secção nas extremidades, anterior e posterior, e foram pressionadas até saída do conteúdo interno. Todas as cutículas foram lavadas extensivamente com água destilada e esterilizadas em autoclave a 120 °C, por 20min, e mantidas a 4 °C para posterior utilização como fonte única de carbono, nos meios suplementados com cutícula.

3.2 MICRORGANISMOS

O microrganismo utilizado para o desenvolvimento dos experimentos foi o fungo filamentoso *Metarhizium anisopliae* (METSCH) SOROKIN, linhagens E6, CG30, CG47, CG97, CG125, CG343, CARO12 e Nordeste, originalmente isoladas de diferentes regiões e de hospedeiros naturais do entomopatógeno (Tabela 3).

Tabela 3: Linhagens de *M. anisopliae* utilizadas durante o trabalho.

Linhagem/Número de acesso no GenBank	Espécie Fúngica/Identificação da espécie e/ou variedade baseada na região ITS	Hospedeiro Natural	Origem Geográfica
E6 <u>EF051705</u>	<i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Deois flavopicta</i>	Espirito Santo/BR
Nordeste <u>EF051708</u>	<i>Metarhizium sp</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Mahanarva postigata</i>	Pernambuco/BR
CARO12 <u>EF051711</u>	<i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Schistocerca piceifrons</i>	México
CG30 <u>EF051715</u>	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Deois flavopicta</i>	Espirito Santo/BR
CG47 (ARSEF552) <u>EF051719</u>	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Galactica</i> sp	Minas Gerais/BR
CG97 <u>EF051721</u>	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Coleoptera</i>	Brasília/BR
CG125 (EMBRAPA) <u>EF051722</u>	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Monalonion annulipes</i>	Pará/BR
CG343 (ARSEF 23) <u>EF051726</u>	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Curculio caryae</i>	Carolina do Sul/EUA

3.2.1 Manutenção das Linhagens de *Metarhizium anisopliae*

As culturas de *M. anisopliae* foram mantidas a partir da semeadura em ponto de esporos do fungo em placas de Petri com meio BDA (3.1.1). As placas foram incubadas a 28 °C até a esporulação (Figura 10), com posterior estocagem em refrigerador a 4 °C. Para o preparo das suspensões de esporos, as culturas foram repicadas em estrias em meio BDA e incubadas em estufa a 28 °C até a esporulação. Com auxílio de uma alça de Drigalsky, os esporos foram suspensos em 5 mL de solução de Tween 80 (0,1%, v/v), transferidos com

pipeta de Pasteur para um tubo e centrifugados a 12000 RPM, por 15min. O sedimento de esporos foi lavado com água destilada e novamente centrifugado. Para obtenção de suspensão-estoque, adicionou-se aos esporos solução de glicerol 10% (v/v) e, posteriormente, foi determinada a concentração de conídeos pela contagem em Câmara de Neubauer. Todas as soluções e vidrarias utilizadas para o preparo das suspensões foram anteriormente esterilizadas em autoclave.

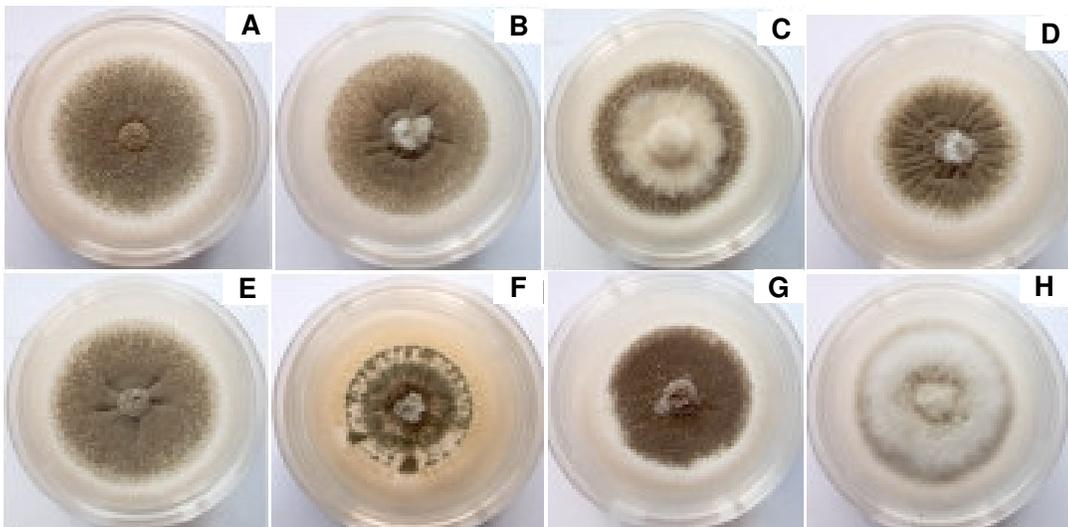


Figura 10: Linhagens de *M. anisopliae*. A, E6; B, CG30; C, CG343; D, CG47; E, CG97; F, CG125; G, C12 e H, Nordeste (Figura adaptada de Arruda, 2005).

3.2.2 Cultivo de *M. anisopliae* em diferentes fontes de carbono, para avaliação da atividade enzimática

Para a verificação da produção de quitinases e proteases secretadas no sobrenadante de cultivos por *M. anisopliae*, foi feito o seu cultivo em meio MC (3.1.2), suplementado com as diferentes fontes de carbono: glicose 1% (m/v), cutícula de *R. (B.) microplus* 1% (m/v), cutícula de *D. peruvianus* 1% (m/v), cutícula de *A. gemmatalis* 1% (m/v).

Os cultivos que continham glicose tiveram a cada 24h reposição da condição de carbono para uma concentração final de 1%.

O inóculo constou de suspensões de esporos na concentração de 1×10^6 esporos/mL. Os cultivos foram mantidos a 28 °C em agitação constante de 120 RPM por

até 96h e, após o tempo de cultivo desejado, foi feita a filtração do micélio em papel filtro (Whatman #1). O sobrenadante das culturas foi coletado e dialisado contra água por 24h a 4 °C, para posterior análise da fração protéica secretada.

3.3 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

3.3.1 Determinação da atividade de quitinases

A determinação da atividade de quitinases no sobrenadante de cultivos de *M. anisopliae*, em diferentes fontes de carbono, foi realizada segundo SELVAGGINI *et al.* (2004). Os substratos 4-metilumbeliferil- β -D-*N,N'*-diacetilquitobiose e 4-metilumbeliferil- β -D-*N,N',N'*-triacetilquitotriose (Sigma-Aldrich) foram utilizados para a determinação da atividade de exoquitinases (quitobiosidases) e endoquitinases, respectivamente. Os ensaios foram feitos em microplaca, contendo em cada poço de reação 5 μ L de substrato (0,4 mM), 80 μ L de tampão acetato 0,1M pH 5 e 20 μ L de amostra. Após 30min de incubação a 37 °C, as reações foram bloqueadas pela adição de 120 μ L de tampão glicina/NaOH 0,1M pH 10,6. A hidrólise dos substratos foi monitorada pela medida da fluorescência em fluorímetro *SpectraMax* (*Molecular Devices Corporation*, USA), pela emissão a 460nm e excitação a 355nm. A atividade enzimática é expressa em unidades (U), sendo que cada unidade é definida pela quantidade de enzima necessária para a liberação de 1pmol de 4-metilumbeliferona/mL/min.

3.3.2 Determinação da atividade de proteases

A atividade de proteases do tipo serino-proteases e subclasse das subtilisinas foi realizada pela incubação de alíquotas de 20 μ l de cada amostra com 300 μ M do substrato *N*-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-Nitroanilida (Sigma-Aldrich) e adição de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8, até obtenção de um volume final de 100 μ l. Após adição do substrato, as amostras foram incubadas a 37 °C por 30min, sendo a absorbância de 405nm avaliada em intervalos de 20s em fluorímetro *SpectraMax* (*Molecular Devices Corporation*, USA).

3.3.3 Determinação de proteína total

A proteína total presente nos sobrenadantes de *M. anisopliae*, nas diferentes condições de cultivo, foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.4 BIOENSAIOS

3.4.1 Bioensaios com *D. peruvianus*

A avaliação da atividade entomopatogênica das diferentes linhagens de *M. anisopliae* sobre o percevejo do algodão *D. peruvianus* foi realizada em grupos de 20 insetos, machos ou fêmeas, e a resposta do hospedeiro, analisada em intervalos de 24h. Os insetos foram inicialmente lavados com solução de hipoclorito de sódio 0,05%, solução salina 0,87% e água destilada e, posteriormente, mergulhados por 30s em cada uma das suspensões de esporos de *M. anisopliae*, na concentração de 10^8 esporos/mL, e mantidos em câmara de germinação a 28 °C, com umidade relativa de 90% e fonte de água e alimento *ad libitum* (Figura 11). Os bioensaios foram mantidos até obtenção de 100% de mortalidade e, para análise das fêmeas, os ovos foram coletados e pesados. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e o grupo controle, desafiado contra água destilada estéril.

Os insetos mortos foram coletados e mantidos a 28 °C até crescimento fúngico e esporulação na superfície do artrópode.

Alternativamente, foi realizada a aplicação de esporos, pela injeção de conídeos na região abdominal dorsal de machos, das linhagens E6, CG47 e CG97.

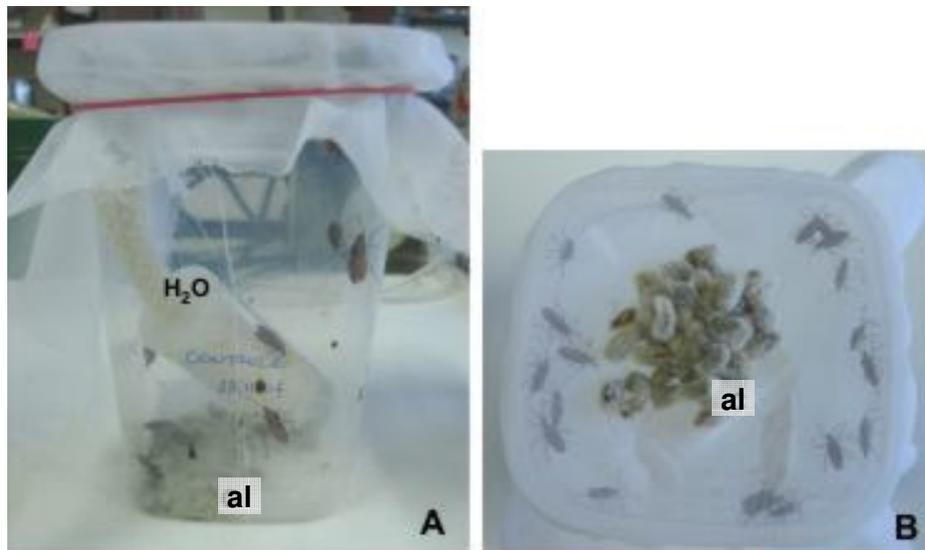


Figura 11: Bioensaios com *D. peruvianus*. O painel A mostra o grupo controle de um bioensaio com fêmeas, com o alimento (al) mantido no interior do pote juntamente com a fonte de água (H₂O) e, o painel B, mostra um grupo com machos e o fornecimento do alimento (al) pela parte superior do recipiente.

3.4.2 Bioensaios com *A. gemmatalis*

Para a avaliação da ação de *M. anisopliae* contra a lagarta da soja *A. gemmatalis*, foram utilizados insetos no terceiro estágio larval. Grupos de 20 lagartas foram desafiadas com as diferentes linhagens fúngicas, sendo as suspensões de esporos (10⁸ esporos/mL) colocadas em papel filtro (Whatman #1), sobre o qual as larvas eram dispostas e mantidas em câmara de germinação a 28 °C e umidade de 90%, por 24h. Após este período de exposição, o papel filtro era retirado e as lagartas, mantidas nas mesmas condições de temperatura e umidade anteriormente utilizadas, e observadas diariamente até a transformação para o estágio de pupa. Os grupos controles foram desafiados com água destilada e todos os ensaios foram realizados em triplicata. As lagartas mortas eram coletadas, lavadas com hipoclorito de sódio 0,05% e água destilada estéril, e semeadas em meio mínimo com incubação a 28 °C, até crescimento fúngico e esporulação na superfície do artrópode.

3.5 ANÁLISE DA RESPOSTA A INFECÇÃO PELOS HOSPEDEIROS *D. peruvianus* E *A. gemmatalis*

A avaliação da resposta dos artrópodes à infecção por *M. anisopliae* foi realizada pela contagem do número de células de defesa dos mesmos. Após 4, 24, 48 e 72h de infecção, amostras de hemolinfa dos insetos foram coletadas e imediatamente utilizadas para a determinação do número de hemócitos em câmara de Neubauer. A avaliação parcial dos tipos celulares encontrados nos diferentes hospedeiros foi feita pela coloração de esfregaço de hemolinfa, pelo método do panótico rápido (Laborclin), e registrados utilizando-se o sistema de fotodocumentação (Axiocam MRc – Zeiss), acoplado ao microscópio ótico (*Axioskop 40 - Zeiss*).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nos ensaios enzimáticos foram examinados por análise de variância (ANOVA) e os valores, comparados pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SPSS 13.0; valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

A avaliação da atividade entomopatogênica de *M. anisopliae* sobre os diferentes artrópodes foi analisada, e o tempo letal médio (TL50) e os limites de confiança, determinados pelo método de *probit* do programa SPSS 13.0.

4 RESULTADOS

Este trabalho mostra, inicialmente, a secreção de quitinases e proteases por diferentes linhagens do entomopatógeno *M. anisopliae*, durante o cultivo em fontes de carbono possivelmente indutoras (cutículas de artrópodes) ou repressoras (glicose). As mesmas linhagens foram também avaliadas, quanto ao seu potencial entomopatogênico, contra dois diferentes possíveis hospedeiros, o percevejo manchador do algodão *D. peruvianus* e a lagarta da soja *A. gemmatalis*. Por fim, foi realizada uma breve análise da resposta imune fagocitária dos artrópodes desafiados com *M. anisopliae*.

4.1 SECREÇÃO ENZIMÁTICA DE *M. anisopliae* EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Algumas enzimas, como as proteases e as quitinases, são consideradas fatores de virulência para a atividade inseticida de *M. anisopliae*, portanto, a capacidade de determinadas linhagens de produzir e secretar estas enzimas, em condições específicas, pode indicar uma maior capacidade entomopatogênica (SILVA *et al.*, 2005; CASTELLANOS-MOGUEL *et al.*, 2007).

As linhagens E6, CG30, CG343, CG47, CG97, CG125, C12 e Nordeste foram cultivadas em meios contendo cutícula de artrópodes como única fonte de carbono, assim como em meio rico contendo glicose, todos na concentração de 1%. Após 24, 48, 72 e 96h de cultivo, as culturas foram filtradas e os sobrenadantes, utilizados para a determinação da proteína total e da atividade enzimática.

4.1.1 Quitinases

A atividade de endoquitinases e exoquitinases foi detectada em todas as linhagens e em todas as condições testadas. Entretanto, mostrou-se quantitativamente variável, principalmente no que se refere à fonte de carbono utilizada e ao tempo de cultivo do fungo. De forma geral, embora tenha ocorrido um aumento na atividade de ambas as quitinases ao longo do tempo, ocorreu uma atividade mais expressiva de exoquitinases (frente a 4-methylumbelliferyl- β -D-N,N'-diacetylchitobioside [4-UM-(GlcNAc)₂]) em todas as condições de cultivo testadas em relação à atividade de endoquitinases (frente à 4-

methylumbelliferyl- β -D-N,N',N'-triacetylchitotrioside [4-UM-(GlcNAc)₃]) (Figuras de 12 a 15). As maiores atividades foram encontradas nas condições de cultivo em que se utilizaram glicose e cutícula de *R. (B.) microplus* como única fonte de carbono.

A Figura 12A mostra a secreção de exoquitinases após 24h de cultivo. Neste tempo e com a utilização de glicose, a linhagem CG47 mostrou uma maior atividade em relação às demais testadas (43 vezes superior à CG125 e 3 vezes superior à E6 e CG343). Quando a fonte de carbono utilizada foi a cutícula de carrapato, as linhagens CG343 e C12 apresentaram maior atividade, sendo a primeira 2 vezes superior à E6, 10 vezes à Nordeste e 35 vezes à CG47; e a segunda 3,9 vezes superior à E6, 14 vezes à Nordeste e 48 vezes à CG47.

A atividade de endoquitinases após 24h de cultivo foi significativamente inferior à de exoquitinases (11 vezes), porém a atividade de endoquitinases nos meios que continham glicose foi maior do que nas demais condições testadas, especialmente quando levada em consideração a linhagem Nordeste (Figura 12B). Ainda, nestas mesmas condições, a expressão de quitinases pelas linhagens CG343 e C12 parece sofrer repressão da fonte de carbono empregada, padrão este que se manteve constante até 96h de cultivo para a linhagem C12.

Após 48h de incubação, em glicose, a linhagem C12 mostrou acentuada atividade de exoquitinases. Todavia, nesta mesma condição de cultivo, conforme o anteriormente descrito, a atividade de endoquitinases foi de 20 (CG343 e CG97) a 100 (E6, CG47 e CG125) vezes inferior à das demais linhagens (Figura 13B).

Como mostra a Figura 13, com a utilização de cutícula de *R. (B.) microplus*, as maiores atividades de exoquitinases foram detectadas em sobrenadantes de cultivos de E6 e CG343 e, para endoquitinases, além de E6 e CG343, também se destacou a linhagem CG97. O substrato 4-UM-(GlcNAc)₃, quando incubado com sobrenadantes de cultivos da linhagem CG343 por 48h em carapaça de *A. gemmatalis*, possibilitou a detecção de enzimas hidrolíticas de 2 (Nordeste) a 11 (CG125) vezes superior à dos outros isolados fúngicos.

Uma análise global da atividade de endoquitinases permitiu verificar que a secreção das mesmas aumentou com o passar do tempo, sendo marcante em 72 e 96h de cultivo (Figuras 14B e 15B). As linhagens E6 e CG343, após 72h de cultivo, apresentaram acentuada atividade, tanto endo- (de 2 até 300 vezes superior) quanto exoquitinolítica (de

12 até 90 vezes superior), em cutícula de *R. (B.) microplus* como fonte de carbono. Embora o emprego de cutículas de *D. peruvianus* ou *A. gemmatilis* não tenham sido fortes indutoras da atividade quitinolítica, quando comparadas à glicose e à carapaça de carrapato, a atividade de quitinases, após 96h de cultivo, foi mais expressiva para a linhagem CG343 (Figura 15).

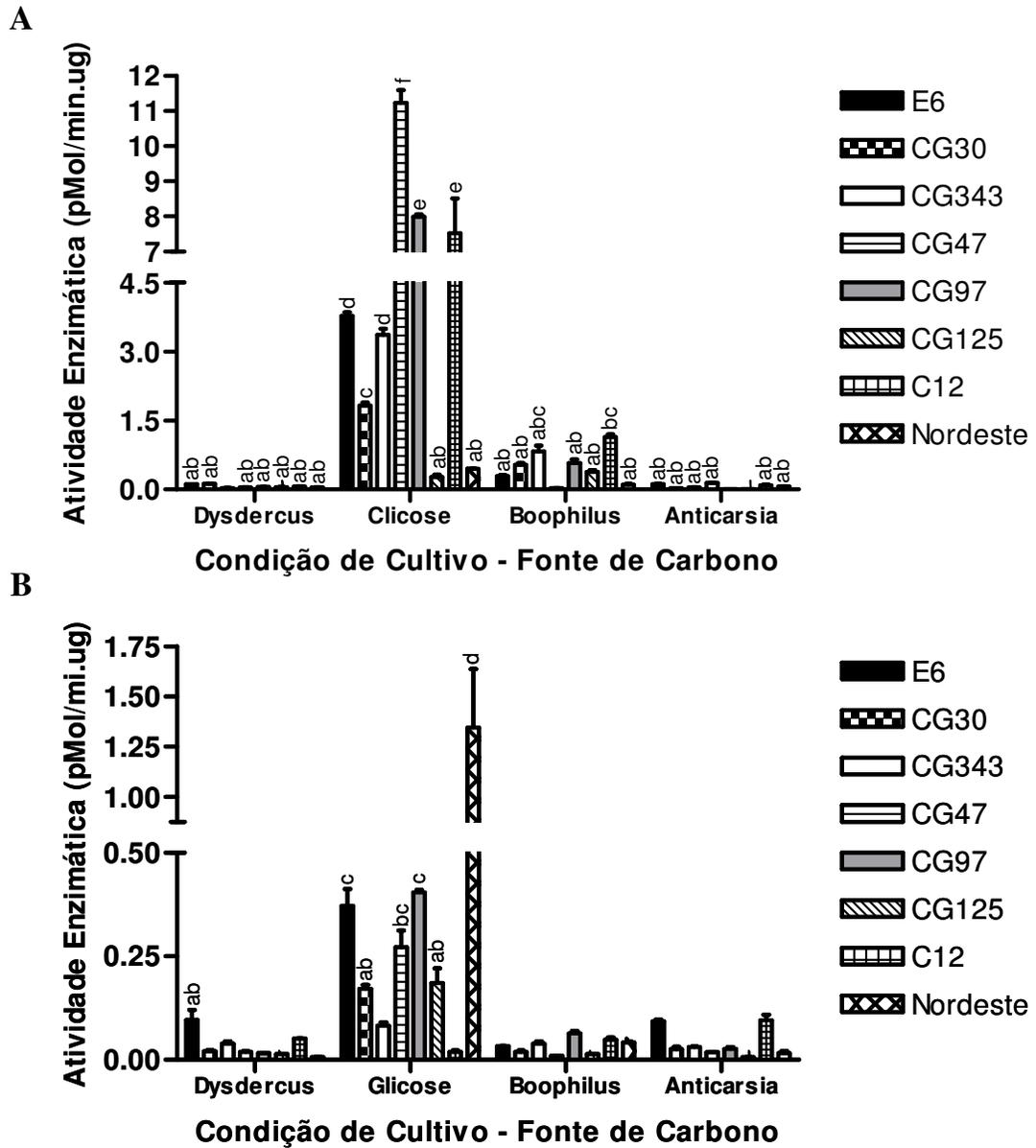


Figura 12: Atividade de quitinases após 24h de cultivo de *M. anisopliae*. As linhagens do fungo foram cultivadas a 28 °C por 24h em meios contendo diferentes fontes de carbono e o sobrenadante, coletado e utilizado nos ensaios enzimáticos. O painel A mostra a atividade de exoquitinases gerada pela incubação com 4-UM-(GlcNAc)₂ e o painel B endoquitinases com 4-UM-(GlcNAc)₃. As diferentes letras representam amostras com diferenças estatísticas significantes (p<0,05).

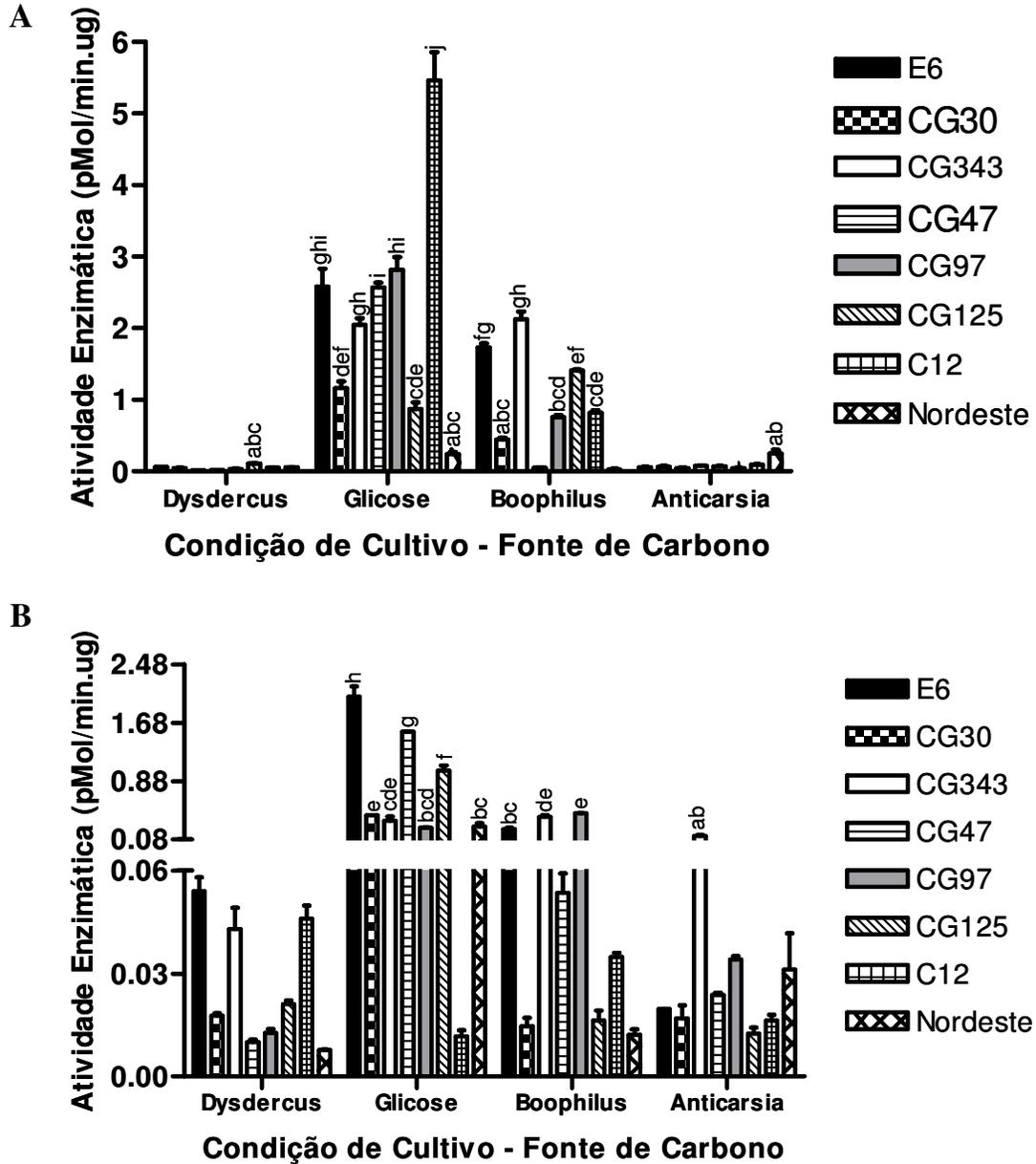


Figura 13: Atividade de quitinases após 48h de cultivo de *M. anisopliae*. As linhagens do fungo foram incubadas a 28 °C por 48h em meios contendo diferentes fontes de carbono e o sobrenadante, coletado e utilizado nos ensaios enzimáticos. O painel A mostra a atividade de exoquitinases gerada pela incubação com 4-UM-(GlcNAc)₂ e o painel B endoquitinases com 4-UM-(GlcNAc)₃. As diferentes letras representam amostras com diferenças estatísticas significantes (p<0,05).

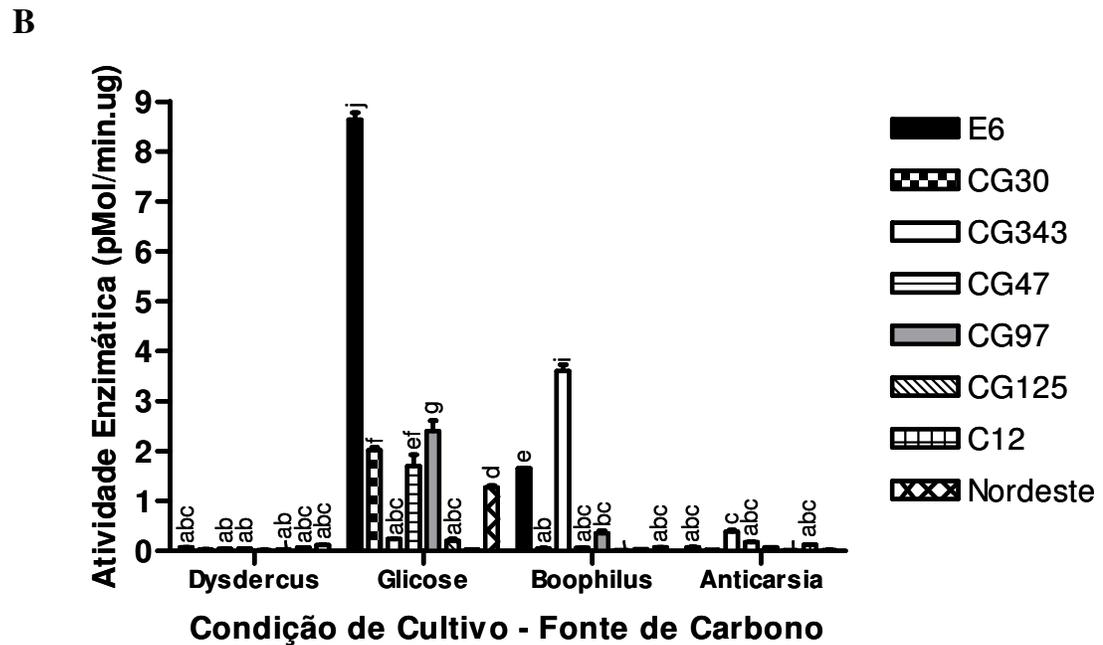
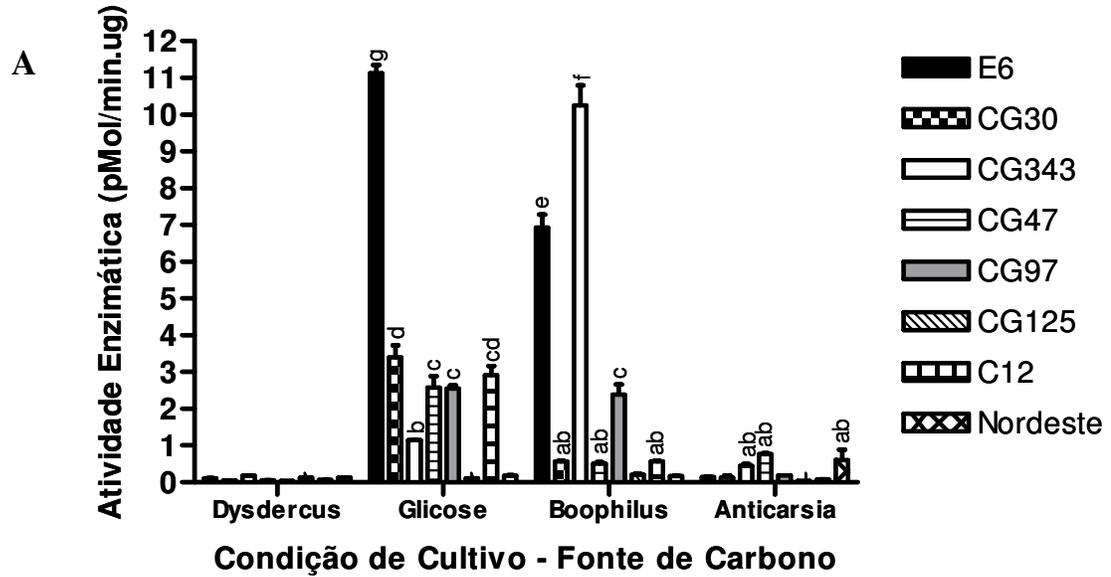
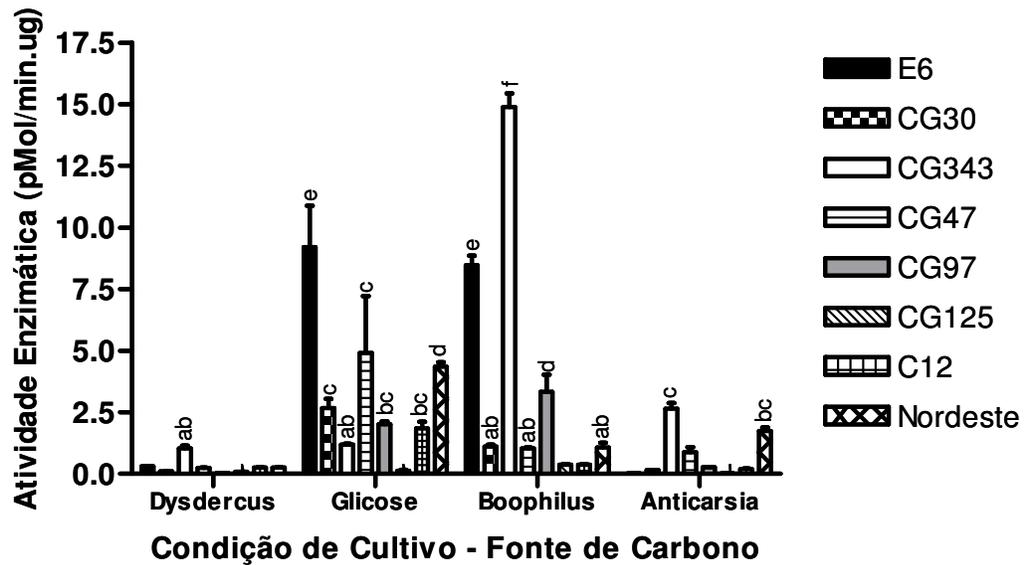


Figura 14: Atividade de quitinases após 72h de cultivo de *M. anisopliae*. As linhagens do fungo foram incubadas a 28 °C por 72h em meio contendo diferentes fontes de carbono e o sobrenadante, coletado e utilizado nos ensaios enzimáticos. O painel A mostra a atividade de exoquitinases gerada pela incubação com 4-UM-(GlcNAc)₂ e o painel B de endoquitinases com 4-UM-(GlcNAc)₃. As diferentes letras representam amostras com diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).

A



B

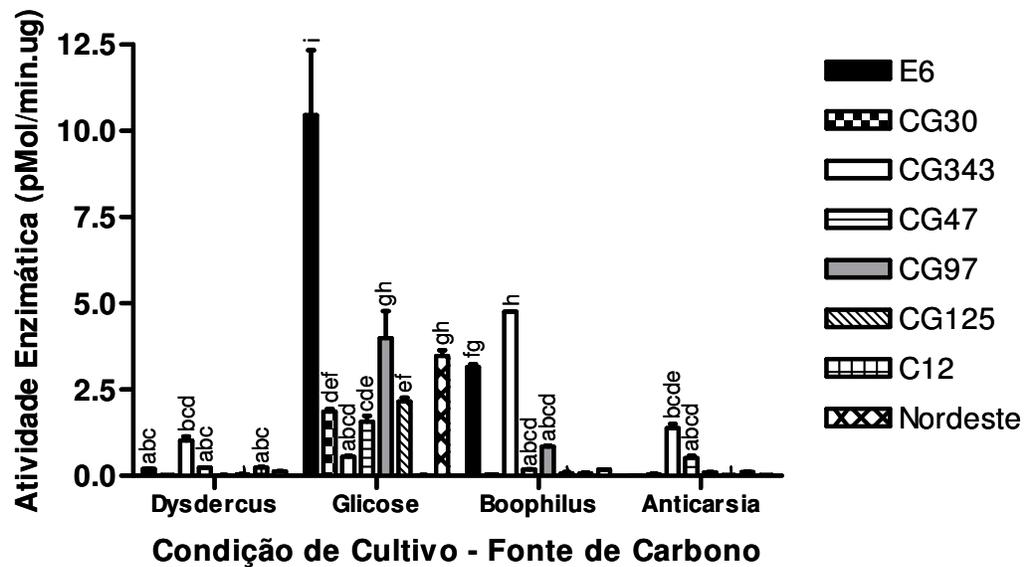


Figura 15: Atividade de quitinases após 96h de cultivo de *M. anisopliae*. As linhagens do fungo foram incubadas a 28 °C por 96h em meio contendo diferentes fontes de carbono e o sobrenadante, coletado e utilizado nos ensaios enzimáticos. O painel A mostra a atividade de exoquitinases gerada pela incubação com 4-UM-(GlcNAc)₂ e o painel B de endoquitinases com 4-UM-(GlcNAc)₃. As diferentes letras representam amostras com diferenças estatísticas significantes (p<0,05).

4.1.2 Proteases

A atividade de serino-proteases do subtipo subtilisina foi avaliada com o emprego do substrato cromogênico *N*-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-Nitroanilida. Portanto, ao longo do trabalho, a atividade proteolítica refere-se somente a esta classe enzimática.

A avaliação geral do padrão de atividade das diferentes condições mostrou que a detecção desta classe enzimática foi maior com o passar do tempo, sendo praticamente nula para a maioria das linhagens, após 24h de cultivo, e o emprego de glicose pareceu reprimir a atividade de proteases em todos os tempos analisados (Figuras de 16 a 19). A linhagem E6, após 24h de cultivo, apresentou atividade superior às demais com a utilização de fontes de carbono provenientes de cutícula de artrópodes. Já a linhagem CG30 foi a única, além da E6, a produzir subtilisinas em meio que continha cutícula de *D. peruvianus* como fonte única de carbono (Figura 16).

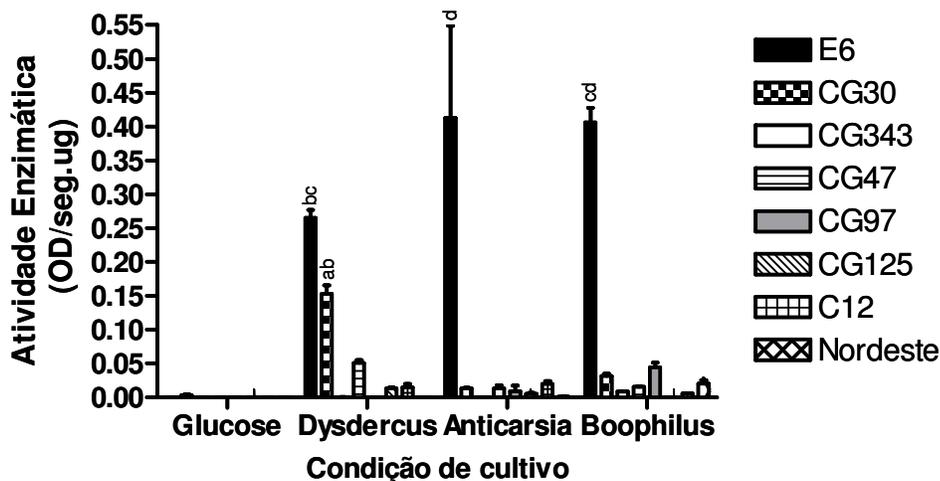


Figura 16: Atividade de proteases após 24h de cultivo de *M. anisopliae*. As linhagens do fungo foram incubadas a 28 °C por 24h em meios contendo diferentes fontes de carbono e o sobrenadante, coletado e utilizado nos ensaios enzimáticos. As diferentes letras representam amostras com diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).

A Figura 17 mostra a atividade de proteases em 48h. Nessa condição, com o emprego de cutícula de *D. peruvianus*, as linhagens E6, CG47 e CG343 apresentaram as maiores atividades, e E6 e CG343 tiveram a maior produção de subtilisinas induzida por cutícula de *A. gemmatalis*.

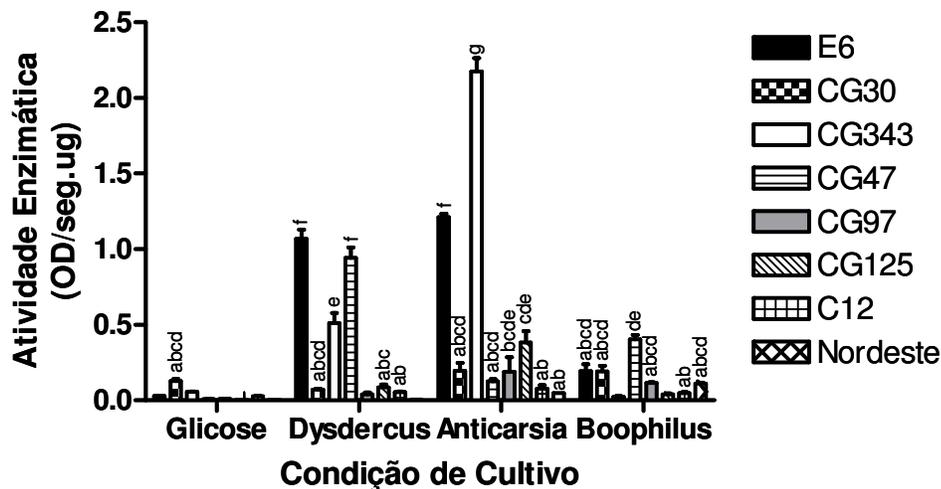


Figura 17: Atividade de proteases após 48h de cultivo de *M. anisopliae*. As linhagens do fungo foram incubadas a 28 °C por 48h em meios contendo diferentes fontes de carbono e o sobrenadante, coletado e utilizado nos ensaios enzimáticos. As diferentes letras representam amostras com diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).

Após 72h de cultivo, a atividade proteolítica foi mais expressiva nas culturas com *D. peruvianus* e *A. gemmatalis* (Figura 18). Na primeira condição, destacaram-se as linhagens E6, CG47 e Nordeste. Já na segunda, CG343 teve a atividade de 1 (E6) a 50 (Nordeste) vezes superior às demais. A linhagem E6 mostrou marcante atividade proteolítica em todas as fontes de carbono, com exceção de glicose, sendo a carapaça de *R. (B.) microplus* a condição que propiciou a maior secreção.

As linhagens E6 e CG343 foram capazes de manter alta atividade em carapaça de *D. peruvianus* e *A. gemmatalis* após 96h de cultivo e, na condição carapaça de *R. (B.) microplus*, além da E6 e da CG97, a Nordeste também pareceu ter a secreção de subtilisina aumentada em relação a menores tempos de incubação (Figura 19).

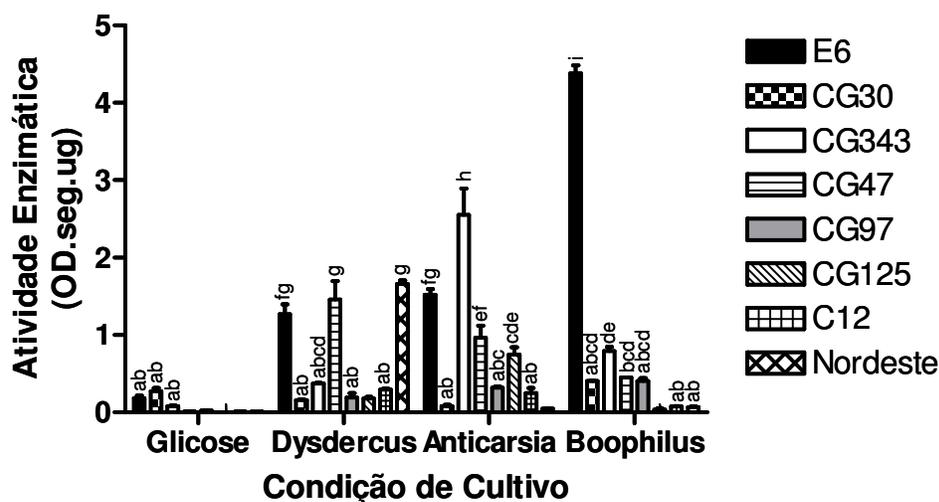


Figura 18: Atividade de proteases após 72h de cultivo de *M. anisopliae*. As linhagens do fungo foram incubadas a 28 °C por 72h em meios contendo diferentes fontes de carbono e o sobrenadante, coletado e utilizado nos ensaios enzimáticos. As diferentes letras representam amostras com diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).

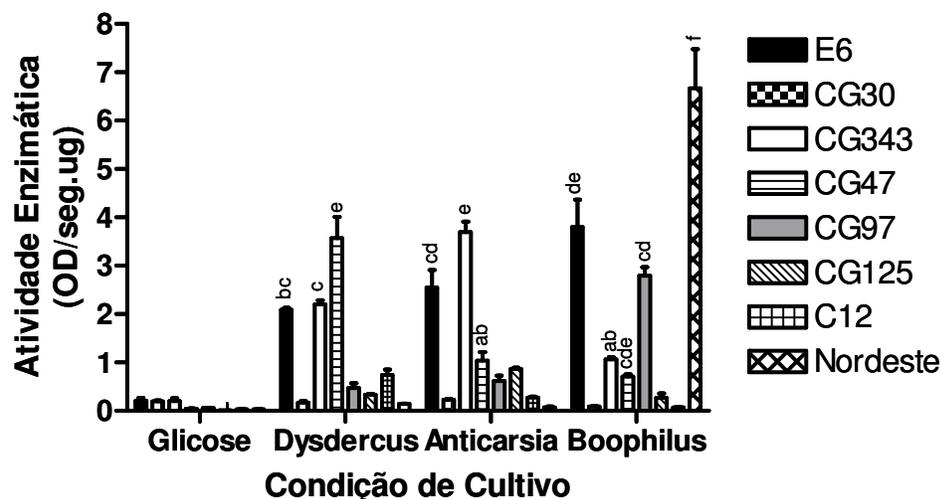


Figura 19: Atividade de proteases após 96h de cultivo de *M. anisopliae*. As linhagens do fungo foram incubadas a 28 °C por 96h em meios contendo diferentes fontes de carbono e o sobrenadante, coletado e utilizado nos ensaios enzimáticos. As diferentes letras representam amostras com diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).

4.2 AVALIAÇÃO DE PATOGENICIDADE

A capacidade entomopatogênica de diferentes linhagens de *M. anisopliae* foi avaliada por bioensaios com os artrópodes *D. peruvianus* e *A. gemmatalis*. Inicialmente, todos os ensaios foram desenvolvidos com a exposição dos insetos a suspensões de conídeos das diferentes linhagens de *M. anisopliae*, na concentração de 1×10^8 esporos/mL. As linhagens fúngicas com maior atividade inseticida foram então selecionadas para a determinação do tempo letal mediano (TL50), bem como para a determinação do número total de hemócitos/imunócitos e para a avaliação qualitativa dos tipos celulares presentes.

4.2.1 Avaliação da patogenicidade utilizando como modelo o percevejo *D. peruvianus*

A ação inseticida de *M. anisopliae* sobre o percevejo manchador do algodão foi realizada pela aplicação de esporos das diferentes linhagens em fêmeas e machos, separadamente, deste inseto.

Todas as linhagens testadas foram capazes de infectar e matar *D. peruvianus*, porém, o tempo necessário para a obtenção da mortalidade, bem como a ação sobre machos e fêmeas foi bastante variável.

Os machos foram significativamente menos sensíveis à infecção por *M. anisopliae* do que as fêmeas (Tabelas 4 e 5). A maioria das linhagens ocasionou o óbito de 50% das fêmeas após 3 - 4 dias da exposição aos conídeos, e a mortalidade de 100% foi atingida após 8 - 9 dias (Tabela 5). Para os machos, o tempo médio necessário para a morte de 50% e 100% dos percevejos foi de 8 e 12 dias, respectivamente. A linhagem CG97 apresentou a menor virulência para fêmeas de *D. peruvianus*, necessitando de 10,4 dias para matar 100% dos insetos. Já para os machos, a linhagem Nordeste apresentou a menor virulência, apresentando TL50 e TL100 de 13,7 e 22,5 dias, respectivamente.

A utilização de fêmeas para a avaliação da atividade de *M. anisopliae* como biopesticida permitiu a separação das linhagens em grupos distintos, de acordo com o tempo médio para a obtenção de 50% de mortalidade (Tabela 4). Foi verificado que as linhagens E6 e CG47 foram as mais virulentas contra fêmeas de *D. peruvianus*, e a linhagem CG125, contra machos. A Figura 20 apresenta a mortalidade de machos e fêmeas de *D. peruvianus*, após exposição a conídeos das diferentes linhagens ao longo do tempo.

O número de fêmeas mortas em cada dia não permitiu a identificação de variações significativas entre os isolados. Entretanto, a mortalidade dos machos foi diferenciada. Embora a maioria das linhagens seja capaz de matar 100% dos insetos desafiados com 12 - 13 dias, a análise da mortalidade cumulativa conforme o tempo mostrou que as diferentes linhagens possuem graus distintos de virulência conforme o sexo do inseto.

Ainda a respeito dos experimentos com fêmeas, a ovopostura foi avaliada pela coleta e pesagem dos ovos até o último dia dos bioensaios. Uma análise parcial da ação das diferentes linhagens sobre a capacidade de realização da ovopostura mostrou que a mesma é influenciada pela linhagem fúngica utilizada, sendo as mais virulentas, de forma geral, também as com maior influência sobre a postura dos ovos (Figura 21).

As alterações *ante mortem* observadas foram similares em machos e fêmeas. Os insetos ficavam menos ágeis e pareciam ter a coordenação motora afetada, notando-se a presença de tremores e de incapacidade para a locomoção. Após a morte, os artrópodes apresentavam-se mumificados, sendo esta característica mais marcante no caso dos machos. A Figura 22 mostra os insetos mortos e mumificados nos bioensaios, após incubação em câmara de germinação.

Tabela 4: Tempo letal para a morte de 50% de *D. peruvianus*, após a exposição a diferentes linhagens de *M. anisopliae*.

Linhagens	Fêmeas		Machos	
	TL50 (dias)	Limites de confiança 95% (superior - inferior)	TL50 (dias)	Limites de confiança 95% (superior - inferior)
E6	3,30	3,12 – 3,48 ^a	8,34	8,06 – 8,62 ^f
CG30	4,01	3,72 – 4,30 ^c	8,48	8,20 – 8,76 ^f
CG343	3,66	3,38 – 3,93 ^{abc}	8,30	8,07 – 8,52 ^f
CG47	3,60	3,48 – 3,87 ^a	8,71	8,42 – 8,95 ^f
CG97	3,38	4,90 – 5,60 ^d	8,66	8,41 – 8,90 ^f
CG125	3,70	3,49 – 4,09 ^b	7,63	7,31 – 7,93 ^e
C12	5,67	5,15 – 6,17 ^d	8,27	8,02 – 8,52 ^f
Nordeste	4,50	4,33 – 4,77 ^c	13,70	13,32 – 14,07 ^g

Letras semelhantes^(a-g) são representativas dos limites de confiança para cada linhagem de *M. anisopliae* e indicam diferenças não significativas.

Tabela 5: Tempo letal para a morte de 100% de *D. peruvianus*, após a exposição a diferentes linhagens de *M. anisopliae*.

Linhagens	Fêmeas		Machos	
	TL100 (dias)	Limites de confiança 95% (superior - inferior)	TL100 (dias)	Limites de confiança 95% (superior - inferior)
E6	5,31	4,95 – 5,81 ^a	13,34	12,75 – 14,06 ^e
CG30	7,56	6,97 – 8,38 ^b	13,39	12,77 – 14,16 ^e
CG343	8,10	7,50 – 8,87 ^b	11,61	11,14 – 12,21 ^{cd}
CG47	5,99	5,62 – 6,50 ^a	12,25	11,77 – 12,87 ^e
CG97	10,40	9,64 – 11,40 ^c	12,54	12,05 – 13,17 ^{de}
CG125	9,00	8,33 – 9,86 ^{bc}	12,02	11,40 – 12,83 ^e
C12	9,73	8,81 – 11,21 ^{bc}	12,38	11,86 – 13,04 ^{de}
Nordeste	7,61	7,17 – 8,20 ^b	22,50	21,65 – 23,51 ^f

Letras semelhantes^(a-f) são representativas dos limites de confiança para cada linhagem de *M. anisopliae* e indicam diferenças não significativas.

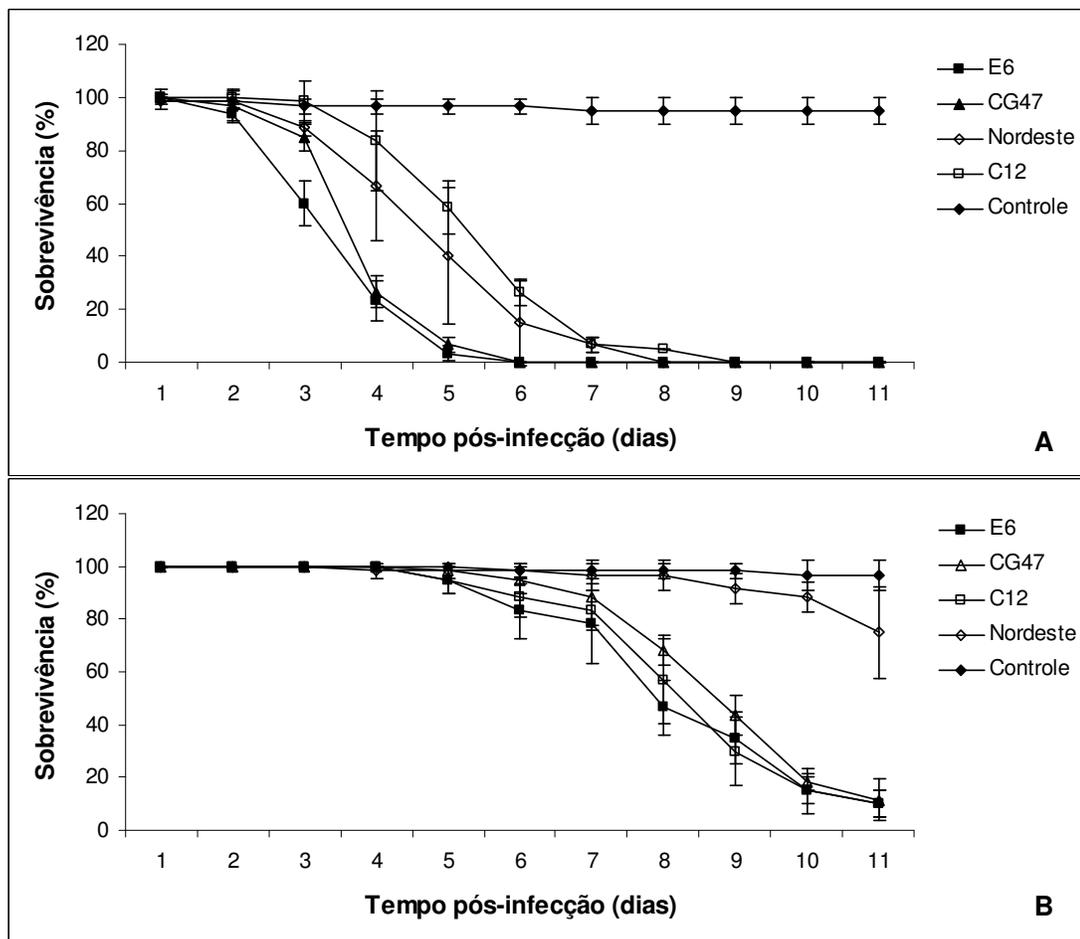


Figura 20: Mortalidade de *D. peruvianus* infectado por diferentes linhagens de *M. anisopliae*. Os gráficos mostram a ação de diferentes linhagens de *M. anisopliae* sobre fêmeas (A) e machos (B) de *D. peruvianus* ao longo do tempo.

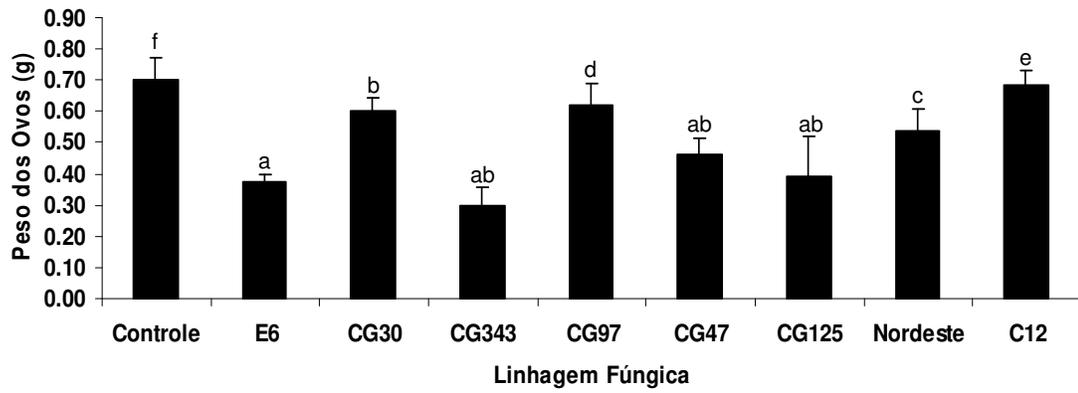


Figura 21: Avaliação da ovopostura de fêmeas de *D. peruvianus* expostas a diferentes linhagens de *M. anisopliae*. As diferentes letras representam amostras com diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).

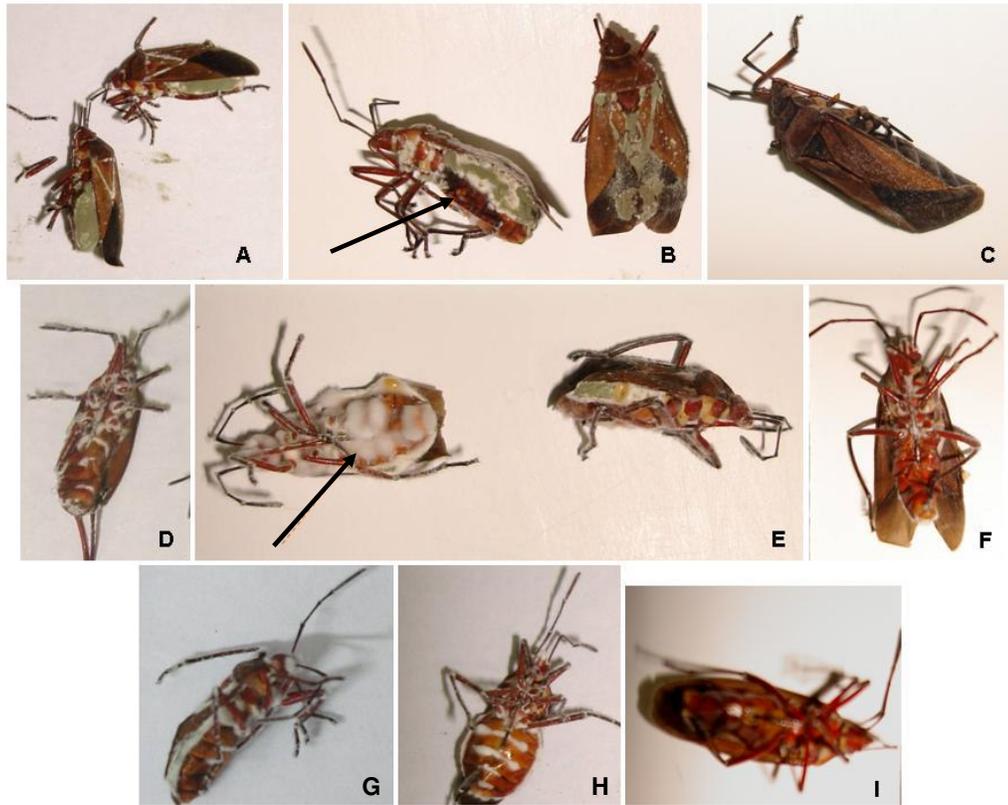


Figura 22: Desenvolvimento de *M. anisopliae* em *D. peruvianus* após a morte dos insetos em bioensaios. Fêmeas desafiadas com linhagens de *M. anisopliae* e mortas durante os bioensaios foram coletadas e mantidas em câmara de germinação a 28 °C por um período de até duas semanas. A seta em B indica conídeos e a seta em E, desenvolvimento micelial. Os painéis A, B, C, D, E, F, G e H mostram desafios com as linhagens E6, CG30, CG343, CG47, CG97, CG125, C12 e Nordeste. O painel I mostra um macho infectado com a linhagem E6.

As linhagens E6, CG47 e Nordeste foram ainda utilizadas para a determinação da dose letal de 50% e 100% de fêmeas de *D. peruvianus*. Os artrópodes foram desafiados com concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 esporos/mL e observados diariamente. Embora a linhagem Nordeste tenha apresentado menor virulência em relação às linhagens E6 e CG47, a determinação da dose letal necessária para a morte de 50 e 100% das fêmeas revelou que somente a linhagem E6 possui dose letal estatisticamente distinta da linhagem Nordeste (Tabela 6).

Tabela 6: Dose letal média para a morte de 50 e 100% de fêmeas de *D. peruvianus*, após a exposição por três dias a diferentes concentrações das linhagens E6, CG47 e Nordeste de *M. anisopliae*.

Linhagens	Dose Letal			
	DL50 (conídeos/mL)	Limites de confiança 95%	DL100 (conídeos/mL)	Limites de confiança 95%
E6	$2,95 \cdot 10^7$	$2,63 \cdot 10^7 - 3,31 \cdot 10^7$ ^a	$1,38 \cdot 10^8$	$1,12 \cdot 10^8 - 1,73 \cdot 10^8$ ^a
CG47	$1,69 \cdot 10^7$	$5,75 \cdot 10^6 - 7,58 \cdot 10^7$ ^{ab}	$1,25 \cdot 10^9$	$1,86 \cdot 10^8 - 1,23 \cdot 10^{12}$ ^b
Nordeste	$7,76 \cdot 10^7$	$6,02 \cdot 10^7 - 1,02 \cdot 10^8$ ^b	$7,41 \cdot 10^8$	$4,07 \cdot 10^8 - 2,18 \cdot 10^9$ ^b

Letras semelhantes^(a-b) são representativas dos limites de confiança para cada linhagem de *M. anisopliae* e indicam diferenças não significativas.

4.2.1.1 Avaliação da resposta celular de *D. peruvianus*

A avaliação das possíveis diferenças na resposta imune frente à infecção com as diferentes linhagens de *M. anisopliae* foi realizada devido à presença de diferenças significativas na capacidade entomopatogênica de *M. anisopliae* entre machos e fêmeas de *D. peruvianus*. Para tal, o número e/ou padrão de fagócitos entre os gêneros foi analisado. As linhagens E6, CG47 e Nordeste foram selecionadas e submetidas ao experimento já descrito no item 3.4.1. Após 4, 24, 48 e 72h de incubação, três artrópodes foram retirados para a coleta de hemolinfa, a qual era imediatamente utilizada para a contagem celular e realização de esfregaço (somente realizado para a linhagem CG47). Conforme o esperado,

a contagem de hemócitos totais foi inferior em fêmeas, como também na presença da linhagem Nordeste, que pareceu ser a menos virulenta nos bioensaios com machos (Figura 23). Porém, a diferença na contagem celular pode não ter papel significativo para a susceptibilidade diferenciada de certos grupos de artrópodes a determinadas linhagens, pois o grupo controle, tanto no caso dos machos quanto no das fêmeas, pareceu sofrer um padrão de variação semelhante ao dos grupos tratados nas contagens celulares.

Não houve alterações significativas no padrão celular de acordo com o gênero e o tempo de exposição ao patógeno (Figuras 24 e 25). De forma geral, foram encontradas células basofílicas (detalhe A1 da Figura 24), células com morfologia compatível a granulócitos (detalhes B1 e B2 da Figura 24) e células pleomórficas, característica esta sugestiva da presença de plasmatócitos (detalhes A1 e B1 da Figura 25). A Figura 25A mostra o esfregaço de um grupo controle e 25 B, de um grupo desafiado com a linhagem CG47 após 72h; embora tenha sido verificada a presença de células com morfologia compatível a plasmatócitos, este padrão foi diferente somente entre os tempos e não entre os tratamentos.

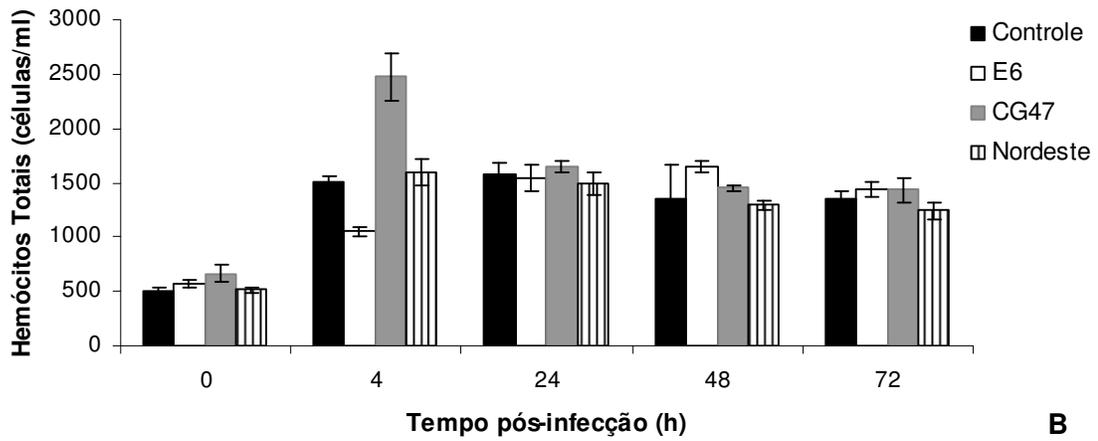
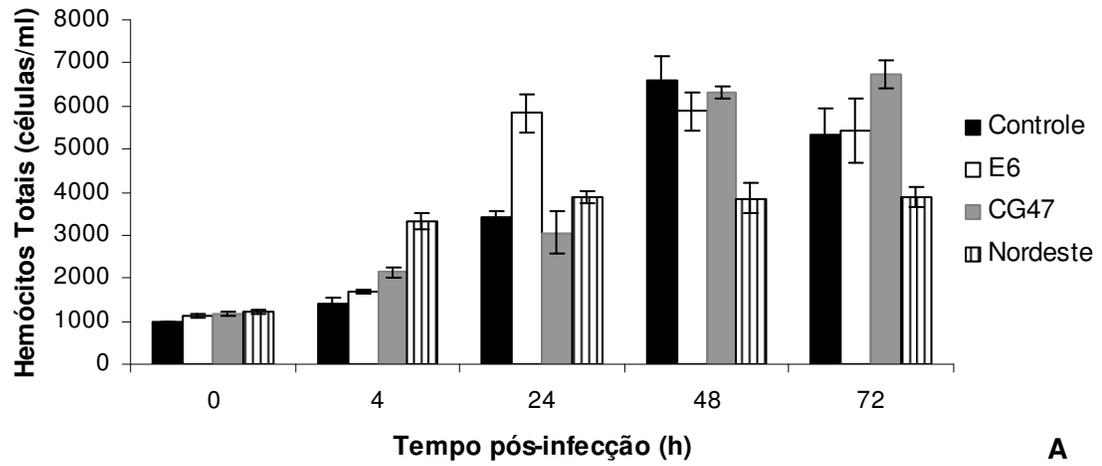


Figura 23: Contagem de hemócitos totais após diferentes tempos de exposição de *D. peruvianus* a linhagens de *M. anisopliae*. A apresenta ensaios com machos e B, ensaios com fêmeas.

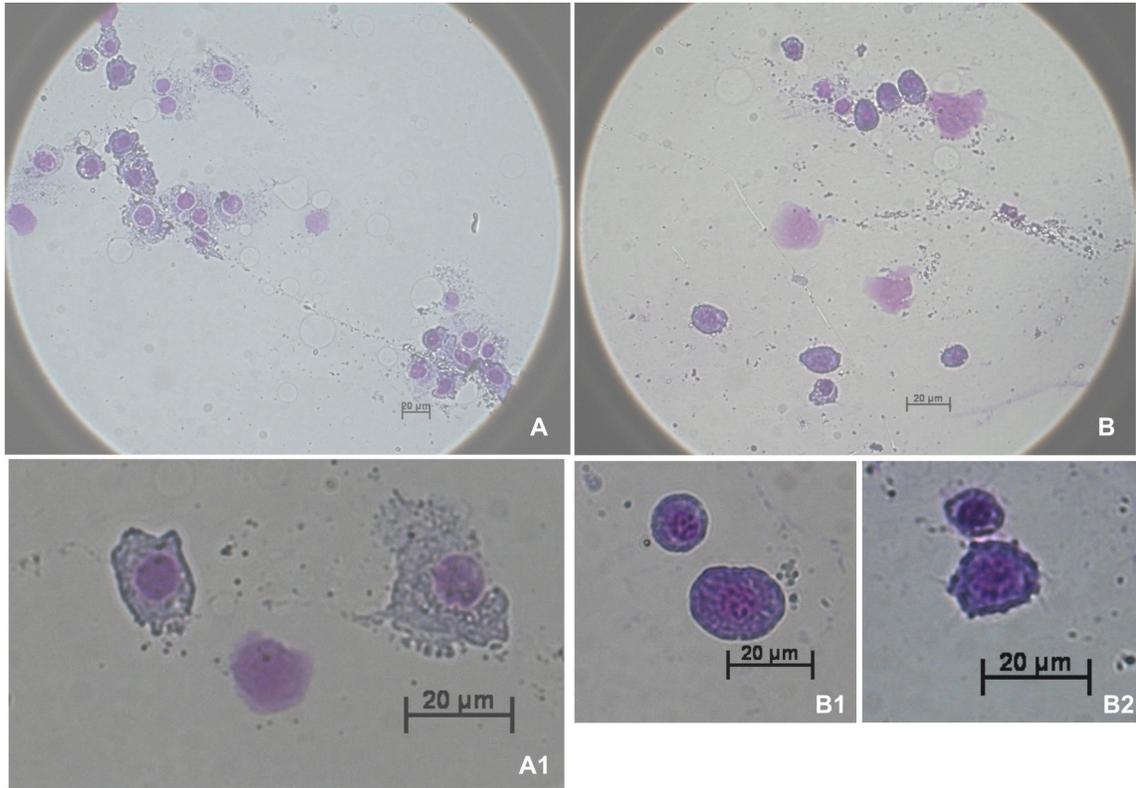


Figura 24: Tipos celulares encontrados em esfregaços de hemolinfa de *D. peruvianus*, após 4h de exposição à linhagem CG47. A, grupo controle após 4h de incubação (aumento 400X); A1, detalhe de A (630X); B, grupo desafiado com a linhagem CG47 após 4h de incubação (400X); B1 e B2, detalhe de B (630X).

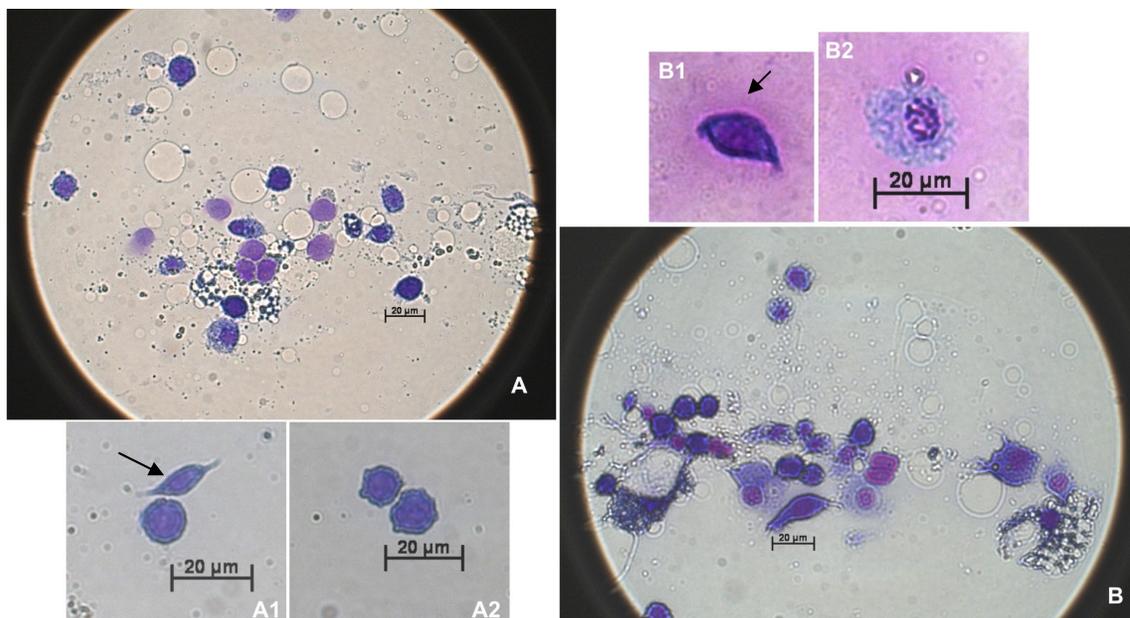


Figura 25: Tipos celulares encontrados em esfregaços de hemolinfa de *D. peruvianus*, após 72h de exposição à linhagem CG47. A, grupo controle após 72h de incubação (400X); A1 e A2, detalhe de A (630X); B, grupo desafiado com a linhagem CG47 após 72h de incubação (400X); B1 e B2, detalhe de B (630X). As setas em A1 e B1 indicam células com morfologia compatível a plasmatócitos.

4.2.1.2 Avaliação do papel da cutícula na resposta de *D. peruvianus* à infecção fúngica

Devido aos resultados inconclusivos sobre o envolvimento da resposta de fagócitos na maior resistência de machos à infecção, foram desenvolvidos bioensaios com a aplicação parenteral de esporos fúngicos. Esta mudança na via de infecção buscou avaliar um possível envolvimento da cutícula na resposta ao agente infeccioso.

A cutícula parece exercer um papel importante nas defesas físicas de machos de *D. peruvianus* contra agentes infecciosos. A linhagem Nordeste que, em experimentos desenvolvidos com a aplicação tópica de esporos de *M. anisopliae*, obteve os maiores

tempos para atingir 50 e 100% de mortalidade, com a injeção intra-abdominal de esporos, apresentou mortalidade superior à linhagem E6 (Figura 26 e Tabela 7).

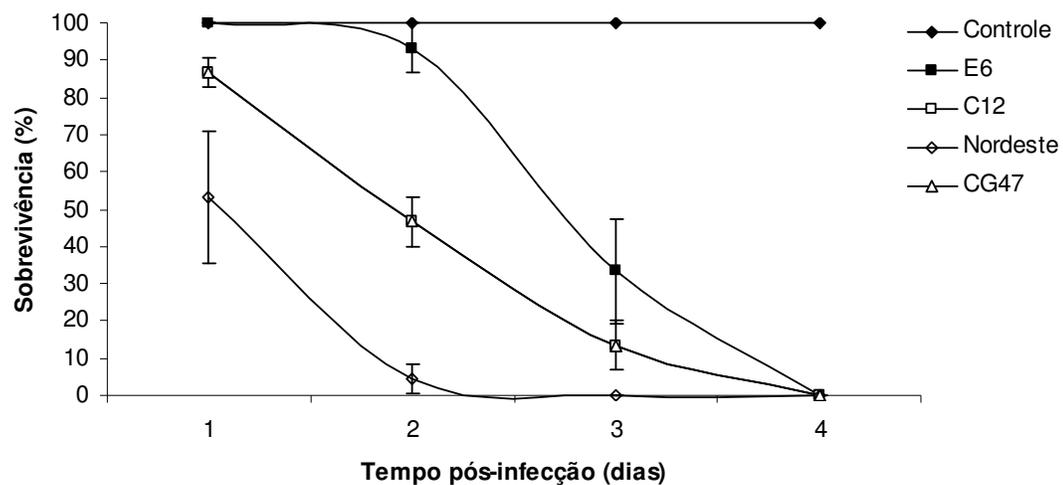


Figura 26: Efeito de *M. anisopliae* em machos de *D. peruvianus*. O gráfico mostra a taxa de sobrevivência de machos de *D. peruvianus*, após a administração via intra-abdominal de suspensão de esporos de isolados de *M. anisopliae*.

Tabela 7: Tempo letal médio para a morte de 50 e 100% de machos de *D. peruvianus* após a inoculação parenteral de esporos de *M. anisopliae*.

Linhagens	Dose Letal			
	TL50 (dias)	Limites de confiança 95%	TL100 (dias)	Limites de confiança 95%
E6	2,54	2,38 – 2,7 ^c	3,53	3,27 – 3,96 ^b
CG47	1,37	1,23 – 1,51 ^a	2,23	1,99 – 2,62 ^a
C12	2,03	1,78 – 2,27 ^b	4,41	3,88 – 5,3 ^b
Nordeste	1,26	1,11 – 1,41 ^a	2,26	1,99 – 2,77 ^a

Letras semelhantes^(a-c) são representativas dos limites de confiança para cada linhagem de *M. anisopliae* e indicam diferenças não significativas.

4.2.2 Avaliação da patogenicidade utilizando como modelo a lagarta *A. gemmatalis*

A capacidade de *M. anisopliae* de infectar e matar a lagarta *A. gemmatalis* foi avaliada pela exposição desta a suspensões de conídeos na concentração de 10⁸ esporos/mL.

A virulência das diferentes linhagens sobre *A. gemmatalis* foi bastante diferenciada. Para algumas linhagens como CG30, CG47 e CG343, este artrópode pareceu não ser um potencial hospedeiro, no entanto outras, como a linhagem C12, foram capazes de infectar e matar estes insetos em apenas 1 dia (Tabela 8).

Tabela 8: Tempo letal médio para a morte de 50% de *A. gemmatalis*, após a exposição a diferentes linhagens de *M. anisopliae*.

Linhagens	TL50 (dias)	Limites de confiança 95% (superior - inferior)
E6	9,72	8,34 – 12,82 ^d
CG97	6,62	6,11 – 7,30 ^c
CG125	5,24	4,11 – 6,72 ^c
C12*	- 0,684	- ^a
Nordeste	2,91	0,08 – 4,22 ^b

*A linhagem C12 apresentou TL100 com 24h de incubação. Letras semelhantes^(a-d) são representativas dos limites de confiança para cada linhagem de *M. anisopliae* e indicam diferenças não significativas.

A linhagem C12 foi significativamente a mais eficiente, pois com 24h após a incubação atingiu 100% de mortalidade, sendo a única a agir sobre a totalidade dos insetos infectados. A linhagem Nordeste também foi eficiente, eliminando 50% dos insetos-alvo após cerca de 3 dias de incubação. Entretanto, não foi possível obter mortalidade de 100 % antes da ecdise dos insetos expostos a conídeos da linhagem Nordeste, sendo obtidos 67% de mortalidade dos insetos. Assim como a linhagem Nordeste, as linhagens CG97, CG125 e E6 foram menos virulentas em relação à linhagem C12, visto que a taxa de mortalidade dos insetos, obtida com a infecção por conídeos destas linhagens, foi de 50, 60 e 15%, respectivamente. A figura 27 mostra a sobrevivência relativa das lagartas expostas às linhagens de *M. anisopliae*.

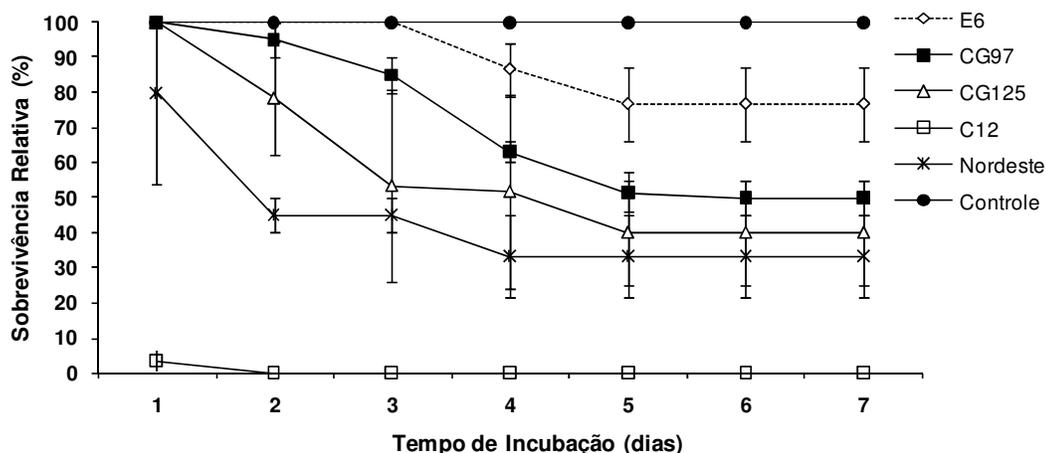


Figura 27: Efeito de *M. anisopliae* sobre *A. gemmatalis*. Os gráficos mostram a ação de diferentes isolados de *M. anisopliae* sobre larvas de terceiro estágio.

Com o intuito de determinar se a causa *mortis* foi a infecção por *M. anisopliae*, as lagartas mortas foram coletadas, lavadas com água destilada e solução de hipoclorito de sódio para garantir a eliminação de microrganismos externos e, em seguida, semeadas em meio mínimo e incubadas em câmara de germinação a 28 °C, para observação do crescimento do fungo (Figura 28). Após cerca de duas semanas de incubação, o micélio presente sobre os insetos esporulou, mostrando padrão morfológico compatível ao crescimento de *M. anisopliae*.

Em seguida, a dose letal foi estimada para as linhagens C12, CG97, CG125 e Nordeste. Aos três dias pós-infecção, a linhagem Nordeste apresentou a menor dose letal necessária para a morte de 50% das lagartas, porém, para a obtenção de 100% de mortalidade, a linhagem CG125 teve um ligeiro destaque. A determinação da dose letal da linhagem C12 foi realizada 24h após o desafio microbiológico, já que neste período foi alcançada 100% de mortalidade. Portanto, de acordo com o mostrado nos bioensaios para determinação do tempo letal médio para a morte dos insetos e com o cálculo da dose letal, que só foi possível no primeiro dia devido à rápida ação desta linhagem sobre o hospedeiro testado, C12 mostrou destacada capacidade para infectar, colonizar e matar a lagarta da soja *A. gemmatalis*.

Tabela 9: Dose letal média para a morte de 50 e 100% de *A. gemmatalis*, após três dias de exposição a diferentes concentrações das linhagens CG97, CG125, C12 e Nordeste de *M. anisopliae*.

Linhagens	Dose Letal			
	DL50 (conídeos/mL)	Limites de confiança 95%	DL100 (conídeos/mL)	Limites de confiança 95%
CG97	$3,23. 10^7$	$1,31. 10^7$ ^a	$1,94. 10^{10}$	$7,76. 10^8 - 8,51. 10^{17}$ _{ab}
CG125	$1,122. 10^8$	$4,78. 10^7 - 1,23. 10^8$ ^b	$7,07. 10^9$	$8,12. 10^8 - 1,62. 10^{14}$ ^a
C12*	$2,041. 10^8$	$8,51. 10^7 - 1,44. 10^9$	$1,62. 10^7$	$9,54. 10^6 - 2,81. 10^7$
Nordeste	$3,23. 10^7$	$9,54. 10^6 - 4,46. 10^8$ ^{ab}	$1,34. 10^{11}$	$3,01. 10^9 - 1,38. 10^{19}$ ^{bc}

*A dose letal da linhagem C12 foi determinada no primeiro dia de infecção, pois neste período foi capaz de causar a morte de 100% das lagartas infectadas.

Letras semelhantes^(a-c) são representativas dos limites de confiança para cada linhagem de *M. anisopliae* e indicam diferenças não significativas.

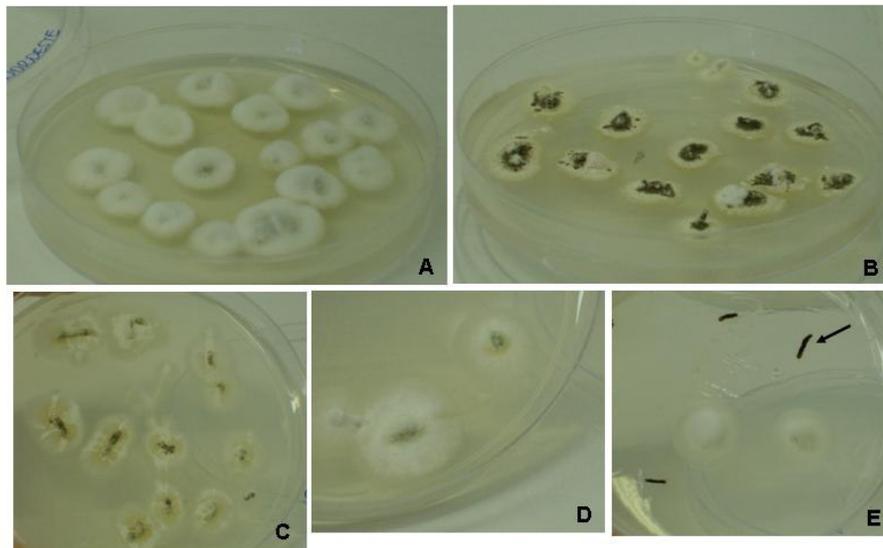


Figura 28: Desenvolvimento de *M. anisopliae* em *A. gemmatalis*. Após a morte dos insetos em bioensaios, os insetos foram coletados, desinfetados, semeados em meio mínimo e mantidos em câmara de germinação a 28 °C, por um período de duas semanas. A seta mostra lagartas recém-semeadas. A, Nordeste; B, C12; C, CG125; D, CG97 e E, linhagem Nordeste com lagartas recém-semeadas.

4.2.2.1 Avaliação da resposta celular de *A. gemmatalis*

As alterações significativas entre a eficiência de infecção entre as linhagens fúngicas, especialmente de C12, levaram a um interesse em investigar a resposta celular contra as diferentes linhagens. Para tanto, foram procedidos os experimentos já descritos no item 3.4.2, sendo coletados três insetos para a contagem de hemócitos/imunócitos totais, nos tempos de 0, 4, 24, 48 e 72h após a exposição ao patógeno (Figura 29). Nestes experimentos, ao contrário do esperado, o total de células presentes na hemolinfa dos insetos desafiados com as diferentes linhagens não permitiu verificar uma possível ação imunossupressora da linhagem C12, pois embora o número de imunócitos nos insetos

desafiados com a mesma tenha sido baixo, este foi semelhante ao da linhagem CG125, que foi menos eficiente nos bioensaios. Além disso, o número de células no controle não se manteve constante, sendo baixo com 4 e 24h após a infecção e voltando a valores equivalentes ao tempo zero somente às 72h.

O desafio com um agente patogênico não pareceu desempenhar um fator estimulante para a resposta imunológica celular em *A. gemmatalis*, pois, após a infecção, principalmente nos tempos 48 e 72h, ocorreu, na maioria das vezes, uma diminuição do número de células circulantes na hemolinfa em relação ao grupo controle. Este fato poderia explicar a susceptibilidade destes artrópodes à infecção por determinadas linhagens de *M. anisopliae*, já que, conforme o descrito na literatura, os tipos celulares predominantes na hemolinfa são compostos por células fagocitárias, as quais desempenham papel fundamental no combate de agentes agressores (LAVINE & STRAND, 2002). Contudo, não ficaram evidentes alterações que pudessem explicar a maior capacidade patogênica de determinadas linhagens.

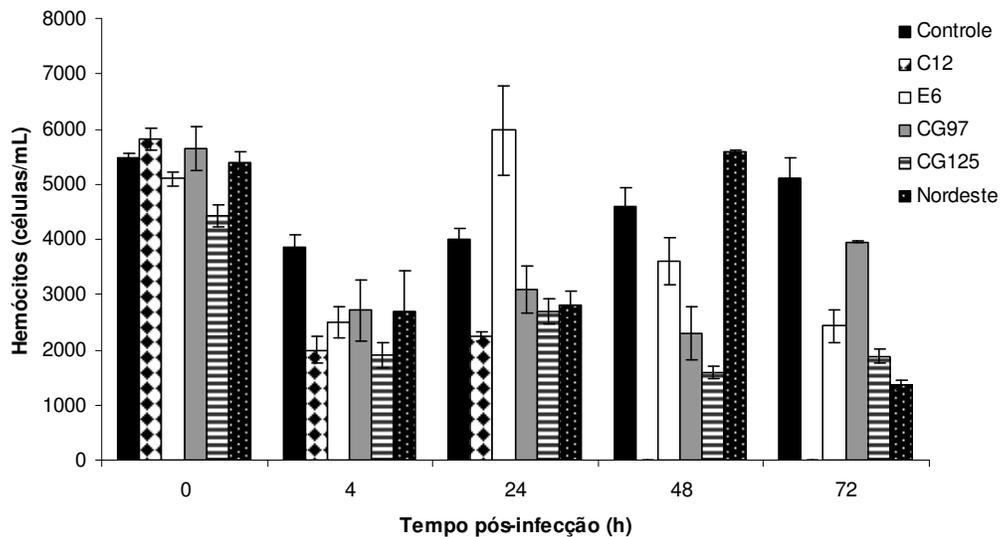


Figura 29: Contagem de hemócitos totais após diferentes tempos de incubação de *A. gemmatalis* com diferentes linhagens de *M. anisopliae*.

A hemolinfa coletada para a contagem de células totais também foi utilizada para confecção de esfregaço e estudo do padrão celular existente em *A. gemmatalis* (Figuras 30 e 31). Foi possível a identificação de, pelo menos, cinco tipos celulares: células basofílicas (b), células com morfologia compatível a granulócitos (g), adipócitos ou adipohemócitos (a), eonocitóides (e) e também células pleomórficas, de tamanho variável, com núcleo grande e citoplasma denso, características estas compatíveis com a de plasmatócitos (p). Eonocitóides são células grandes, esféricas e com núcleo pequeno e excêntrico, já os adipohemócitos podem ser identificados pela grande quantidade de glóbulos lipídicos.

A presença de um grande número de células semelhantes, porém com tamanho variável, pode ser explicada pelo fato de a maturação celular em artrópodes ser na hemolinfa.

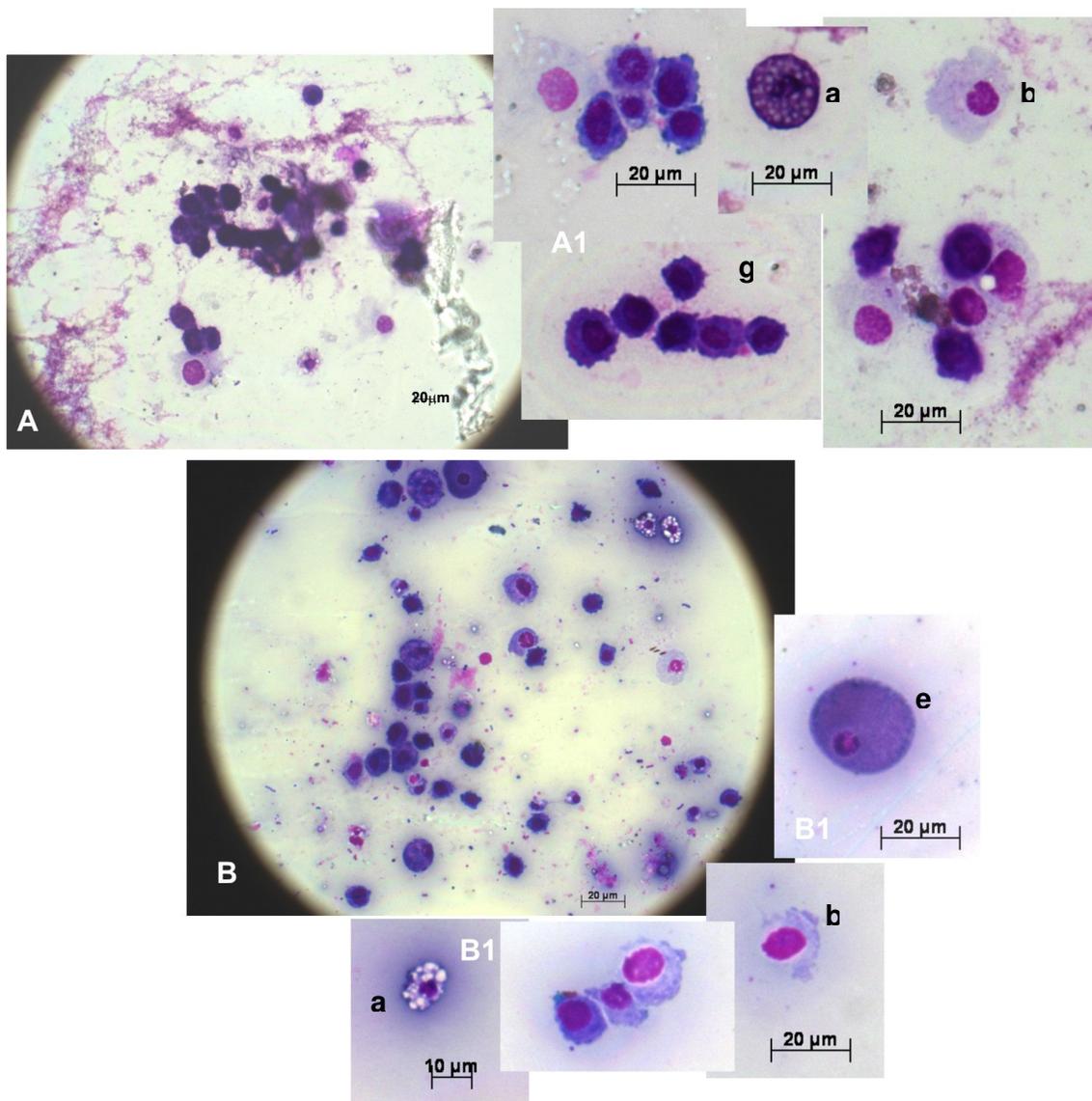


Figura 30: Tipos celulares encontrados em esfregaços de hemolinfa de *A. gemmatalis* após 4h de incubação. A indica grupo controle (200X); A1, detalhes de A (630X); B, grupo desafiado com a linhagem C12 após 4h de incubação (200X); B1, detalhes de B (630X). As letras indicam: a, adipócito/adipohemócito; b, célula basofílica; e, eonocitóide e g, granulócito.

Os esfregaços sanguíneos não permitiram a identificação de diferenças nos tipos celulares encontrados entre os grupos tratado e controle, sendo a única diferença a identificação de eonositóides nos insetos infectados. A inexistência de alterações nos tipos celulares pode ser explicada pelo fato de que as modificações celulares decorrentes de processos infecciosos ocorrem predominantemente na quantidade de grupos de células específicas, como plasmatócitos, por exemplo, e não devido a alterações qualitativas.

A literatura reporta a formação de agregados celulares como uma forma de combate a agentes infecciosos. No entanto, em nossos experimentos com realização de esfregaços, não pareceu ocorrer uma maior formação de agregados celulares nos grupos desafiados com esporos fúngicos, em comparação com o grupo controle. Contudo, a formação de estruturas compatíveis a nódulos foram observadas durante a contagem de células em hemocítômetro (Figura 32).

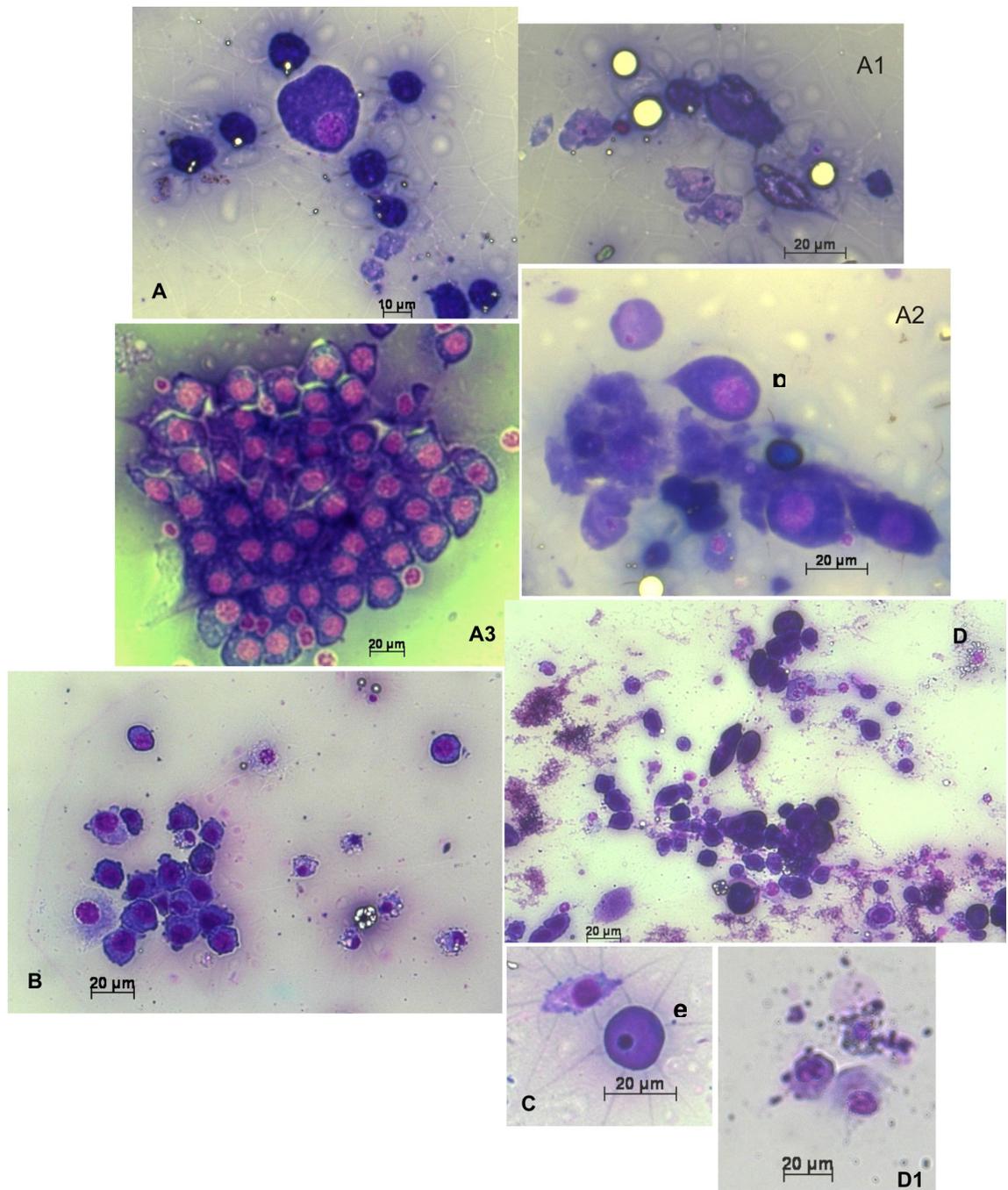


Figura 31: Tipos celulares encontrados em esfregaços de hemolinfa de *A. gemmatalis* após 24h de incubação. A indica grupo controle (630X); A1, A2 e A3, detalhes de A (630X); B, grupo desafiado com a linhagem CG97 após 24h de incubação (200X); C, grupo desafiado com a linhagem Nordeste após 24h de incubação (200X); D, grupo desafiado com a linhagem E6 após 24h de incubação (630X); D, grupo desafiado com a linhagem E6 após 24h de incubação (630X); D1, grupo desafiado com a linhagem E6 após 24h de incubação (200X); e, grupo desafiado com a linhagem Nordeste após 24h de incubação (200X).

incubação (200X) e D1, detalhe de D (630X). As letras indicam: e, eonocitóide e p, plasmatócito.

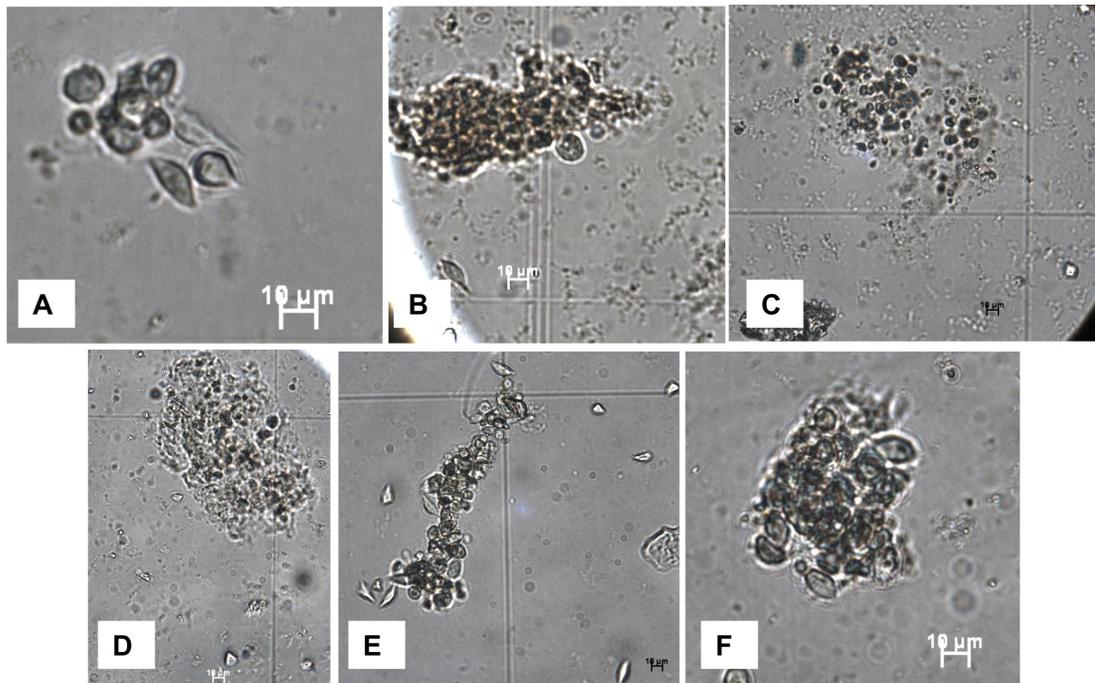


Figura 32: Fotomicrografia de hemolinfa de *A. gemmatilis* mostrando a formação de agregados celulares após desafio com diferentes linhagens de *M. anisopliae*. A, C12 (4h); B, C12 (24); C, E6 (24 h); D, CG97 (48h); E, E6 (48h) e F, CG97 (72h).

5 DISCUSSÃO

A seleção de linhagens naturalmente mais virulentas transpõe a necessidade de superação das barreiras normativas existentes atualmente para a utilização e distribuição ambiental de microrganismos geneticamente modificados. No entanto, a eleição de linhagens possivelmente mais eficientes para o controle biológico requer o conhecimento e elucidação dos fatores que norteiam o processo infeccioso. Seguindo o exposto, um dos pontos mais estudados como principal etapa para o sucesso do processo infeccioso é a fase inicial de interação e penetração do fungo no hospedeiro. Sabe-se, por exemplo, que a penetração é dependente de processos físicos e químicos, sendo a secreção de enzimas hidrolíticas fundamental para a transposição da cutícula (HEGEDUS & KHACHATOURIANS, 1995; CLARKSON & CHARNLEY, 1996). Enzimas chaves secretadas na interface com o hospedeiro foram identificadas, principalmente, por cultivo dos agentes infecciosos em meios capazes de mimetizar a superfície dos artrópodes susceptíveis (ST. LEGER *et al.*, 1986a; ST. LEGER *et al.*, 1986a). Desta forma, em *M. anisopliae*, enzimas como proteases, quitinases e lipases foram e, ainda em alguns sistemas, têm sido estudadas, quanto à regulação da sua expressão (ST. LEGER *et al.*, 1986a; MACH *et al.*, 1999; MORAES *et al.*; SILVA *et al.*, 2005; DONATTI *et al.*, 2008).

Existe a necessidade não só da identificação de moléculas envolvidas na patogenicidade e virulência, mas como também do estudo dos mecanismos regulatórios das mesmas para uma melhor manipulação dos fatores que determinam a eficiência dos entomopatógenos utilizados no controle biológico. É estabelecido, por exemplo, que as quitinases têm a sua secreção induzida por baixas concentrações de *N*-acetilglicosamina (0,25%), cutículas de artrópodes (0,5 – 1%), estresse e baixos níveis de nitrogênio. Entretanto, sua expressão é reprimida pela presença de glicose (1%), altas concentrações de *N*-acetilglicosamina (1%) e aminoácidos como a alanina (VITERBO *et al.*, 2002; MORAES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005). O presente trabalho investigou a atividade de endo e exoquitinases em presença de durante o desenvolvimento de *M. anisopliae* em fontes de carbono já relatadas repressoras dessas enzimas, como a glicose, e indutoras, como cutículas de artrópodes. A despeito da capacidade individual de cada linhagem em secretar este complexo enzimático, a análise global dos resultados permitiu a identificação da cutícula de *R. (B.) microplus* como a mais eficiente para a indução da secreção de

quitinases e, ao contrário do previamente descrito, a utilização do monossacarídeo glicose na concentração de 1% não pareceu reprimir, na maioria dos casos e nas condições testadas, a secreção enzimática.

Várias isoformas de quitinases já foram identificadas em *M. anisopliae* e alguns dos genes codificantes destas proteínas já estão clonados e o mecanismo de regulação individualmente estudado. Até o momento, todas as quitinases descritas em *M. anisopliae* parecem ser reprimidas por glicose. SILVA *et al.* (2005) purificaram a quitinase CHIT30 a partir de meio de cultivo contendo quitina como fonte de carbono. A produção de anticorpos específicos propiciou estudos sobre o seu mecanismo regulatório, sendo a sua expressão detectada por ensaios de *immunoblotting* em meios de cultivo contendo quitina, cutícula de carrapato e baixas concentrações de *N*-acetilglicosamina (0,25%). BARATTO *et al.* (2006), isolaram, caracterizaram e estudaram os níveis dos transcritos do gene *chi2* de *M. anisopliae* e verificaram que a transcrição do gene só foi detectada em condições de cultivo utilizando como fontes de carbono quitina, cutícula de *R. (B.) microplus* e baixas concentrações de *N*-acetilglicosamina (0,1%), revelando um padrão semelhante à regulação do gene codificante da quitinase CHIT30.

Embora a utilização de fontes de carbono tenha permitido o estudo regulatório das quitinases, este parece ser um mecanismo mais complexo. Em 1999, com auxílio de um sistema de fusão com gene repórter, foi verificado que os genes *nag1* (*N*-acetilgliconaminidase CHIT73) e *ech42* (endoquitinase CHIT42) do micopatógeno *Trichoderma atroviride* estão sujeitos a tipos diferenciados de sinais regulatórios. O gene *nag1* é induzido por oligômeros de quitina de baixo peso molecular e por seus próprios produtos de degradação, enquanto que *ech42* não sofre ação direta da quitina, mas sim de sinais de depleção de nutrientes e condições de estresse (MATCH *et al.*, 1999). O estudo da influência conjunta de amônia, glicose e quitina sobre a regulação de enzimas envolvidas na degradação de parede celular por *T. atroviride* foi conduzido em 2001 por DONZELLI & HARMAN e demonstrou que a expressão de CHIT42 também sofre influência da interação entre os nutrientes onde baixas concentrações de amônia (5 - 10 mM) e glicose (0,1%) induzem a expressão de transcritos e a alta os reprime (50 - 100 mM de amônia e 3% de glicose). Apesar da alteração nas concentrações individuais das fontes de carbono e nitrogênio refletir no padrão de expressão, mesmo na presença de 3% de glicose, baixas concentrações de nitrogênio e adição de quitina foram capazes de induzir a expressão de

ech42. A endoquitinase CHIT36 de *T. asperellum* também parece sofrer regulação de outros fatores além de fontes de carbono. O gene *chit36* é altamente expresso em condições extremas de temperatura, estresse osmótico e baixas concentrações de nitrogênio, independentemente de haver alta concentração de glicose no meio de cultivo do fungo para a última condição (VITERBO *et al.*, 2002). Fica claro que a regulação da expressão e atividade de quitinases são mecanismos complexos e abrangem a interação de vários fatores podendo a presença de glicose não ser a única variável determinante para a sua expressão.

Ao contrário das enzimas com capacidade de degradar quitina, as proteases estudadas no presente trabalho foram reprimidas por glicose e induzidas por cutículas de artrópodes. A repressão de genes requeridos para a expressão de proteínas capazes de utilizar fontes de carbono mais complexas é bastante conhecida em microrganismos na presença de nutrientes mais facilmente degradáveis. Inúmeros trabalhos descrevem a existência de proteínas que se ligam ao DNA e, dessa forma, reprimem a expressão de genes necessários para a degradação de fontes de carbono menos complexas como glicose (DAWZER & KELLY, 1991; STRAUSS *et al.*, 1999). SCREEN *et al.* (1997) não só encontraram na região promotora de *prl* sítios de ligação a proteínas repressoras como também identificaram o gene *crr1* (*carbon response regulator 1*), que codifica uma proteína putativa com alta homologia à proteína repressora CREA de *Aspergillus nidulans*. Assim, na presença de fontes rapidamente metabolizáveis de carbono, tal como a glicose, ocorre a expressão de proteínas que se ligam a sítios específicos do DNA reprimindo a expressão dos genes presentes nestes segmentos.

Além do papel repressor da glicose, a indução da expressão de proteases em meios de cultivo que contêm cutículas de artrópodes-alvo é bastante documentada e, apesar da importância das quitinases para a infecção em hospedeiros, somente foi comprovado o papel de Pr1 como fator de virulência em *M. anisopliae* (ST. LEGER *et al.*, 1996). Estudos de regulação de Pr1 em *M. flavoviride* evidenciaram, neste fungo, um aumento na sua atividade em meio contendo cutícula de *Rhammatocerus schistocercoides*. Assim como no presente estudo, também foram verificadas diferenças entre os isolados de *M. flavoviride* na produção de proteases indicando que diferenças na expressão destas proteínas podem influenciar na capacidade do microrganismo de causar doença (PINTO *et al.*, 2002). Pesquisas referentes à expressão global de genes responsáveis pela adaptação de *M.*

anisopliae a diferentes hospedeiros verificaram que entre os transcritos envolvidos na degradação de cutículas, as subtilisinas Pr1 têm a sua expressão aumentada quando o fungo é exposto a carapaças de artrópodes e ainda, que existem variações individuais nas isoformas induzidas de acordo com o tipo de nutriente empregado (FREIMOSER *et al.*, 2005). DUTRA *et al.* (2004) estudaram as diferenças entre populações de mRNA produzidas pelo fungo cultivado em meio contendo glicose ou cutícula de carrapato como fonte de energia. Entre as seqüências deduzidas de aminoácidos de genes diferencialmente expressos no cultivo do fungo em meio contendo cutícula, foi identificado o da protease *pr1C* de *M. anisopliae*, salientando mais uma vez, não só a importância das proteases para o processo infeccioso, mas também a existência de uma regulação mais refinada dependendo do artrópode envolvido.

Outro fator importante recentemente documentado por QAZI & KHACHATOURIANS (2008) é a regulação de proteases e quitinases dos conídeos. Foi demonstrado que, para *Beauveria bassiana*, os estudos de regulação da expressão de genes que codificam para enzimas hidrolíticas de moléculas extracelulares durante a fase de desenvolvimento do micélio não podem ser extrapolados para a fase inicial de interação com o hospedeiro. Estudos comparativos da secreção de proteases e quitinases por conídeos e por micélio, em meios contendo exúvia de inseto e fontes de carbono/nitrogênio em diferentes combinações, mostraram que a detecção de Pr1 se inicia após 0,25h de incubação, e que a adição de fontes de carbono e nitrogênio ao meio contendo exúvia intensifica a sua secreção. Após um período de incubação de 24h, a adição de nitrogênio passa a reprimir a secreção enzimática. No entanto, o efeito sobre a secreção de *N*-acetilglicosaminidase é distinto, sendo esta secretada em níveis basais com 0,25 e 24h de cultivo e apresentando aumento de sua atividade durante o desenvolvimento do micélio (24h) em meio com adição de fonte de carbono.

No que diz respeito às quitinases e proteases, o padrão de secreção das enzimas aqui estudadas parece não ser fundamental para a virulência das diferentes linhagens de *M. anisopliae* já que, as mais patogênicas para *D. peruvianus* e *A. gemmatalis* não foram, necessariamente as que produziram maiores atividades em meio de cultivo. Em relação à atividade quitinolítica, a análise do padrão individual de cada linhagem nos cultivos com cutícula de *D. peruvianus* ao longo do tempo mostra que a atividade frente aos distintos substratos foi crescente e, que após 96h de cultivo, a linhagem CG343 produziu a maior

atividade de exoquitinases, enquanto as linhagens E6, CG47 e C12 produziram a maior atividade de endoquitinase. Nos cultivos com cutícula de lagarta, as atividades também foram superiores no tempo 96h tendo destaque a linhagem CG343 tanto para a atividade de exo quanto para de endoquitinases. Este resultado corrobora o fato da existência de múltiplos outros fatores que possam exercer função durante a penetração de entomopatógenos em seus hospedeiros, pois a linhagem CG343 não foi a mais virulenta contra *D. peruvianus* ou para *A. gemmatalis*. A linhagem C12 foi destacadamente a mais patogênica para a lagarta da soja *A. gemmatalis*, porém, esta não obteve atividade quitinolítica ou proteolítica superior às demais.

É freqüente a correlação entre virulência e atividade enzimática de fungos entomopatogênicos produzido em meio de cultivo. A subtilisina Pr1 vem sendo utilizada como marcador de virulência fúngica. Em *Paecilomyces fumosoroseus*, por exemplo, foi investigada a correlação entre a atividade de três linhagens contra a mosca branca (Homoptera: Aleyrodidae) de pastagens e o isolado mais virulento foi também o maior secretor de Pr1, indicando, neste sistema, uma ligação direta entre a atividade enzimática e a capacidade biocontroladora do entomopatógeno (CASTELLANOS-MOGUEL *et al.*, 2007). Em nosso trabalho, embora tenha havido diferenças na atividade de Pr1 entre as linhagens, esta parece não estar diretamente ligada à virulência de *M. anisopliae* nos hospedeiros testados ou ser o seu único determinante, pois em cultivos suplementados com carapaça de *D. peruvianus*, embora as linhagens E6 e CG47 tenham apresentado uma elevada atividade proteolítica e uma marcada ação contra o percevejo, a linhagem Nordeste, muito menos virulenta, também apresentou atividade proteásica comparável às outras duas. Quanto aos meios suplementados com cutícula de *A. gemmatalis*, ao contrário do esperado, foram detectadas as maiores atividades nos cultivos incubados com as linhagens E6 e CG343 e, menor atividade nos incubados com a linhagem C12.

A correlação entre atividade enzimática e virulência pode ser mais bem avaliada pela análise individual de determinados genes através de análises funcionais. Mutantes nulos para a quitinase bifuncional CHIT30, por exemplo, foram menos eficientes em bioensaios com *D. peruvianus* (STAATS, 2007). A endoquitinase codificada pelo gene *chit1* de *M. acridum* parece não estar relacionada à virulência contra *M. sexta*, visto que linhagens contendo cassetes para expressão constitutiva deste gene não foram mais virulentas ao inseto modelo, apesar de ter aumentada produção de quitinases (SCREEN *et*

al., 2001). FRANCESCHINI (2005) construiu mutantes capazes de expressar constitutivamente a protease Pr1A e a ação dos mesmos foi diferente dependendo do tipo de hospedeiro utilizado em bioensaios. Ao contrário do esperado, a virulência não foi aumentada para o carrapato *R. (B.) microplus*, no entanto, no desafio contra a lagarta da soja *A. gemmatalis* as linhagens transformadas foram significativamente mais virulentas em relação à linhagem selvagem.

A habilidade do fungo *M. anisopliae* como biocontrolador é largamente conhecida e a sua capacidade para infectar e matar inúmeros artrópodes tem sido demonstrada contra carrapatos (LEEMON & JONSON, 2008; FRAZZON *et al.*, 2000; ARRUDA *et al.*, 2005), gafanhotos (TOUNOU *et al.*, 2007), mosquitos (SCHOLTE *et al.*, 2006), formigas (LOPEZ & ORDUZ, 2003), entre outros.

Aqui descrevemos pela primeira vez a capacidade de *M. anisopliae* de infectar e matar *D. peruvianus*, uma praga da cultura do algodão, como também a ação de determinadas linhagens sobre a lagarta da soja *A. gemmatalis*.

A existência de variações individuais na virulência de linhagens fúngicas com potencial para o biocontrole é comum. PIRALI-KHEIRABADI *et al.* (2007) testaram a capacidade entomopatogênica de três linhagens de *M. anisopliae* contra o carrapato *R. (B.) annulatus* e verificaram que uma delas foi significativamente mais virulenta que as demais. Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa também mostraram haver diferenças entre as linhagens fúngicas, na virulência sobre o carrapato bovino *R. (B.) microplus* (FRAZZON *et al.*, 2000). Em 2005, ARRUDA (2005) investigou, por microscopia eletrônica de varredura, as interações iniciais entre patógeno e hospedeiro. Foi constatada uma variação na capacidade de formar apressório entre as linhagens e, conseqüentemente, que isso poderia refletir na capacidade entomopatogênica, visto que a linhagem E6, bastante virulenta, era capaz de formar estrutura de penetração, enquanto uma linhagem com menor virulência sobre os carrapatos, a CG30, não produzia tais estruturas.

A linhagem E6 parece ser adaptada para a infecção de artrópodes distintos, pois neste trabalho a sua ação também foi bastante efetiva contra *D. peruvianus*. POLAR *et al.* (2008) comentam que existem linhagens de entomopatógenos adaptadas a uma gama maior de hospedeiros e outras com ação limitada e que a escolha para a formulação de um inseticida/acaricida natural requer a comprovação da inexistência de riscos para espécies não-alvo. Porém, a adoção de mico-inseticidas com ação diversificada poderia representar

grandes vantagens para o controle das múltiplas pragas que podem ser encontradas naturalmente em sistemas de produção pecuária e agrícola.

A notória superioridade da linhagem C12 sobre o lepidóptero *A. gemmatalis* abre portas para a possibilidade da utilização de outros agentes que não os baculovírus para o controle desta praga da agricultura. Ainda fica evidente que neste hospedeiro existem diferenças entre as linhagens não só quanto à virulência, mas também quanto à patogenicidade, visto que algumas não foram capazes de infectar este inseto. Já para *D. peruvianus*, ocorreram diferenças entre as linhagens somente no caso da virulência, já que todas, em diferentes graus, foram capazes de infectar e matar a população desafiada.

A facilidade no manuseio do percevejo manchador do algodão e a sua susceptibilidade ao agente patogênico testado fazem deste um bom modelo para o estudo das interações entre patógeno e hospedeiro. Além disso, a existência de uma adaptação mais refinada aos hospedeiros, principalmente no que diz respeito à secreção de enzimas hidrolíticas, torna interessante o desenvolvimento de estudos comparativos entre o mecanismo de ação do entomopatógeno de classes distintas de artrópodes, tais como insetos e ácaros.

Conforme o anteriormente exposto, estudos do nosso grupo de pesquisa têm buscado elucidar os mecanismos desenvolvidos pelo patógeno para o sucesso do processo infeccioso. Porém, a compreensão do processo de infecção de *M. anisopliae* em seus hospedeiros alvos deve levar em consideração também os aspectos relacionados ao hospedeiro. Desta forma, o desenvolvimento de possíveis biopesticidas requer a elucidação das interações patógeno-hospedeiro bem como, do comportamento individual de ambos no meio ambiente. Os resultados obtidos nos bioensaios nem sempre foram compatíveis, por exemplo, com o padrão de secreção enzimática, fator este sabidamente determinante de virulência. Por isso, pareceu pertinente a tentativa de correlacionar as alterações no comportamento infeccioso das diferentes linhagens não somente às características fúngicas, mas também às diferenças que possam existir em decorrência do gênero, por exemplo. Levando tais questões em consideração, durante o desenvolvimento desta pesquisa, foi feita uma tentativa de investigar a resposta celular dos artrópodes à infecção por *M. anisopliae*. A contagem de imunócitos/fagócitos totais de hemolinfa de insetos foi em fêmeas de *D. peruvianus*, inferior a de machos, porém, estas diferenças observadas provavelmente não são as únicas determinantes da maior resistência de machos ao

processo infeccioso já que a contagem de células em machos desafiados com linhagem Nordeste, por exemplo, não diferiu significativamente das demais.

Inúmeros trabalhos buscam o esclarecimento dos mecanismos dispostos pelo hospedeiro para combater a invasão e perpetuação de um agente infeccioso, porém, são escassas as informações que conectam a virulência fúngica e a resistência do hospedeiro. BORGES *et al.* (2007) estudaram a resposta fagocítica do triatomíneo *Rhodnius prolixus* contra esferas de látex e bactérias. Cinco imunócitos foram identificados nesta espécie: pró-hemócitos, plasmatócitos, oenocitóides, adipócitos/adipohemócitos e granulócitos sendo os plasmatócitos o tipo celular mais prevalente não só no grupo controle, mas como também, durante a mimetização dos diferentes tipos de agressão ao sistema imunológico. Em *Schistocerca gregaria*, a infecção com *M. anisopliae* leva a um aumento do número total de fagócitos dois dias após a inoculação com predomínio de coagulócitos e, depois deste período, ocorre a diminuição das contagens de fagócitos totais. Também foi verificado que as células fagocitárias não se ligam e não fagocitam partículas fúngicas, e que em quatro dias, pode ser visualizada extensa replicação do patógeno. Em nosso trabalho não foi realizada contagem diferencial de células de defesa e sim do número total de fagócitos e estes, tiveram suas contagens aumentadas a partir do primeiro dia de infecção até a última análise, no terceiro dia, tanto em fêmeas quanto em machos de *D. peruvianus*. Os esfregaços de hemolinfa permitiram verificar a existência do mesmo padrão celular entre o grupo controle e o tratado independentemente do gênero, parecendo ocorrer um maior número de células com o citoplasma difuso e pouco corado no grupo controle (células basofílicas) e células com o citoplasma mais compacto (granulócitos), principalmente após 4 h de infecção. Cabe ressaltar que embora tenha sido realizada a pesquisa em toda a extensão da lâmina nos esfregaços, a contagem diferencial de tipos celulares não foi realizada.

Os esfregaços de hemolinfa de *A. gemmatalis* demonstraram haver, neste gênero, uma maior diversidade celular que em *Dysdercus*, sendo visualizadas células com morfologia compatível a adipócitos/adipohemócitos e células grandes e granulares com núcleo pequeno (oenocitóides). Os tipos celulares parecem não sofrer alterações no seu padrão em decorrência da infecção, à exceção do aparecimento de prováveis eonocitóides, transcorridas 4h após a inoculação fúngica. Em 2003, SILVEIRA *et al.* estudaram os tipos celulares presentes em larvas de *A. gemmatalis* e constataram a existência de pró-

hemócitos, plasmatócios, granulócitos, oenocitóides e esferulócitos estando às contagens celulares totais entre 12,3 e 20,9 mil células/ μ l. No nosso trabalho, o número de células encontrado foi inferior ao anteriormente constatado em larvas de *A. gemmatalis*, por SILVEIRA *et al.* (2003). Porém, os tipos celulares comumente encontrados puderam ser identificados, além de serem visualizadas células com inúmeros glóbulos lipídicos e núcleo excêntrico e pequeno, denominadas adipócitos/adipohemócitos. A presença de outros tipos celulares, como os adipohemócitos, já foi descrita em outros lepidópteros, como a traça *Lymantria díspar* (BUTT & SHIELDS, 1996).

A fagocitose e o processo de coagulação que ocorre na tentativa de isolamento de partículas estranhas em diferentes artrópodes são fatos bastante estudados e já estabelecidos sendo os plasmatócios e coagulócitos células fundamentais nestes processos (GIGLIO *et al.*, 2007; LAVINE & STRAND, 2002; GILLESPIE *et al.*, 2000). Embora tenha sido identificada a presença de plasmatócios em esfregaços de hemolinfa de *A. gemmatalis* em nossos trabalhos, não foi realizada a contagem diferencial que permitiria a identificação dos tipos celulares com maior representatividade durante o processo infeccioso. Também não foram encontradas formações de agregados celulares em *D. peruviannus*. É importante salientar que, durante as contagens celulares em ambos os insetos, embora não se buscasse a investigação da formação de coágulos, parecia haver a formação de agregados celulares, principalmente em *A. gemmatalis*, os quais, muitas vezes, dificultavam a determinação do número de células.

Embora os resultados referentes à resposta dos hospedeiros à infecção fúngica aqui mostrados sejam preliminares e pouco elucidativos, ficou clara a importância da investigação dos padrões de resposta do artrópode alvo para o sucesso da adoção de um programa de controle biológico.

Recentemente vários avanços foram realizados em relação aos fatores envolvidos e, possivelmente, determinantes de patogenicidade e virulência fúngica contra hospedeiros. A infecção e a germinação dos conídios parecem ser reguladas, por exemplo, por genes que atuam na adesão dos conídios a superfície dos hospedeiros. Desse modo, inúmeros fatores além da secreção de quitinases e proteases são essenciais para o sucesso dos fungos em infectar e matar hospedeiros susceptíveis e, embora as proteases, especialmente a PR1, possam ser empregadas na identificação de linhagens mais virulentas, em alguns casos, o estudo de outros fatores pode ser necessário. Não obstante, a escolha e rastreamento de

isolados mais eficientes para o biocontrole deve envolver a adaptação dos mesmos ao meio ambiente já que a manutenção e replicação fúngicas em determinado ecossistema são fundamentais para a viabilização de microrganismos vivos para o controle de pragas.

Além disso, a elucidação de todos os fatores decorrentes das alterações ocorridas durante a interação entre patógeno e hospedeiro deixa clara a necessidade do incremento nos estudos referentes à resposta dos artrópodes durante o processo infeccioso.

6 CONCLUSÕES

- Existem linhagens fúngicas naturalmente mais virulentas e a seleção das mesmas pode determinar a eficiência de um biocontrolador;
- A secreção das quitinases testadas não é reprimida pela utilização de fontes de carbono facilmente metabolizáveis, nas condições deste estudo;
- A secreção de proteases do tipo subtilisina é reprimida pela utilização de fontes de carbono facilmente metabolizáveis nas condições deste estudo;
- Parece não haver correlação entre a produção e secreção de proteases e quitinases e a atividade entomopatogênica de *M. anisopliae*, pois as linhagens mais virulentas nos bioensaios não foram, necessariamente, as que mais produziram as enzimas;
- *M. anisopliae* é efetivo contra o percevejo manchador do algodão *D. peruvianus* e a lagarta da soja *A. gemmatalis* em graus variados, dependendo do hospedeiro testado e da linhagem fúngica utilizada;
- Fêmeas de *D. peruvianus* são mais susceptíveis à infecção fúngica do que os machos quando o patógeno é aplicado topicamente; porém, caso ocorra a aplicação intra-abdominal de partículas fúngicas a morte dos machos ocorre de forma semelhante a das fêmeas;
- As linhagens E6, CG47 e CG343 foram as mais virulentas contra fêmeas de *D. peruvianus* e C12 a menos virulenta;
- *A. gemmatalis* é mais resistente à infecção de *M. anisopliae* do que *D. peruvianus* sendo marcadamente virulenta contra as lagartas somente a linhagem C12;
- Não foi possível verificar diferenças na resposta celular entre machos e fêmeas de *D. peruvianus*, como também, não houve alterações no padrão ou contagem de hemócitos total em ambos os hospedeiros testados entre as linhagens com maior e menor virulência.

7 PERSPECTIVAS

- Apontar e estudar outros fatores que possam influenciar na virulência das linhagens estudadas nos hospedeiros aqui testados;
- Avaliar a atividade entomopatogênica das linhagens em outros estágios do desenvolvimento dos hospedeiros testados;
- Realizar a contagem diferencial de hemócitos para melhor avaliar possíveis diferenças na resposta contra as diferentes linhagens testadas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES SB. Controle Microbiano de Insetos. Editora da Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiróz, Piracicaba, 1998.

ANGEL-SAHAGÚN CA, LEZAMA-GUTIÉRREZ R, MOLINA-OCHOA J, GALINDO-VELASCO E, LÓPEZ-EDWARDS M, REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ O, CRUZ-VÁZQUEZ C, REYES-VELÁZQUEZ WP, SKODA SR, FOSTER JE. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). *Journal of Insect Science* 5(50): 1-8, 2005.

ARONSON AI, SHAI Y. why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, 195(1): 1-8, 2001.

ARRUDA V. Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus*. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ARRUDA W, LUBECK I, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 37: 231-244, 2005.

AVANCI MRF, FOERSTER LA, CAÑETE CL. Natural parasitism in eggs of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) by *Trichogramma* spp. (Hymenoptera, Trichogrammatidae) in Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 49(1): 148-151, 2005.

BAGGA S, HU G, SCREEN SE, ST. LEGER RJ. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 324: 159-169, 2004.

BARATTO CM, DUTRA V, BOLDO JT, LEIRIA LB, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. Isolation, Characterization, and Transcriptional Analysis of the Chitinase chi2 Gene (DQ011663) from the Biocontrol Fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Current Microbiology*, 53: 217-221, 2006.

BARATTO CM, SILVA MV, SANTI L, PASSAGLIA L, SCHRANK IS, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 49: 723-728, 2003.

BARRETO CC, STAATS CC, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of *N*-Acetylglucosamine in protein secretion. *Current Microbiology*, 48: 102-107, 2004.

- BIDOCHKA MJ, ST. LEGER RJ, ROBERTS DW. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 171: 213-224, 1997.
- BLANDIN SA, LEVASHINA EA. Phagocytosis in mosquito immune responses. *Immunological Reviews* 219: 8-16, 2007.
- BOGUS MI, KEDRAA E, BANIAB J, SZCZEPANIKC M, CZYGIERA M, SKID PJ, PASZTALENIECD A, SAMBORSKIA J, MAZGAJSKAA J, POLANOWSKIE A. Different defense strategies of *Dendrolimus pini*, *Galleria mellonella*, and *Calliphora vicina* against fungal infection. *Journal of Insect Physiology*, 53: 909-922, 2007.
- BORGES AR, SANTOS PN, FURTADO AF, FIGUEIREDO RCBQ. Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Micron*, 39(4): 486-94, 2008.
- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of dye-binding. *Anal of Biochemistry* 31, 426-428, 1976.
- BUTT TM, SHIELDS KS. The Structure and Behavior of *Gypsy Moth* (*Lymantria dispar*) Hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 68(1): 1-14, 1996.
- BUTT TM, JACKSON C, MAGAN N. Fungal biological control agents: progress, problems and potential. In: BUTT TM, JACKSON C, MAGAN N. *Fungi as biocontrol agents*, CABI Publishing, Wallingford, Oxford, USA, 2001.
- CASTELLANOS-MOGUEL J, GONZÁLEZ-BARAJAS M, MIER T, REYES-MONTES MR, ARANDA E, TORIELLO C. Virulence testing and extracellular subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2) activity during propagule production of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). *Revista Iberoamericana de Micología*, 24: 62-68, 2007.
- CASTRILLO, L, ROBERTS, D, VANDENBERG J. Entomopathogenic fungi for microbial control of greenhouse and vegetable pests: the fungal past, present and future: germination, ramification and reproduction. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89: 46-56, 2005.
- CLARKSON JM, CHARNLEY AK. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*, 4 (5): 197-203, 1996.
- CURRAN J, DRIVER F, BALLARD JNO, MILNER RJ. Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycological Research* 98: 547-552, 1994.
- DAHIYA N, TEWARI R, HOONDAL GS. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 773-782, 2006.
- DONATTI AC, FURLANETO-MAIA L, FUNGARO MHP, FURLANETO MC. Production and Regulation of Cuticle-Degrading Proteases from *Beauveria bassiana* in the

Presence of *Rhammatocerus schistocercoides* Cuticle. *Current microbiology*, 56: 256-260, 2008.

DONG C, ZHANG J, HUANG H, CHEN W, HU Y. Pathogenicity of a new China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *Dcjhyium*) to subterranean termite *Odontotermes formosanus*. *Microbiological Research*, in press, 2007.

DONZELLI BGG, HARMAN GE. Interaction of Ammonium, Glucose, and Chitin Regulates the Expression of Cell Wall-Degrading Enzymes in *Trichoderma atroviride* Strain P1. *Applied And Environmental Microbiology*, 67(12): 5643-5647, 2001.

DOWZER CEA, KELLY JM. Analysis of the creA Gene, a Regulator of Carbon Catabolite Repression in *Aspergillus nidulans*. *Molecular And Cellular Biology*, 11(11): 5701-5709, 1991.

DRIVER F, MILNER RJ, TRUEMAN JWH. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104: 134-150, 2000.

DUTRA V, NAKASATO L, BROETTO L, SCHRANK IS, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during infection process of the tick *Boophilus microplus*. *Research in Microbiology*, 155(4): 245-251, 2004.

ELLIOT SL, HORTON CM, BLANFORD S, THOMAS MB. Impacts of fever on locust life-history traits: costs or benefits? *Biology Letters*, 1: 181-184, 2005.

FAN Y, FANG W, GUO S, PEI X, ZHANG Y, XIAO Y, LI D, JIN K, BIDOCHKA MJ, PEI Y. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 295-302, 2007.

FARENHORST M, FARINA D, SCHOLTE EJ, TAKKEN W, HUNT RH, COETZEE M, KNOLS BG. African water storage pots for the delivery of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to the malaria vectors *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles funestus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(6): 910-916, 2008.

FARIA MR, WRAIGHT SP. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43: 237-256, 2007.

FRANCESCHINI M. Envolvimento da protease PR1A na patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* e na infecção do carrapato bovino *Boophilus microplus*. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

FRAZZON AP, VAZ JUNIOR I, MASUDA A, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. In vitro assesment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vetererinary Prasitology*, 94: 117-125, 2000.

FREIMOSER FM, HU G, ST LEGER RJ. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. *Microbiology*, 151: 361-371, 2005.

GIGLIO A, BATTISTELLA S, TALARICO FF, BRANDMAYR TZ, GIULIANINI PG. Circulating hemocytes from larvae and adults of *Carabus (Chaetocarabus) lefebvrei* Dejean 1826 (Coleoptera, Carabidae): Cell types and their role in phagocytosis after in vivo artificial non-self-challenge. *Micron*, 39(5): 552-558, 2008.

GILLESPIE JP, BATEMAN R, CHARNLEY AK. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* 71: 128-137, 1998.

GILLESPIE JP, BAILEY AM, COBB B, VILCINSKAS A. Fungi as elicitors of insect immune responses. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 44(2): 49-68, 2000.

GÓMEZ I, PARDO-LOPEZ L, MUÑOZ-GARAY C, FERNANDES LE, PÉREZ C, SÁNCHEZ J, SOBERÓN M, BRAVOA. Role of receptors interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, 28(1): 169-173, 2007.

GONÇALVES L. Biologia e comportamento de *Dysdercus ruficollis* (linnaeus, 1764) (hemiptera: pyrrhocoridae) em condições de laboratório. *Floresta e Ambiente*, 7(1): 68-79, 2000.

GRONVOLD J, HENRIKSEN SA, LARSEN M, NANSEN P, WOLSTRUP J. Biological control. Aspects of biological control- with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Veterinary Parasitology*, 64(1-2): 47-64, 1996.

HEGEDUS WD, KHACHATOURIANS GG. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnology Advances*, 13 (3): 455-490, 1995.

HOWARTH FG. Environmental impacts of classical biological control. *Annual Review in Entomology*, 36: 485-509, 1996.

HUA QB, RENA SX, WUA JH, CHANGA JM, MUSA PD. Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10. *Toxicon*, 48: 491-498, 2006.

KAAYA GP, MWANGI EN, OUNA EA. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67(1): 15-20, 1996.

- KANG SC, PARK S, LEE DG. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, 73: 276 – 281, 1999.
- KNAAK N, FIÚZA LM. Histopathology of *Anticarsia gemmatalis* hübner (lepidoptera; noctuidae) treated with nucleopolyhedrovirus and *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki*. Brazilian Journal of Microbiology, 36: 196-200, 2005.
- LACEY LA, FRUTOS R, KAYA HK, VAIL P. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? Biological Control, 21: 230-248, 2001.
- LAVINE MD, STRAND MR. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32: 1295-1309, 2002.
- LEEMON DM, JONSSON NN. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. Journal of Invertebrate Pathology, 97: 40-49, 2008.
- LING E, YU XQ. Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta* have distinct functions in phagocytosis of foreign particles and self dead cells. Developmental and Comparative Immunology, 30: 301-309, 2006.
- LIU ZY, LIANG ZQ, WHALLEY AJ, YAO YJ, LIU AY. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. Journal of Invertebrate Pathology, 78, 178-182, 2001.
- LIU H, SKINNER M, BROWNBRIDGE M, PARKER BL. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). Journal of Invertebrate Pathology, 82: 139-147, 2003.
- LORD JC. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. Journal of Invertebrate Pathology, 89: 19-29, 2005.
- LOPEZ E, ORDUZ S. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. Biological Control, 27(2): 194-200, 2003.
- MACH RL, PETERBAUER CK, PAYER K, JAKSITS S, WOO SL, ZEILINGER S, KULLNIG CM, LORITO M, KUBICEK CP. Expression of Two Major Chitinase Genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) Is Triggered by Different Regulatory Signals. Applied And Environmental Microbiology, 65(5): 1858-1863, 1999.
- MARANNINO P, SANTIAGO-ÁLVAREZ C, LILLO E, QUESADA-MORAGA E. A new bioassay method reveals pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against early stages of *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae). Journal of Invertebrate Pathology, 93: 210-213, 2006.

- MCCOY CW, TIGANO-MILANI MS. Use of entomopathogenic fungi in biological control: a world view. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 27: 87-93, 1992.
- MERZENDORFER H, ZIMMICH L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *The Journal of Experimental Biology*, 206: 4393-4412, 2003.
- MEYLING NV, EILENBERG J. Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. *Mycological Research*, 110 (2): 188-195, 2006.
- MEYLING NV, EILENBERG J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43(2): 145-155, 2007.
- MILANO P, CÔNSOLI FL, ZÉRIO NG, PARRA JRP. Ecologia, Comportamento e bionomia - Exigências Térmicas de *Dysdercus peruvianus* Guérin-Méneville (Heteroptera: Pyrrhocoridae), o Percevejo Manchador do Algodoeiro. *Annual Society of Entomology. Brasil* 28(2), 1999.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Projeções do Agronegócio Mundial e Brasil. Acessória de Gestão estratégica, Brasil 2008.
- MORAES CK, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Current Microbiology*, 46: 205-210, 2003.
- MOSCARDI F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review in Entomology*, 44: 257-289, 1999.
- MULLEN LM, GOLDSWORTHY GJ. Immune responses of locusts to challenge with the pathogenic fungus *Metarhizium* or high doses of laminarin. *Journal of Insect Physiology*, 52: 389-398, 2006.
- NICHOLSON GM. Fighting the global pest problem: Preface to the special toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon*, 49: 413-422, 2007.
- OTTAVIANI E. Insect immunorecognition. *Invertebrate Survival Journal* 2: 142-151, 2005.
- PAL S, ST. LEGER SJ, WU LP. Fungal Peptide Destruxin A Plays a Specific Role in Suppressing the Innate Immune Response in *Drosophila melanogaster*. *The Journal Of Biological Chemistry*, 282 (12): 8969-8977, 2007.
- PALMA LP. Análise do padrão de expressão dos genes Chit1 chit2 e chit3 que codificam quitinases no fungo entomopatogenico *Metarhizium anisopliae*. Dissertação de Mestrado.

Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PEDRAS MSC, ZAHARIA LI, WARD DE. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry*, 59: 579-596, 2002.

PEDRINI N, CRESPO R, JUAREZ MP. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology*, 146: 124-137, 2007.

PINTO AS, BARRETO CC, SCHRANK A, ULHOA CJ, VAINSTEIN MH. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 322-327, 1997.

PINTO FGS, FUNGARO MHP, FERREIRA JM, VALADARES-INGLIS MC, FURLANETO MC. Genetic variation in the cuticle-degrading protease activity of the entomopathogen *Metarhizium flavoviride*. *Genetics and Molecular Biology*, 25(2): 231-234, 2002.

PIRALI-KHEIRABADI K, HADDADZADEH H, RAZZAGHI-ABYANEH M, BOKAIE S, ZARE R, GHAZAVI M, SHAMS-GHAHFAROKHI M. Biological control of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* by different strains of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Lecanicillium psalliotae* fungi. *Parasitology Research*, 100: 1297-1302, 2007.

POLAR P, MOORE D, KAIRO MTK, RAMSUBHAG A. Topically applied mycoacaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. *Experimental and Applied Acarology*, 2008.

PRAÇA LB, NETO SPS, MONNERAT RG. *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) *Biologia, Amostragem e Métodos de Controle*. Embrapa: Recursos Genéticos e Biotecnologia, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil, 2006.

QAZI SS, KHACHATOURIANS GG. Addition of exogenous carbon and nitrogen sources to aphid exuviae modulates synthesis of proteases and chitinase by germinating conidia of *Beauveria bassiana*. *Archives in Microbiology*, 189: 589-596, 2008.

ROYET J, DZIARSKI R. Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nature Reviews – Microbiology*, 264 (5), 2007.

SASAKI SD, LIMA CA, LOVATO DV, JULIANO MA, TORQUATO RJS, TANAKA AS. BmSI-7, a novel subtilisin inhibitor from *Boophilus microplus*, with activity toward Pr1 proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Parasitology*, 118 214-220, 2008.

SCHOLTE EJ, KNOLS BGJ, TAKKEN W. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 91: 43-49, 2006.

SCREEN S, BAILEY A, CHARNLEY K, COOPER R, CLARKSON J. Carbon regulation of the cuticle-degrading enzyme PR1 from *Metarhizium anisopliae* may involve a trans-acting DNA-binding protein CRR1, a functional equivalent of the *Aspergillus nidulans* CREA protein. *Current Genetics*, 31: 511-518, 1997.

SCREEN SE, HU G, ST. LEGER RJ. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* Overexpressing Chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acridum* Show Early Induction of Native Chitinase but Are Not Altered in Pathogenicity to *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78: 260-266, 2001.

SELVAGGINI S, MUNRO CA, PASCHOUD S, SANGLARD D, GOW NAR. Independent regulation of chitin synthase and chitinase activity in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 150, 921-928, 2004.

SHAH PA, PELL JK. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5-6): 413-23, 2003.

SHI WB, ZHANG LL, FENG MG. Field trials of four formulations of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for control of cotton spider mites (Acari: Tetranychidae) in the Tarim Basin of China. *Biological Control*, 45(1): 48-55, 2008.

SIDERI M, TSAKAS S, MARKOUTSA E, LAMPROPOULOU M, MARMARAS VJ. Innate immunity in insects: surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes. *Immunology*, 123: 528-537, 2007.

SILVA MV, SANTI L, STAATS CC, COSTA AM, COLODEL EM, DRIEMEIER D, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Research in Microbiology*, 156:382-392, 2005.

SILVEIRA EB, RIBEIRO BM, BÁO SN. Characterization of larval haemocytes from the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 35(2): 129-39, 2003.

SOSA-GÓMEZ DR & MOSCARDI F. Laboratory and Field Studies on the Infection of Stink Bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, and *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 71: 115-120, 1998.

ST. LEGER RJ, COOPER RM, CHARNLEY AK. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Regulation of production of chitinolytic enzymes. *Journal of General Microbiology*, 132: 1509-1517, 1986a.

- ST. LEGER RJ, COOPER RM, CHARNLEY AK. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation *in vitro* by enzymes from entomopathogens. *Journal of Invertebrate Pathology*, 47: 167-177, 1986b.
- ST. LEGER RJ, DURRANDAS PK, COOPER RM, CHARNLEY AK. Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Microbiology*, 150: 413-416, 1988.
- ST. LEGER RJ, BUTT TM, STAPLES RC, ROBERTS DW. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology*, 13: 253-262, 1989.
- ST. LEGER RJ, BIDOCHKA MJ, ROBERTS DW. Isoforms of the Cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 313 (1): 1-7, 1994.
- ST. LEGER RJ, JOSHI L, BIDOCHKA MJ, ROBERTS DW. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93: 6349-6354, 1996c.
- ST. LEGER RJ, JOSHI L, ROBERTS DW. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 709-713, 1998.
- ST. LEGER RJ. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98: 271-276, 2008.
- STAATS. Estudo funcional de genes do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- STANISÇUASKI F, FERREIRA-DASILVA CT, MULINARI F, PIRES-ALVES M, CARLINI CR. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 45: 753-760, 2005.
- STRAUSS J, HORVATH HK, ABDALLAH BM, KINDERMANN J, MACH RL, KUBICEK CP. The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. *Molecular Microbiology*, 32(1): 169-178, 1999.
- SUDAKIN DL. Biopesticides. *Toxicology Reviews* 22(2): 83-90, 2003.
- SZEWCZYK B, HOYOS-CARVAJAL L, PALUSZEK M, SKRZECZ I, SOUZA ML. Baculoviruses - re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances* 24: 143-160, 2006.
- THOMAS MB, READ AF. Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews Microbiology*, 5: 377-383, 2007.

TOUNOU AK, KOOYMAN C, DOURO-KPINDOU OK, POEHLING HM. Interaction between *Paranosema locustae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, two pathogens of the desert locust, *Schistocerca gregaria* under laboratory conditions. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97: 203-210, 2008.

VEGA EF. Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98: 277-279, 2008.

VITERBO A, MONTERO M, RAMOT O, FRIESEM D, MONTE E, LLOBELL A, CHET I. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (T. harzianum T-203). *Current Genetics*, 42: 114-122, 2002.

WANG C, DUAN Z, ST. LEGER R. MOS1 Osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryotic Cell*, 302-309, 2008.

WANG C, HU G, ST LEGER RJ. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudates and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genetics and Biology*, 42:704-718, 2005.

WANG C, ST LEGER RJ. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 103: 6647-6652, 2006.

WANG C, ST LEGER RJ. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell*, 6: 808-816, 2007.

WANG C, ST LEGER RJ. The *Metarhizium anisopliae* Perilipin Homolog MPL1 Regulates Lipid Metabolism, Appressorial Turgor Pressure, and Virulence. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 21110-21115, 2007a.

WANG C, TYPAS MA, BUTT TM. Detection and characterisation of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 213: 251-255, 2002.

ZAIM M, GUILLET P. Alternative insecticides: an urgent need. *TRENDS in Parasitology*, 18(4): 161-163, 2002.

ZHENG W, CHEN J, LIU W, ZHENG S, ZHOU J, LU G, WANG Z. A Rho3 homolog is essential for appressorium development and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Eukaryotic Cell*, 2240-2250, 2007.

