

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA

DISSERTAÇÃO

FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS ISOLADOS DE SOLOS
DE UM FRAGMENTO DE MATA ATLÂNTICA

MARGY ALEJANDRA ESPARZA MORA

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA

FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS ISOLADOS DE SOLOS DE UM
FRAGMENTO DE MATA ATLÂNTICA

MARGY ALEJANDRA ESPARZA MORA

Sob a Orientação do Professor

Marcelo Elias Fraga

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em Biotecnologia Aplicada.

Seropédica - RJ

Outubro/2015

*Às pessoas mais importantes de minha vida,
Aos meus queridos avós, Elodia Monsalve e Eduardo Esparza,
por todo carinho e apoio.*

*Aos meus pais, Fabiola Mora e Jairo Esparza,
pelo amor, estímulo e confiança.*

A minha irmã, Silvia Esparza Mora, pelo amor e amizade.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, sem ele nada seria.

Á minha mãe, pai e irmã, pois mesmo estando distantes em suas orações sempre se lembraram de mim, por todo o amor, carinho, incentivo, compreensão, por acreditarem e confiarem em mim e por sempre estarem dando-me força e suporte para que continuasse em frente.

Ao meu amor Edgar Urdaneta Fuentes, por todo o amor, companheirismo, incentivo, compreensão e confiança.

Á Universidade federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e o Programa de Pós- Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada por tornar possível a realização de mais uma etapa profissional importante em minha vida.

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro á pesquisa, através da concessão da bolsa.

Ao meu orientador Professor Marcelo Elias Fraga, pela orientação, paciência e sugestões no decorrer deste projeto.

Ao professor Ricardo Luis Louro Berbara, do programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, UFRRJ. Pela realização das análises físico-químicas do solo, por toda sua atenção e por confiar neste trabalho.

Á Professora Janaina Ribeiro Costa Rouws, da Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ. Pela imprescindível ajuda com as análises estatísticas.

Ao mestre Alzimiro M. Conteiro, da PESAGRO, Seropédica-Rj. Por abrir as portas do seu laboratório, por todo seu ensinamento e atenção.

Ao mestre Luiz Augusto de Aguiar, da CEPAA/PESAGRO, Seropédica-RJ. Pelo apoio para fotografar os fungos, pelos conselhos e ensinamentos.

Ao Professor Ricardo Harakava, do Laboratório de Fitopatologia e Biologia Molecular do Instituto Biológico, São Paulo. Pela ajuda com a realização das análises moleculares.

Á minha amiga Julie G. Chacon, pela compreensão, apoio e amizade nos momentos de dificuldade.

Á minha colega Tatiana de Oliveira Pinto, Pela companhia, compreensão, apoio e carinho.

À mestranda Michele Rodrigues, pelo apoio e incentivo.

Ao secretário do PPGFBA, Roberto Tadeu Souza de Oliveira, pela boa vontade, prestatividade, empenho e responsabilidade nas suas atribuições.

Ao técnico do Laboratório de Micologia, UFRRJ, Luiz Jorge, Pelo auxílio e apoio.

Á exemplar funcionaria do Laboratório de Fitopatologia, UFRRJ, Ivanete Ferreira de Oliveira que atenciosamente colaborou, de diversas maneiras com o fornecimento do material de laboratório.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada pelos conhecimentos transmitidos e pelas sugestões.

Aos meus familiares e amigos que mesmo á distancia compreenderam os momentos difíceis.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na execução desse trabalho.

“Que tal olhar os fungos de um ângulo diferente.

Você vai, no mínimo, se surpreender.”

Autor anônimo

RESUMO

Esparza Mora, Margy Alejandra. **Fungos entomopatogênicos isolados de solos de um fragmento de Mata Atlântica**. 2015. 137p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ. Seropédica, RJ, 2015.

Os fungos entomopatogênicos desempenham um papel importante na regulação de populações de insetos incluindo pragas agrícolas e florestais. Os fungos anamórficos dos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria* apresentam o maior potencial para o uso em controle biológico. O objetivo foi caracterizar as populações de fungos entomopatogênicos isolados de solos, determinar a ocorrência das espécies patogênicas de insetos da ordem Hymenoptera, bem como avaliar o potencial de controle biológico. Foram coletadas dez amostras compostas de solo durante os períodos chuvoso e seco, no Parque Municipal Natural do Curió em Paracambi, RJ. O isolamento dos fungos entomopatogênicos foi por dois métodos: com larvas isca - *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) e *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), e meios seletivos - Ágar Batata Dextrose suplementado com tegumento de *T. molitor* (BDA+TI) e Meio Martin. Após o isolamento, 216 fungos entomopatogênicos foram identificados utilizando critérios macroscópicos e microscópicos em BDA e MEA. A análise molecular das cepas mais virulentas foi realizada através do sequenciamento das regiões ITS1 e ITS4. A patogenicidade de 8 isolados entomopatogênicos foi avaliada usando larvas *G. mellonella* e *T. molitor*. As larvas foram imersas durante um minuto em concentrações de 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9 conídios.mL⁻¹. Foi observado que o 88,0% dos isolados eram provenientes do método isca e 12,0% do método com meios seletivos. A espécie predominante foi *Beauveria bassiana* isolada com *G. mellonella* no período seco (36,0%) e chuvoso (36,0%). *Metarhizium anisopliae* foi mais isolado com larvas de *T. molitor* no período seco (33,3%) e chuvoso (32,0%). *Beauveria bassiana* foi menos prevalente no meio Martin, observando-se uma ocorrência de 13,3% no período seco e 33,3% no período chuvoso. Não foi observado crescimento de *M. anisopliae* no meio Martin. A ocorrência de *B. bassiana* no meio BDA+TI foi de 33,3% no período seco e 20,0% no período chuvoso. A maior ocorrência de *M. anisopliae* (26,7%) foi no período chuvoso usando o meio BDA+TI. De acordo com o teste de patogenicidade as cepas de *B. bassiana* com maior desempenho para *G. mellonella* foram Bb53MI e Bb79MI com CL₅₀ de $3,98 \times 10^7$ e $1,04 \times 10^7$ conídios.mL⁻¹, para *T. molitor* foi Bb79MI com CL₅₀ de $1,03 \times 10^7$ conídios.mL⁻¹. As cepas de *M. anisopliae* com melhor desempenho foram Ma58MI e Ma10MI tanto para *T. molitor* ($1,0 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^7$ conídios.mL⁻¹ respectivamente) como para *G. mellonella* ($6,3 \times 10^7$ e $1,1 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹ respectivamente). As linhagens Ma10MI, Ma12MI, Ma58MI e Ma11MI foram identificadas através da caracterização molecular como pertencentes a *M. anisopliae* e Bb11MI, Bb79MI, Bb53MI e Bb27MI como *B. bassiana*. O método isca com *G. mellonella* e *T. molitor* é um método sensível para o isolamento de fungos entomopatogênicos em solo. *Galleria mellonella* e *T. molitor* são susceptíveis à ação patogênica dos fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae* nas concentrações de 10^6 a 10^9 conídios.mL⁻¹.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, controle biológico, inimigos naturais, biodiversidade, virulência.

ABSTRACT

Esparza Mora, Margy Alejandra. **Entomopathogenic fungi isolated from soil of a fragment of the Atlantic Forest.** 2015. 137p. Dissertation (Post Graduate Program in Entomology and Plant Pathology and Applied Biotechnology) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ. Seropédica, RJ, 2015.

The entomopathogenic fungi play an important role in regulating populations of insects including agricultural and forest pests. The anamorphic fungi *Beauveria* genera *Metarhizium*, and *Isaria* have the greatest potential for use in biological control. The aim was to characterize the populations of entomopathogenic fungi isolated from soil, determine the occurrence of pathogenic species of insects of the order Hypocreales, and assess the potential biological control. Ten samples composed of soil were collected during the rainy and dry seasons, the Municipal Natural Park of Curio in Paracambi, RJ. The isolation of entomopathogenic fungi was by two methods: with bait larvae - *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) and *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), and selective media - Potato Dextrose Agar supplemented with *T. molitor* integument (PDA+IT) and Martin medium. After isolation, 216 entomopathogenic fungi were identified using macroscopic and microscopic criteria in PDA and MEA. Molecular analysis of the most virulent isolates was performed by sequencing of ITS1 and ITS4 regions. The pathogenicity of 8 entomopathogenic isolates was assessed using *G. mellonella* and *T. molitor* larvae. The larvae were immersed for one minute at concentrations of 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 and 1×10^9 conidios.mL⁻¹. It was observed that 88.0% of the isolates were derived from the bait method and 12.0% from the method with selective media. The predominant species was *Beauveria bassiana* isolated with *G. mellonella* in the dry season (36.0%) and rainy (36.0%). *Metarhizium anisopliae* was more isolated with *T. molitor* during the dry season (33.3%) and rainy (32.0%). *Beauveria bassiana* was less prevalent in Martin medium, observing an occurrence of 13.3% in the dry season and 33.3% in the rainy season. There was no growth of *M. anisopliae* in the Martin medium. The occurrence of *B. bassiana* in the PDA+IT medium was 33.3% in the dry season and 20.0% in the rainy season. The higher occurrence of *M. anisopliae* (26.7%) was the rainy season when using the PDA+IT medium. According with the test of pathogenicity strains of *B. bassiana* with higher performance for *G. mellonella* were Bb53MI Bb79MI with LC₅₀ $3,98 \times 10^7$ and $1,04 \times 10^7$ conidios.mL⁻¹, for *T. molitor* was Bb79MI with LC₅₀ $1,03 \times 10^7$ conidios.mL⁻¹. The strains of *M. anisopliae* with better performance were Ma58MI and Ma10MI both *T. molitor* ($1,0 \times 10^6$ and $1,0 \times 10^7$ conidios.mL⁻¹ respectively) and for *G. mellonella* ($6,3 \times 10^7$ and $1,1 \times 10^8$ conidios.mL⁻¹ respectively). The Ma10MI, Ma12MI, Ma58MI and Ma11MI strains were identified by molecular characterization as belonging to *M. anisopliae* and Bb11MI, Bb79MI, Bb27MI and Bb53MI as *B. bassiana*. The bait method with *G. mellonella* and *T. molitor* is a sensitive method for the isolation of entomopathogenic fungi in soil. *Galleria mellonella* and *T. molitor* are susceptible to pathogenic action of the fungus *B. bassiana* and *M. anisopliae* at the concentrations 10^6 - 10^9 conidios.mL⁻¹.

Keywords: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, biological control, natural enemies, biodiversity, virulence.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Frequência de ocorrência de fungos entomopatogênicos em 15 amostras de solo coletadas no Parque Natural Municipal do Curió e reveladas usando o método de isolamento com meio de cultura Martin e BDA+TI, nas épocas seca e chuvosa. | 62 |
| Tabela 2. Frequência de ocorrência de fungos entomopatogênicos em 15 amostras de solo coletadas no Parque Natural Municipal do Curió e usando o método de isolamento com larvas (<i>T. molitor</i> e <i>G. mellonella</i>), nas épocas seca e chuvosa. | 67 |
| Tabela 3. Análise físico químico do solo realizada em cada período de coleta (seca e chuvosa). | 70 |
| Tabela 4. Germinação de conídios de <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> em meio de cultura BDA+TI e Agar Água após de 24h de crescimento. | 72 |
| Tabela 5. Características macroscópicas dos isolados de fungos entomopatogênicos de solo de Mata Atlântica. | 79 |
| Tabela 6. Características microscópicas dos isolados de fungos entomopatogênicos de solo de Mata Atlântica. | 79 |
| Tabela 7. Mortalidade de larvas de <i>G. mellonella</i> em diferentes concentrações de esporas de <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> | 83 |
| Tabela 8. Mortalidade de larvas de <i>T. molitor</i> em diferentes concentrações de esporas de <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> | 83 |
| Tabela 9. Valores de CL ₅₀ e TL ₅₀ das cepas de <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> contra <i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i> | 84 |
| Tabela 10. Valores de CL ₉₀ e TL ₉₀ das cepas de <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> contra <i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i> | 85 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Posições filogenéticas de fungos patogênicos de insetos..... | 17 |
| Figura 2. Insetos infectados com espécies de Entomophthorales..... | 20 |
| Figura 3. Em torno das 55 ordens se colocam as 10 classes de Ascomycetes subphylum Pezizomycotina. As classes e ordens que contêm os entomopatógenos se indicam mediante as flechas. Por exemplo, os Sordariomycetes têm em torno de 13 ordens, um deles é Hypocreales, a ordem com o maior número de espécies entomopatógenas. Alguns membros da Pezizomycotina permanecem sem classificação | 22 |
| Figura 4. Características microscópicas comumente usadas na identificação de entomopatógenos. A-C, F-I, L e M, são estruturas de estados assexuadas (anamorfos). Outras figuras de ascos e ascósporos são de estados sexuais (Teleomorfo) | 23 |
| Figura 5. Família Clavicipitaceae. B, C, E, F e I são estados assexuados (anamorfos). Outras figuras são de estados sexuais (teleomorfos)..... | 24 |
| Figura 6. Família Cordycipitaceae. E-k, e M são estados assexuados (anamorfos). Outras figuras são de estados sexuais (teleomorfos)..... | 25 |
| Figura 7. Família Ophiocordycipitaceae, G, I, K e L, são estados assexuais (anamorfo). Outras figuras são estados sexuais (Teleomorfo)..... | 25 |
| Figura 8. O diagrama ilustra as formas em que os fungos patogênicos infectam os hospedeiros artrópodes por esporos assexuais ou sexuais, proliferam e se dispersam..... | 30 |
| Figura 9. Modelo genérico que mostra o processo de infecção por fungos entomopatogênicos. Conídios sobre a cutícula do inseto, onde germina e forma um tubo germinativo e um apressório. A hifa penetra e rompe as camadas da cutícula, atingindo o hemocelo onde são formados blastosporos e corpos hifais. O crescimento fúngico continua e se move ao longo do hemocelo, invadindo órgãos, interrompendo processos metabólicos, e, possivelmente, produzindo metabolitos tóxicos, e causando a morte | 32 |
| Figura 10. Estruturas químicas de metabólitos sintetizados por fungos com propriedades inseticidas e fungicidas | 40 |
| Figura 11. Localização dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação das diferentes regiões do rDNA de fungos. Fonte: DE OLIVEIRA et al. 2005..... | 46 |
| Figura 12. Localização geográfica do Parque Natural Municipal do Curió (PNM Curió), Município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, Brasil | 51 |
| Figura 13. Método de isolamento de fungos entomopatogênicos com larvas isca: A) larvas de <i>Galleria mellonella</i> , B) <i>Tenebrio molitor</i> | 53 |
| Figura 14. Câmara de Neubauer com os respectivos campos de contagem para conídios dos fungos entomopatogênicos. Fonte: ALVES & MORAES, 1998. | 57 |
| Figura 15. Unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos no meio seletivo Martin e BDA+TI nas épocas seca e chuvosa. Barras seguidas de letras iguais, minúsculas entre épocas e maiúsculas entre meios de cultura, não diferem entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade. | 61 |
| Figura 16. Porcentagem de mortalidade das larvas (<i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i>) por fungos entomopatogênicos no período seco e chuvoso. Barras seguidas de letras iguais, minúsculas entre épocas e maiúsculas entre meios de cultura, não diferem entre si pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, a 5% de probabilidade..... | 64 |
| Figura 17. Porcentagem larvas vivas (<i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i>) no período seco e chuvoso. Barras seguidas de letras iguais, minúsculas entre épocas e maiúsculas entre meios de cultura, não diferem entre si pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, a 5% de probabilidade..... | 65 |
| Figura 18. Porcentagem de mortalidade das larvas (<i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i>) por outros microrganismos no período seco e chuvoso. Barras seguidas de letras iguais, minúsculas entre | |

| | |
|--|----|
| épocas e maiúsculas entre meios de cultura, não diferem entre si pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, a 5% de probabilidade..... | 66 |
| Figura 19. Porcentagem de mortalidade de larvas <i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i> após 10 dias de inoculação com cepas de <i>B. bassiana</i> (\pm erro padrão da média)..... | 73 |
| Figura 20. Porcentagem de mortalidade de larvas <i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i> após 10 dias de inoculação com cepas de <i>M. anisopliae</i> (\pm erro padrão da média)..... | 75 |
| Figura 21. Infecção de <i>B. bassiana</i> sobre larvas de <i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i> . A. Pontos pretos como a resposta imune indicando penetração direta do fungo, B. Hifas e esporos de <i>B. bassiana</i> no interior do hospedeiro, C. Pigmento vermelho causado pela oosporeína produzida pelo fungo, D. Colonização de <i>G. mellonella</i> , E. Colonização de <i>T. molitor</i> , F. Conidióforos de <i>B. bassiana</i> sobre as regiões intersegmentais. Foto: Esparza, 2015. | 76 |
| Figura 22. Infecção de <i>M. anisopliae</i> sobre larvas de <i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i> . A. Colonização do <i>G. mellonella</i> , B. Conidióforos de <i>M. anisopliae</i> , C. Hifas e esporos de <i>M. anisopliae</i> no interior do hospedeiro, D. Micélio de <i>M. anisopliae</i> sobre a cabeça de <i>G. mellonella</i> E. Colonização do <i>T. molitor</i> F. Pontos pretos como a resposta imune indicando penetração direta do fungo. Foto: Esparza, 2015..... | 77 |
| Figura 23. Características macroscópicas das colônias dos isolados de <i>Beauveria bassiana</i> (A-D) e <i>Metarhizium anisopliae</i> (E-H), verso e reverso em MEA e BDA, respectivamente a 25 °C após 7 dias. | 80 |
| Figura 24. Características microscópicas dos isolados de <i>Beauveria bassiana</i> (A-B) e <i>Metarhizium anisopliae</i> (C-D), em MEA a 25 °C após 7 dias..... | 81 |
| Figura 25. Mortalidade acumulada de larvas de <i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i> , inoculadas com diferentes concentrações e cepas de <i>B. bassiana</i> . A-B. Cepa Bb11MI, C-D. Cepa Bb53MI, E-F. Cepa Bb79MI e G-H. Cepa Bb27MI..... | 87 |
| Figura 26. Mortalidade acumulada de larvas de <i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i> , inoculadas com diferentes concentrações e cepas de <i>M. anisopliae</i> . A-B. Cepa Ma58MI, C-D. Cepa Ma10MI, E-F. Cepa Ma12MI e G-H. Cepa Ma11MI. | 89 |
| Figura 27. Produtos da amplificação de DNA dos isolados entomopatogênicos com iniciadores ITS1 e ITS4. M = Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). C = Controle negativo. 1, 2, 3, 4 = Isolados de <i>B. bassiana</i> . 5, 6, 7, 8 = Isolados de <i>M. anisopliae</i> | 92 |
| Figura 28. Árvore filogenética construída pelo método de ML, Jukes-Cantor, mostrando a relação entre os isolados dos fungos entomopatogênicos obtidos do Parque Natural Municipal do Curió, Paracambi, RJ - Brasil, e outras espécies relacionadas depositadas no GenBank-NCBI. As sequências utilizadas são das regiões rDNA ITS1. | 93 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 | OBJETIVOS | 15 |
| 1.1.1 | Objetivo Geral | 15 |
| 1.1.2 | Objetivos específicos | 15 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRAFICA | 16 |
| 2.1 | Fungos entomopatogênicos..... | 16 |
| 2.2 | Classificação e filogenia dos Fungos Entomopatogênicos | 16 |
| 2.2.1 | Filo Microsporídia | 18 |
| 2.2.2 | Fungos Zoosporicos..... | 18 |
| 2.2.3 | Fungos Zygosporicos..... | 19 |
| 2.2.4 | Filo Ascomycota..... | 20 |
| 2.2.5 | Filo Basidiomycota..... | 24 |
| 2.3 | Principais Fungos Entomopatogênicos do filo Ascomycota | 26 |
| 2.3.1 | <i>Beauveria</i> spp. Vuillemin | 26 |
| 2.3.2 | <i>Metarhizium</i> spp. Sorokin | 26 |
| 2.3.3 | <i>Isaria</i> spp. Persoon (Paecilomyces spp. Bainier) | 27 |
| 2.3.4 | <i>Verticillium</i> spp. Nees (Gams & Zare <i>Lecanicillium</i> spp.; W. Gams & Zare <i>Simplicillium</i> spp.; e Batista & O.M. Fonseca <i>Pochonia</i> spp.) | 28 |
| 2.3.5 | <i>Nomurea</i> spp. Maublanc..... | 28 |
| 2.4 | O processo de infecção | 29 |
| 2.4.1 | Adesão dos esporos na cutícula do hospedeiro e germinação de esporos. | 29 |
| 2.4.2 | Penetração no hemocele. | 31 |
| 2.4.3 | Replicação no hemocele. | 33 |
| 2.5 | Mecanismos de defesa dos insetos..... | 34 |
| 2.5.1 | Barreiras físico-químicas | 35 |
| 2.5.2 | Sistema imune inato | 35 |
| 2.5.3 | Outras estratégias de defesa..... | 36 |
| 2.6 | Enzimas produzidas por fungos entomopatogênicos..... | 37 |
| 2.7 | Metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos entomopatogênicos..... | 39 |
| 2.8 | Fatores que afetam a diversidade e distribuição dos fungos entomopatogênicos..... | 41 |
| 2.9 | Caracterização molecular de fungos entomopatogênicos | 44 |
| 2.10 | Diversidade de Fungos Entomopatogênicos | 47 |
| 2.10.1 | Padrões de distribuição dos fungos entomopatogênicos | 48 |
| 2.10.2 | Bioinseticidas baseados em fungos entomopatogênicos | 49 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 51 |
| 3.1 | Local de estudo | 51 |
| 3.2 | Localização das coletas..... | 51 |
| 3.3 | Amostragem do solo | 52 |
| 3.4 | Isolamento de fungos entomopatogênicos | 52 |
| 3.4.1 | Meios seletivos (Martin e BDA+TI) | 52 |
| 3.4.2 | Iscas (<i>Galleria mellonella</i> e <i>Tenebrio molitor</i>) | 53 |
| 3.5 | Identificação das espécies e preservação de fungos | 54 |
| 3.5.1 | Análise morfológica | 54 |
| 3.5.2 | Análise molecular | 54 |
| 3.5.3 | Preservação | 56 |
| 3.6 | Avaliação patogenicidade de fungos isolados em meio seletivo (Postulados de Koch's)..... | 56 |
| 3.6.1 | Preparação do inoculo fúngico | 56 |
| 3.6.2 | Métodos para avaliar a patogenicidade | 56 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.7 | Caracterização fisiológica..... | 57 |
| 3.7.1 | Avaliação da viabilidade | 57 |
| 3.8 | Avaliação patogenicidade dos fungos entomopatogênicos isolados usando o método (MI) e (MS) (Postulados de Koch's) | 58 |
| 3.8.1 | Preparação de Inoculo fúngico | 58 |
| 3.8.2 | Métodos para avaliar a patogenicidade | 58 |
| 3.8.3 | Avaliação da infecção das larvas de <i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i> | 58 |
| 3.9 | Teste de virulência | 59 |
| 3.10 | Análise Estatística..... | 59 |
| 3.10.1 | Isolamento de fungos entomopatogênicos com meios seletivos | 59 |
| 3.10.2 | Isolamento de fungos entomopatogênicos pelo método isca..... | 59 |
| 3.10.3 | Avaliação da Virulência | 60 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 61 |
| 4.1 | Isolamento de fungos entomopatogênicos | 61 |
| 4.2 | Análise Físico Químico | 69 |
| 4.3 | Caracterização fisiológica (Porcentagem de germinação)..... | 71 |
| 4.4 | Avaliação patogenicidade dos fungos entomopatogênicos isolados usando o método (MI) e (MS) (Postulados de Koch's) | 72 |
| 4.4.1 | Infecção de larvas por fungos entomopatogênicos..... | 76 |
| 4.5 | Caracterização morfológica | 78 |
| 4.6 | Avaliação da virulência das cepas selecionadas | 81 |
| 4.7 | Identificação molecular..... | 91 |
| 4.7.1 | Extração de DNA e Amplificação da região ITS do rDNA através de PCR | 91 |
| 4.7.2 | Sequenciamento dos fragmentos amplificados..... | 92 |
| 5 | CONCLUSÕES | 95 |
| 6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 96 |
| | ANEXOS | 134 |

1 INTRODUÇÃO

O Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta, dentre os diversos biomas do país, a Mata Atlântica é um ecossistema caracterizado pelos altos níveis de endemismo e pela sua elevada diversidade biológica, sendo considerado um dos cinco “hotspots” de conservação mundial. Essas características, combinadas com a sua história de degradação, o torna um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo. Originalmente, o bioma se estendia por uma área de aproximadamente 1.306 km², equivalente a 15% do território brasileiro. Sua região de ocorrência original abrangia integralmente ou parcialmente atuais 17 estados da federação. Suas condições climáticas propiciam a existência de micro-organismos entomopatogênicos. O Parque Natural Municipal do Curió possui uma área de 913,961 ha, e é considerada a mais representativa área remanescente de Mata Atlântica do município de Paracambi no estado do Rio de Janeiro. O conhecimento sobre micodiversidade da Mata Atlântica é de grande relevância para se entender a dinâmica envolvida nesse bioma. Diversos aspectos da Mata Atlântica são abordados por uma imensa quantidade de pesquisadores, contudo, poucos relatos têm sido observados em relação à diversidade fúngica entomopatogênica existente nesse importante ecossistema. Emerge, dessa forma, a necessidade de pesquisas para investigar a microbiota da Mata Atlântica, pois, espécies podem ser extintas antes de serem descritas.

O conhecimento da composição de espécies indígenas e distribuição de fungos patógenos de insetos são essenciais para avaliar o potencial do controle biológico em um ecossistema específico. A presença de certas espécies de fungos entomopatogênicos pode ser considerada como um indicador da sua capacidade de sobreviver nesse ambiente. O ambiente do solo constitui um importante reservatório para a diversidade de fungos entomopatogênicos, o que pode contribuir significativamente na regulação das populações de insetos. Dois métodos são geralmente usados para detectar fungos entomopatogênicos em solo. O método isca usa *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) ou outros insetos e é relativamente simples e sensível. O método de plaqueamento usando vários meios seletivos são particularmente úteis quando a quantificação é necessária ou quando o material de análises não é solo. O fungicida dodine (monoacetato N-dodecilguanidina) é aplicado ao meio de cultura e é usado para o isolamento de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Os fatores bióticos e abióticos podem afetar a presença de espécies de fungos, e a resposta de cada espécie para estas condições varia. *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin caracteriza-se como uma espécie “agrícola” enquanto *Isaria* spp. são raras em campos, mas são frequentemente encontradas em ecossistemas florestais. Outras como *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin podem ocupar uma vasta gama de habitats. Estas espécies pertencentes aos Hypocreales (Ascomycota) têm o maior uso no controle biológico.

O controle biológico é definido como a ação de inimigos naturais, que inclui predadores, parasitas e patógenos microbianos para o controle de insetos. Os fungos entomopatogênicos constituem um grupo com mais de 750 espécies espalhadas no ambiente, e são os primeiros agentes biológicos a serem utilizados para o controle de pragas, porque são capazes de causar doença e morte dos insetos. A infecção depende do contato da estrutura assexuada conhecida como conídio com a cutícula do inseto hospedeiro. O conídio usa inúmeras enzimas para

suprimir as defensas do hospedeiro e passar através da cutícula. Os corpos de hifas ou blastosporos progressão dentro do corpo do inseto, obstruindo órgãos, minando nutrientes e produzindo compostos tóxicos. Após a morte do hospedeiro, os fungos cobrem o cadáver com novos conídios prontos para a dispersão. Em especial, despertam interesse pelo seu papel na regulação de insetos incluindo pragas agrícolas e florestais, e doenças, na ausência de poluição e degradação ambiental.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Caracterizar as populações de fungos entomopatogênicos isolados de solos do Parque Natural Municipal do Curió, Paracambi – RJ.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Identificar espécies de fungos entomopatogênicos por características macromorfológicas, micromorfológicas e técnica molecular.
- b) Determinar a ocorrência de fungos entomopatogênicos durante o período seco e chuvoso.
- c) Caracterizar o solo por análises físicas e químicas.
- d) Avaliar a viabilidade das espécies de fungos entomopatogênicos.
- e) Avaliar a virulência das espécies de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* contra larvas de *G. mellonella* e *T. molitor*.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Fungos entomopatogênicos

Os membros do reino Fungi são comuns em ambientes terrestres e aquáticos ao longo do mundo, os fungos terrestres foram reportados como patógenos ou parasitas de humanos, animais e plantas, por exemplo, nas plantas endófitas, simbioses de artrópodes e raízes de plantas e como componentes da microbiota do solo, entre outras (ALEXOPOULOS et al., 1996; WATANABE, 2010). Os fungos entomopatogênicos são um grupo de micro-organismos filogeneticamente diversos, heterotróficos, eucariotos, unicelulares ou multicelulares (filamentos) que apresentam reprodução por esporos sexuados, assexuados ou ambos. Estes organismos têm células quitinizadas e são geralmente não móveis (BADII & ABREU, 2006). O termo entomopatogênico designa a esses micro-organismos capazes de atacar os insetos usando-os como hospedeiros para desenvolver parte do seu ciclo de vida (DEVOTTO et al., 2000), ou aqueles que reduzem as populações de insetos praga em níveis que não causam danos econômicos às culturas (TANZINI et al., 2001), ou aqueles que são um meio de controle na redução de populações de insetos vetores de doenças (SCHOLTE et al., 2004). Também definido como parasitas facultativos ou obrigatórios de insetos, com alta capacidade de esporulação e sobrevivência. Eles constituem um grupo de grande interesse para o controle biológico de insetos. Aproximadamente 80% das doenças que ocorrem em insetos têm como agente causador um fungo (BATISTA, 1989). Praticamente, todos os insetos são susceptíveis a algumas das doenças ocasionadas por estes fungos que causam a morte. Há fungos que podem invadir insetos mortos chamados saprófagos e fungos entomófagos que infectam insetos vivos (BUTT et al., 2006). O cálculo da diversidade de fungos no mundo estimado foi de 1.5 – 5.1 milhões de espécies (HIBBETT et al., 2011), dos quais 100,000 foram descritos (VEGA et al., 2012). Destes, aproximadamente 750-1000 são fungos entomopatogênicos colocados em mais de 100 gêneros (ST. LEGER & WANG, 2010). Os fungos entomopatogênicos constituem o maior número de táxons de patógenos de insetos (IGNOFFO, 1973). De Faria e Wraight (2007), identificaram 171 produtos baseados em fungos usados como agentes de biocontrole desde 1960, a maioria deles com *Beauveria bassiana*, *B. Brongniartii*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea*.

2.2 Classificação e filogenia dos Fungos Entomopatogênicos

Os patógenos de insetos evoluíram na maioria das principais linhagens fúngicas. Existem apenas algumas exceções, como os Glomeromycota, que contêm os fungos micorrízicos (Figura 1). Os fungos verdadeiros foram classificados e agrupados em sete divisões: Microsporidia, Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota (BOOMSMA et al., 2014). Considerando dados moleculares e registros fósseis têm estimado que os fungos evoluíssem 0.5-1.5 bilhões de anos atrás, os registros fósseis de Ascomycota e Basidiomycota só datam do Devoniano perto de 400 milhões de anos atrás (LUCKING et al., 2009; BARBEE & TAYLOR, 2010). O mais antigo fóssil conhecido de um fungo entomopatogênico, em cochonilhas (Hemíptera) infectadas por

um fungo é *Ophiocordyceps*, com 100-110 milhões de anos atrás (SUNG et al., 2008) e, depois incluem um fóssil de uma Térmita (Isóptera) infectado por um fungo *Entomophthora*, e uma formiga (Hymenoptera) infectada por *Beauveria*, com 20-30 milhões de anos atrás (POINAR, 1984).

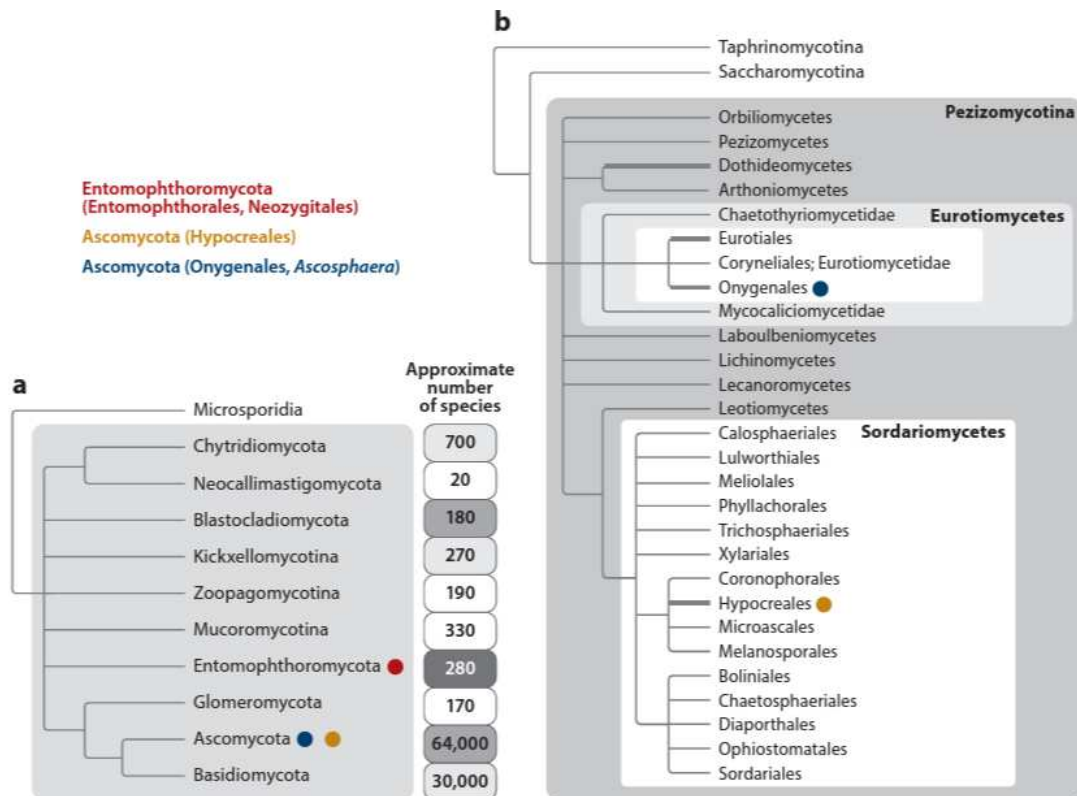


Figura 1. Posições filogenéticas de fungos patogênicos de insetos. (A) O Reino fungi (HIBBETT et al., 2007; JAMES et al., 2006; WHITE et al., 2006), com destaque para filões com patógenos de insetos. Os números representam o número aproximado de espécies descritas dentro de cada (sub) filo e sombreamento em dez unidades de caixas representam proporções relativas de espécies conhecidas de insetos patogênicos (maior proporção quando a cor cinza é mais escura). Pontos vermelhos, amarelos e azuis marcam ramos com os patógenos mais comuns e mais conhecidos de insetos. Os outros quatro ramos têm algumas espécies patogênicas de insetos, mas poucos deles têm sido estudados em detalhe: Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Kickxellomycotina (inclui ordens previamente colocados nas Trichomycetes) e Basidiomycota (B) Ascomycota têm o maior número de espécies descritas e a maior diversidade, incluindo uma variedade de formas de vida saprófitas, mutualistas e patogênicos. As linhas engrossadas representam ordens com fungos patogênicos de insetos e pontos coloridos marcam aqueles com os mais conhecidos patógenos de insetos: Hypocreales (amarelo, por exemplo, *Cordyceps sensulato*, *Metarhizium*, e *Beauveria*) e Onygenales (azul, *Ascosphaera*). Fonte: BOOMSMA et al., 2014.

O número aproximado de espécies patogênicas de insetos descritos pode variar de alguns nos Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Kickxellomycotina e Basidiomycota para um número substancial nos Ascomycota e apresentam um domínio quase completo nos Entomophthoromycota. As posições filogenéticas de Ascomycota que abrigam o maior número de fungos patogênicos de insetos conhecidos são as Ordens Hypocreales e Onygenales, que estão detalhadas na Figura 1B, ilustrando que os estilos de vida de patógenos de insetos evoluíram repetidamente nos Ascomycota (SPATAFORA et al., 2007).

A baixa frequência extrema de linhagens de patógenos de insetos nos Basidiomycota sugere que a sua adaptação tem sido impulsionada por funcionalidades ecológicas diferentes de insetos que parasitam, marcando uma diferença fundamental com os Entomophthoromycota,

que em quase todas as 280 espécies conhecidas são patógenos de artrópodes. Os estágios sexuais (Teleomórficas) dos Hypocreales parecem ocorrer em hospedeiros específicos, ao passo que os estágios assexuados (Anamórfico) são generalistas. Isto oferece um contraste interessante com os fungos *Entomophthorales* que são patógenos obrigatórios de insetos, e tendem a permanecer como hospedeiros específicos também nas suas fases assexuadas. No entanto, algumas espécies de *Entomophthorales* apresentam um modo nutricional completamente diferente, como parasitas de gametófitos da samambaia ou Desmidiálias, nematóides e tardigrades (Meristacraceae e Ancylistaceae), enquanto outros podem se tornar patógenos oportunistas ou saprófitos de vertebrados (*Conidiolobus coronatus*) (BALAZY, 1993).

Embora os Hypocreales pertencem aos Sordariomycetes, com linhagens ecologicamente diversas, nos Pezizomycotina também evoluíram linhagens patógenas de insetos (Figura 1B). Incluem também algumas espécies dos Dothideomycetes, que são patógenos de insetos, e as Ordens Onygenales e Eurotiales, pertencentes aos Eurotiomycetes (KODSUEB et al., 2006). O desenvolvimento de características osmofílicas (por exemplo, a capacidade de crescer em substratos com alto teor de açúcar) pode ter levado a necessidade da especificidade do habitat no gênero *Ascosphaera*. Principalmente membros dos Eurotiales que apresentam histórias de vida como patógenos oportunistas facultativos sem hospedeiros específicos (SOSA et al., 2010). Os gêneros mais estudados são *Aspergillus* e *Penicillium*, por sua produção de compostos secundários tóxicos, podendo apresentar uma estratégia explícita de intoxicação dos tecidos do hospedeiro, para o saprofitismo mais tarde. O estilo de vida oportunista em espécies de Eurotiales pode ser benéfico durante a co-infecção; isto é, a exploração rápida do tecido do hospedeiro pode permitir a *Aspergillus* superar ao *Metarhizium* (HUGHES & BOOMSMA, 2004).

2.2.1 Filo Microsporídia

São os primeiros parasitos intracelulares divergentes e na maioria das vezes agrupados com o Protozoa, os Microsporídia são considerados como fungos (LEE et al., 2010) e são patógenos obrigatórios de animais. Os hospedeiros mais comuns são os peixes e artrópodes, incluindo muitos insetos. Microsporídia tem sido estudada para usá-los no controle biológico da broca europeia do milho, lagartas, gafanhotos e mosquitos. Por Exemplo: *Paranosema locustae* é comercializado como um agente de controle biológico de gafanhotos (LOMER et al., 2001).

2.2.2 Fungos Zoosporicos

2.2.2.1 Filo Chytridiomycota

São fungos flagelados e estão divididos em três filis (Blastocladiomycota, Chytridiomycota e Neocallimastigomycota). Os fungos entomopatogênicos estão incluídos no Blastocladiomycota (JAMES et al, 2006; HIBBETT et al, 2007).

2.2.2.2 *Filo Blastocladiomycota*

São incomuns entre todos os outros fungos porque seu ciclo de vida é caracterizado por meiose durante a formação de esporos no meiosporangio de paredes espessas resultando em uma alternância entre gerações haploide e diploide (JAMES et al., 2006). Exemplos de gêneros incluídos são: *Coelomyxidium*, *Catenaria* e *Coelomomyces*. As espécies de *Catenaria* são conhecidas principalmente como patógenos de nematoides, mas algumas espécies também infectam pequenas moscas. As espécies de *Coelomyxidium* são conhecidas a partir de cochonilhas, larvas de besouros e pupas de dípteros (TANADA & KAYA, 1993). As espécies de *Coelomomyces* são patógenas obrigatórias que requerem de dois hospedeiros aquáticos, larvas de mosquito e crustáceos (KERWIN & PETERSEN, 1997). Além disso, as espécies de *Coelomomyces* são as únicas entre todos os fungos, porque lhes falta hifas, bem como paredes gametangiais (GLEASON et al., 2010).

2.2.3 Fungos Zygosporicos

Estudos filogenéticos atuais colocaram os ex-membros dos Zygomycetes em quatro subfilos (Mucoromycotina, Zoopagomycotina, Kickxellomycotina e Entomophthoromycotina) (WHITE et al., 2006; HIBBETT et al., 2007). Os membros do Mucoromycotina incluem Mucorales e Mortierellales, que geralmente são saprófitos no solo e esterco ou parasitas de plantas e animais. Algumas espécies, tais como *Sporodiniella umbellata*, são patógenos de insetos (BENNY, 2009). No entanto, é relatado como patógeno primário de insetos saudáveis (MADELIN, 1966). Zoopagomycotina e Kickxellomycotina formam um grupo juntamente com o Harpellales (WHITE et al., 2006). Contêm Ordens Dimargaritales (principalmente parasitas haustorial de Mucorales), Kickxellales (sapróbios e não parasitas haustorial de fungos) e duas Ordens (Harpellales e Asellariales) de fungos associadas com o intestino de artrópodes previamente colocados nos Trichomycetes (LICHTWARDT et al., 2001).

Os membros do Harpellales e Asellariales são considerados comensais. *Smittium morbosum* penetra através do revestimento do intestino e mata as larvas do mosquito através da inibição da ecdise (SWEENEY, 1981). Além disso, vários membros do Harpellales parasitam adultos de moscas pretas (*Simuliidae*), preenchendo seus ovários com cistos fúngicos, de modo que as moscas dispersam o fungo quando tentam colocar seus ovos (WHITE et al., 2006). Os membros do Zoopagomycotina foram divididos em duas famílias, Zoopagaceae, restritas a predadores e o Cochlonemataceae, que são parasitas de rotíferos, amebas, rizópodes e outros fungos (BENNY, 2009).

O subfilo Entomophthoromycotina contém outra linhagem de fungos zygosporicos, os Entomophthorales (Figura 2) (WHITE et al., 2006; HIBBETT et al., 2007; HUMBER, 2008). Muitos entomopatógenos são encontrados no grupo (KELLER, 2007). Os entomopatógenos são classificados em Entomophthoraceae e Neozygitaceae. Algumas das espécies incluídas nas famílias produzem capiliconídios (conídios secundários) que são efetivamente dispersos por insetos. O Entomophthorales inclui os gêneros *Entomophthora*, *Pandora*, *Zoophthora* e gêneros segregados. O gênero segregado é aquele que é separado de um gênero existente. Por exemplo, *Entomophaga* é um gênero segregado de *Entomophthora* por que algumas espécies que foram

anteriormente colocadas em *Entomophthora* são agora colocadas em *Entomophaga*. Além do nível de espécie e especificidade, alguns gêneros são restritos a certos hospedeiros, como *Strongwellsea* em moscas e *Massospora* sobre cigarras (BENNY, 2009).

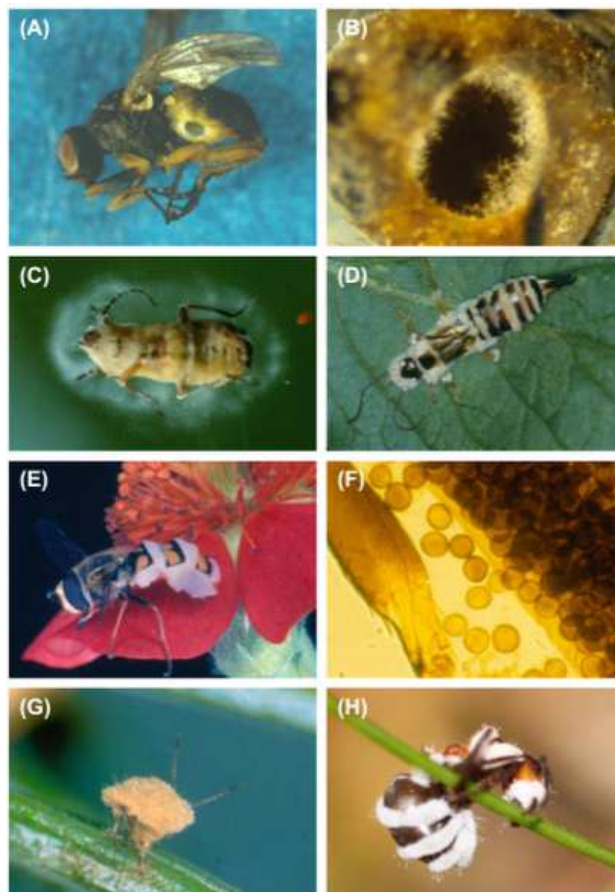


Figura 2. Insetos infectados com espécies de Entomophthorales. (A) Os fungos *Strongwellsea* sp. criam um buraco característico no abdômen da mosca *Coenosia testacea*. (B) Orifício abdominal de na mosca *Paradelia intercepta* criado por *Strongwellsea* sp. Esporos infecciosos que são expulsos ativamente a traves do buraco do hospedeiro vivente. (C) Soldado besouro *Rhagonycha fulva* morto por fungo entomopatogênico *Pandora lipai*. Os esporos são expulsos ativamente do cadáver infectado pelo fungo e um halo de esporos são visíveis em torno do hospedeiro morto. (D) *Earwig forcifula* sp. infectada por *Zoophthora forcifulae*. O fungo emerge a traves da cutícula em partes intersegmentais do corpo do hospedeiro. (E) Mosca infectada por *Entomophthora syrphii* morta em um lugar elevado (enfermidade superior) para aumentar a dispersão de esporos de fungos. (F) Esporos produzidos por *Neozygites parvispora* no hospedeiro *Limothrips dentricornis*. (G) Abeto verde *Elatobium abietinum* infectado por *Entomophthora planchoniana*. (H) Formiga de madeira *Formica* sp. morta por *Pandora formicae*. [Créditos da foto: (A e D, G) J. Eilenberg; (E) H. Philipsen; (F) C. Nielsen; (H) J. Małagocka]. Fonte: VEGA et al., 2012).

2.2.4 Filo Ascomycota

Os Ascomycota são classificados em três subfilos. Dois dos subfilos não têm associações com patógenos de insetos. Os Taphrinomycotina são saprófitos ou parasitas de plantas e vertebrados (HIBBETT et al., 2007). Muitos Ascomycetes leveduriformes (Saccharomycotina) estão intimamente associados com insetos para a dispersão, e os fungos fornecem vitaminas, enzimas e outros recursos para os insetos hospedeiros (VEGA & DOWD, 2005). As leveduras, no entanto, não são patógenas ou mesmo parasitas de insetos (KURTZMAN et al., 2011). Diferentes linhagens de Pezizomycotina apresentam membros

associados a insetos (Figura 3) (BENJAMIN et al., 2004; HUMBER, 2008; BLACKWELL, 2010). Pezizomycotina são os mais numerosos morfologicamente e ecologicamente complexos dos Ascomycetes (SCHOCH et al., 2009). Os ciclos de vida, muitas vezes têm dois estágios, Anamorfo (estado assexuado) e Teleomorfo (estado sexual), e os membros dos Hypocreales fornecem bons exemplos (Figura 4). Em alguns casos, o estado sexual pode nunca ou raramente ser produzido. Sob a nova classificação, os anamorfos muitas vezes são úteis no fornecimento de informações taxonômicas. Por exemplo, o anamorfo ligado para *Torrubiella*, um gênero cujo principal hospedeiro é constituído de aranhas e cochonilhas, incluem espécies de *Akanthomyces* possuindo uma gama de hospedeiros mais ampla do que as espécies *Gibellula*, que são restritas as aranhas (HODGE, 2003; JOHNSON et al., 2009). Entre os fungos associados com insetos, os estágios assexuados muitas vezes precedem a produção de estágios sexuais (SUNG et al., 2007). Os conídios (esporos assexuais), que são formados em cadáveres de insetos podem ser produzidos diretamente em conidióforos como em espécies de *Metarhizium* em insetos adultos e larvas (Figura 4 A, B). Em algumas espécies de *Isaria* e *Akanthomyces*, os conídios são formados em sinematas, estrutura formada por fusão de grupos de conidióforos individuais (Figura 4 D). Ocasionalmente, estágios tanto assexuados e sexuais estão presentes em um hospedeiro no mesmo tempo, como no caso de *Hypocrella calendulina* (Figura 4 D, E) e seu anamorfo *Aschersonia calendulina* sobre cochonilhas, bem como outras espécies (LUANGSARD et al., 2009).

Os esporos assexuais e sexuais dos fungos associados com insetos geralmente são produzidos em estruturas levantadas aumentando a oportunidade para a dispersão em um novo hospedeiro. A produção de esporos assexuada pode ocorrer em um estroma, com desenvolvimento de ascos e ascósporos. Os peritécios podem ser imersos em um estroma, como em *Cordyceps militaris*, *C. Ninchukispora* (Figura 6 L), *Ophiocordyceps nutans* (Figura 7 E), *Elaphocordyceps paradoxa* (Figura 7 F), e outras espécies (VEGA et al., 2012). Pezizomycotina inclui alguns dos pouco conhecidos entomopatógenos como membros da Tubeufiaceae (Dothideomycetes). As espécies na Tubeufiaceae têm uma gama nutricional ampla, com muitas espécies saprófitas, parasitas de fungos e folhas, ou formando líquen com algas (KODSUEB et al., 2006). As espécies do gênero, *Podonectria*, são patógenas de cochonilhas, e por muitos anos estes fungos foram erroneamente colocados na ordem Hypocreales (ROSSMAN, 1978). Outros entomopatógenos incluem os membros dos Eurotiomycetes, incluindo espécies de *Ascosphaera* (Onygenales), e os membros do Eurotiales, incluindo certas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* e seus parentes (SOSA-GÓMEZ et al., 2010). Espécies de *Ascosphaera* são parasitas obrigatórios de larvas de abelhas (*Apis mellifera*). A doença da abelha do mel é causada pelo fungo *Ascosphaera apis* (GEISER et al., 2006).

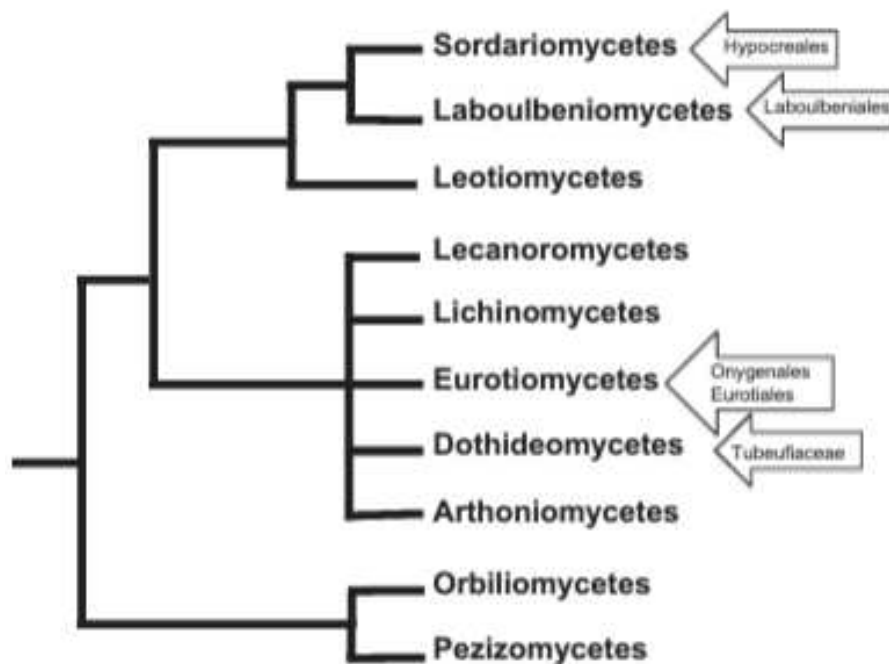


Figura 3. Em torno das 55 ordens se colocam as 10 classes de Ascomycetes subphylum Pezizomycotina. As classes e ordens que contém os entomopatógenos se indicam mediante as flechas. Por exemplo, os Sordariomycetes têm em torno de 13 ordens, um deles é Hypocreales, a ordem com o maior número de espécies entomopatógenas. Alguns membros da Pezizomycotina permanecem sem classificação. Fonte: SCHOCH et al., 2009.

Os Laboulbeniomyces (Figura 3) são um interessante grupo de parasitos de insetos, embora eles não sejam geralmente considerados agentes patogênicos. As 2.000 espécies conhecidas da ordem Laboulbeniales são ectoparasitas haustorial obrigatórios de insetos e alguns outros artrópodes (WEIR & BLACKWELL, 2005). Os ascósporos com duas células germinam na superfície do hospedeiro para produzir um haustório a partir de uma célula ligada e o exterior da célula se divide para produzir um peritécio com determinado crescimento. Nenhum micélio é produzido e a falta de um estado assexuado na ordem é única entre Ascomycetes. Os besouros e moscas são os principais hospedeiros para os membros do Laboulbeniales. A segunda ordem, Pyxidiophorales, parece ser principalmente micoparasíticas, e também está associada com hospedeiros artrópodes. Estes fungos são miceliais e geralmente têm estados assexuados proeminentes que precedem o desenvolvimento do estado sexual. Os insetos e seus associados são ácaros e são dispersores efetivos do Pyxidiophorales (WEIR & BLACKWELL, 2005).

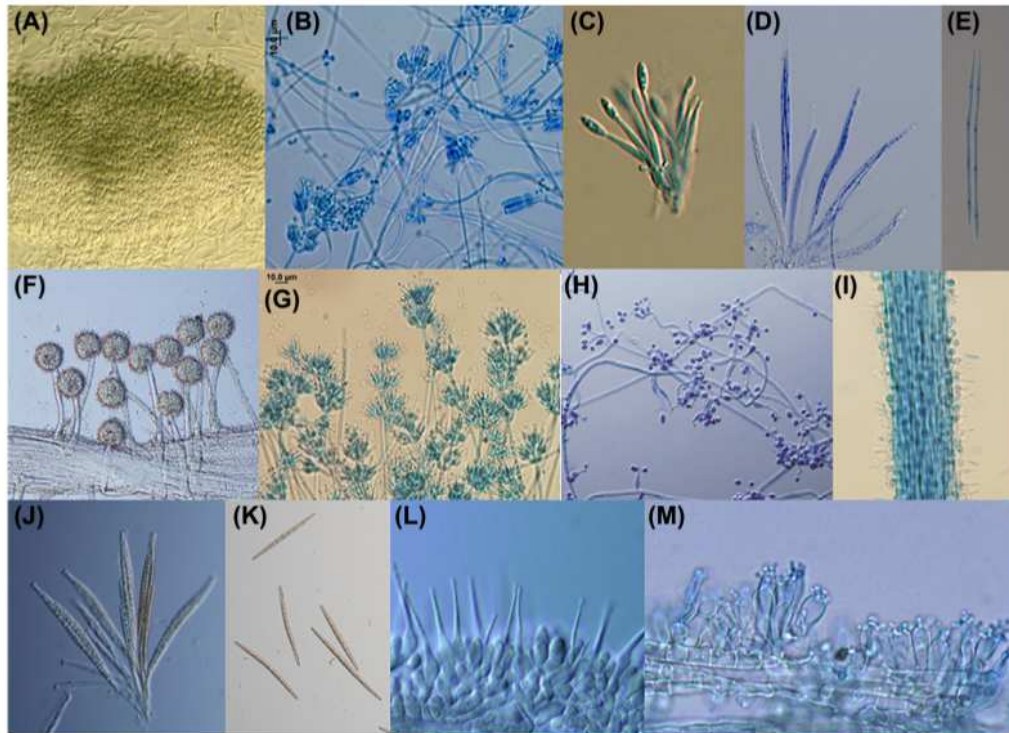


Figura 4. Características microscópicas comumente usadas na identificação de entomopatógenos. A-C, F-I, L e M, são estruturas de estados assexuadas (anamorfos). Outras figuras de ascos e ascósporos são de estados sexuais (Teleomorfo). (A) fiálides de *Metarhizium anisopliae*. (B) Conidióforo e conídios de *Metarhizium cylindrospora*. (C) Células conidiógenas e conídios de *Aschersonia coffeae*. (D) Desenvolvendo do ascó maduro de *Hypocrella calendulina*. (E) Ascósporo inteiro de *H. calendulina*. (F) Conidióforos de *Gibellula pulchra*. (G) Conidióforos de *Isaria* sp. (H) Estruturas conidiógenas de *Beauveria* sp. (I) Synnema de *Akanthomyces* sp. (J) Ascó de *Ophiocordyceps communis*. (K) Ascósporos de *O. communis*. (L) Células conidiógenas de *Hirsutella* sp. (M) Células conidiógenas de *Hymenostilbe ventricosa*. [Créditos das fotos: (A, B, G, H, J, K, M) J. Jennifer Luangsaard; (C-E) S. Mongkolsamrit; (F, I, L) K. Tasanathai]. Fonte: VEGA et al., 2012.

Os Hypocreales, membros da Classe dos Sordariomycetes, são os entomopatógenos mais conhecidos entre os Ascomycetes (Figura 3). A ex-Clavicipitaceae foi dividido em três famílias monofiléticas: Clavicipitaceae, Cordycipitaceae e Ophiocordycipitaceae. A família Clavicipitaceae (Figura 5) inclui, entre outros, um número de endófitos grama (*Balansia*, *Claviceps*, *Epichloe*), e os bens conhecidos entomopatógenos *Aschersonia*, *Hypocrella*, *Regiocrella* e *Metarhizium*. Um novo gênero, *Metacordyceps*, inclui a primeira espécie *Cordyceps* relacionada aos endófitos grama bem como anamorfos e teleomorfos relacionados com *Metarhizium* (SUNG et al., 2007).

A família Cordycipitaceae (Figura 6) contém o gênero *C. militaris*, e inclui a maioria das antigas espécies *Cordyceps* caracterizadas por cores vivas e estroma carnudo. Os entomopatógenos com estados assexuados incluem espécies de *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicillium* e outros gêneros. A maioria dos membros Ophiocordycipitaceae (Figura 7) pode ser distinguida morfológicamente a partir dos outros subfilos porque muitas vezes têm estroma escuro e ascósporos maduros. Além das espécies de *Ophiocordyceps*. O gênero *Elaphocordyceps* parasita não só insetos, mas também *Elaphomyces* é um simbiote ascomicete micorrízico de árvores. Outras espécies não identificadas na família são incomuns porque eles são simbiotes leveduriformes obrigatórios de cigarras (SUH et al., 2001). A preferência não é específica para uma família ou gênero, embora haja exceções. No entanto, patógenos de aranhas

são encontrados principalmente dentro da Cordycipitaceae, enquanto entomopatógenos de cochonilhas são comuns na Clavicipitaceae. Os patógenos de formigas, cupins ou dípteros e endosimbiontes de cigarras são frequentemente encontrados na família Ophiocordycipitaceae (SUNG et al., 2007).

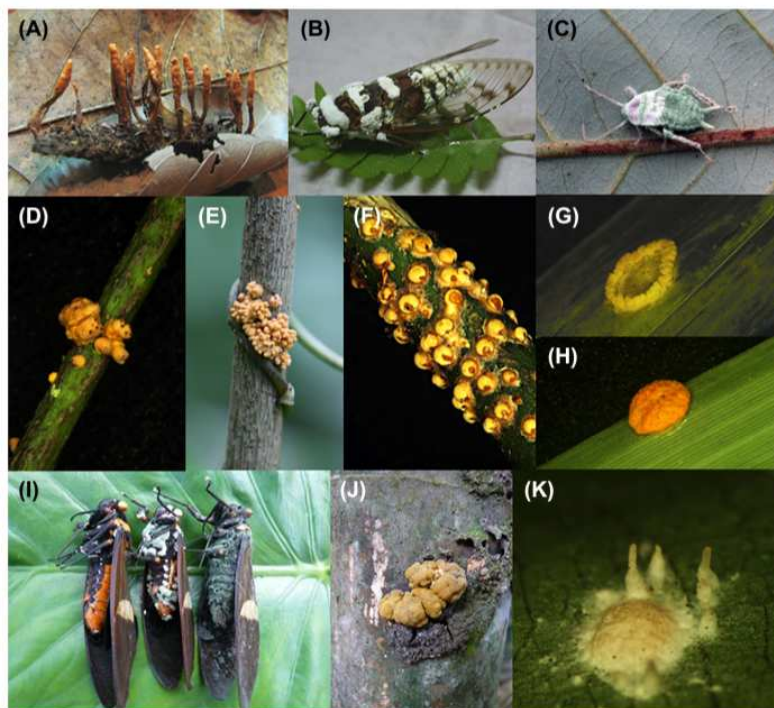


Figura 5. Família Clavicipitaceae. B, C, E, F e I são estados assexuados (anamorfos). Outras figuras são de estados sexuais (teleomorfos). (A) *Cordyceps aff. martialis* sobre larva Lepidóptera. (B) *Metarhizium flavoviride* em cigarra. (C) *Metarhizium* sp. sobre barata; D-H e J-K em cochonilhas. (D) *Moelleriella reineckiana*. (E) *Aschersonia marginata*. (F) *Aschersonia coffeae*. (L) *Orbiocrella petchii*. (H) *Hypocrella calendulina*. (I) Diferentes estágios de colonização de uma cigarra por *Metarhizium cylindrospora*. (J) *Hypocrella* sp. (K) *Conoideocrella tenuis*. [Créditos pelas fotos: (A-C, I) R. Ridkaew; (D-H, J, K) S. Mongkolsamrit]. Fonte: VEGA et al., 2012.

2.2.5 Filo Basidiomycota

Os Basidiomycetes muitas vezes estão intimamente associados com insetos como seu único recurso nutricional e como um habitat, e muitos insetos fertilizam e dispersam esses fungos. As associações com insetos ocorrem nos três subfilos de Basidiomycetes (Pucciniomycotina, Ustilaginomycotina e Agaricomycotina), mas as parasitas são encontradas apenas no Septobasidiales dos Pucciniomycetes, um grupo que inclui as ferrugens, fungos fitopatogênicos de plantas (AIME et al., 2006). O gênero *Septobasidium* e quatro gêneros adicionais, *Auriculoscypha*, *Uredinella*, *Coccidioidictyon* e *Ordonia*, são parasitas específicas de cochonilhas (HENK & VILGALYS, 2007), que raramente matam seus hospedeiros, mas usá-los como fornecedores de nutrientes, mantendo-os vivos (HUMBER, 2008).

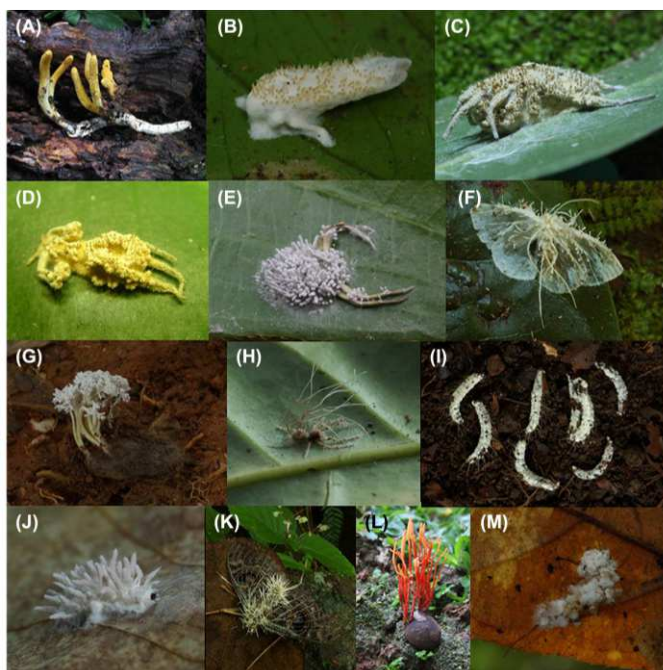


Figura 6. Família Cordycipitaceae. E-k, e M são estados assexuados (anamorfos). Outras figuras são de estados sexuais (teleomorfos). (A) *Cordyceps bassiana* em larvas de Coleópteros. (B) *Torribiella hemipterigena* em cigarra. (C-E, H, J) sobre aranhas. (C) *Torribiella aff. neofusiformis*. (D) *Torribiella aff. corniformis* (E) *Akanthomyces koratensis*. (F) *Akanthomyces aculeatus*. (G) *Isaria tenuipes*. (H) *Akanthomyces araneorum*. (I) *Beauveria bassiana*. (J) *Gibellula pulchra*. (K) *Akanthomyces pistillariiformis* sobre mariposa adulta. (L) *Cordyceps ninchukispora* em pupa de *Lepidópteros*. (M) *Isaria farinosa* em larvas de *Lepidopteros*. [Créditos pelas fotos: (A, B, F-I, K, M) P. Aphiphunya; (C) R. Ridkaew; (D, J) K. Tasanathai; (E) T. Chohmee; (G) P. Srikitikulchai]. Fonte: VEGA et al., 2012.

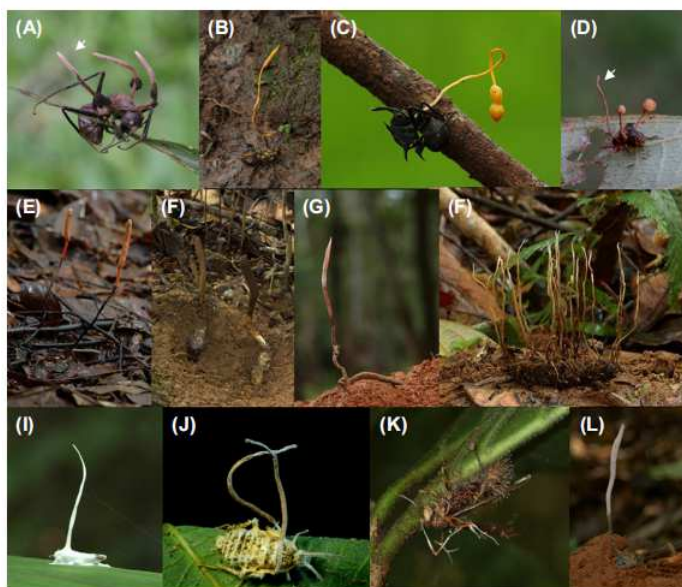


Figura 7. Família Ophiocordycipitaceae, G, I, K e L, são estados assexuais (anamorfo). Outras figuras são estados sexuais (Teleomorfo). (A) *Ophiocordyceps halabalaensis* em *Camponatus gigas*; a seta indica o estroma com as estruturas conidiógenas anamórficas e a conidia são de *Hirsutella* anamórfica. (B) *Ophiocordyceps sphecocephala* em vespa. (C) *Ophiocordyceps mymecophila* em formiga. (D) *Ophiocordyceps dipterigena*; a seta indica *Hymenostilbe* anamorfo. (E) *Ophiocordyceps nutans* em percevejo. (F) *Elaphocordyceps paradoxa* em ninfa de cigarra. (G) *Hymenostilbe* estados de *O. brunneipunctata*. (H) *O. acicularis* em larvas de lepidóptera. (I) *Hirsutella nivea* em saltador. (J) *Ophiocordyceps blattae* em barata. (K) *Hirsutella saussurei* em vespa. (L) *Paecilomyces lilacinus*. Créditos pela foto: (A) R. Ridkaew; (B, C, E-I, K, L) P. Aphiphunya (D) P. Srikitikulchai; (J) J. punya. Fonte: VEGA et al., 2012.

2.3 Principais Fungos Entomopatogênicos do filo Ascomycota

2.3.1 *Beauveria* spp. Vuillemin

[Sordariomycetes: Hypocreales: Cordycipitaceae]

As espécies do gênero *Beauveria* são cosmopolitas; podem ser encontradas naturalmente infectando mais de >700 espécies de insetos (INGLIS et al., 2001). *Beauveria* ocorre naturalmente em algumas plantas e no solo. As epizootias são favorecidas por climas quentes e úmidos. *Beauveria* spp. é utilizado como um bioinseticida microbiano em alguns países. Em 1912 Vuillemin descreveu formalmente o gênero *Beauveria* nomeado pela primeira vez como *Botrytis* e é 1914, quando J. Beauverie a reconhece como *Beauveria* ou doença da muscardine branca, cuja reprodução assexuada é por meio de conídios. O termo “muscardine” foi aplicado a *Beauveria bassiana*. Foi a primeira doença de insetos de origem fúngica que mostrou a patogenicidade do fungo infetando o bicho da seda. *Beauveria bassiana* ocorre em todo o mundo e tem uma das maiores listas de hospedeiros entre os fungos imperfeitos. Os hospedeiros estão entre as ordens Lepidóptera, Coleóptera, Hemíptera, Díptera e Himenóptera (MARANHÃO, et al., 2009).

O gênero *Beauveria* é composto por várias espécies: *B. bassiana*, *B. brongniartii* ou *B. tenella*, *B. amorpha*, *B. velata*, *B. Globulifera* e *B. Densa*, porém a mais frequentemente estudadas são *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *B. brongniartii* (De Lacroix) Siemszko (DOMSCH & GAMNS, 1980; BUSTILLO, 2001).

O gênero é caracterizado por um micélio branco no exoesqueleto do hospedeiro, conidióforos simples, irregularmente aglomerados ou grupos verticilados, em algumas espécies inchados na base e afinando na parte de formação de conídios ou com extensão apical denticulada, que é apresentado em um zig-zag, os conídios são hialinos e asseptados, arredondados a ovoides e unicelulares (BUSTILLO 2001; SAMSON et al., 1988; REHNER & BUCKLEY, 2005). A fase teleomorfo é: *Cordyceps* (HUMBER, 2012).

2.3.2 *Metarhizium* spp. Sorokin

[Sordariomycetes: Hypocreales: Clavicipitaceae]

Este patógeno ataca naturalmente mais de 300 espécies de insetos de diferentes ordens destacando Coleóptera, Díptera, Himenóptera, Lepidóptera e Homóptera (TANADA & KAYA, 1993; ALVES et al., 1998; FRANCE et al., 1999; RODRÍGUEZ et al., 2002). Algumas pragas que são afetadas por este fungo são a cigarrinha da cana-de-açúcar (*Aeneolamia varia*) e percevejos de diversas culturas (MONZÓN, 2001). Este gênero apresenta um micélio que cobre totalmente os hospedeiros afetados; os conidióforos aparecem em manchas compactas ou individuais, as células conidiogênicas geralmente têm um ápice arredondado a cônico, densamente ramificado ou densamente entrelaçado; os conídios são asseptados, cilíndricos ou ovoides formando cadeias, podem ser hialinos ou pigmentados de verde oliva (HUMBER, 1998, DOMSCH & GAMS, 1980). A fase teleomorfo é: *Metacordyceps* (HUMBER, 2012).

As infecções de *Metarhizium* nas espécies de artrópodes são facilmente reconhecidas alguns dias após a morte, quando o fungo cresce no tegumento e forma estruturas reprodutivas.

Inicialmente, só são observadas hifas que aparecem em branco, mas quando os conídios maduram adquirem uma cor verde oliva característica. No entanto, dependendo da espécie e da estirpe de *Metarhizium* os esporos de podem variarem na cor de branco a amarelo, marrom e verde (TANADA & KAYA, 1993). As espécies *Metarhizium* são comumente consideradas como saprófitas do solo e mais frequentemente encontradas em habitats perturbados como em campos agrícolas, comparado com os ecossistemas florestais (MEYLING & EILENBERG, 2007). Além disso, resultados recentes sugerem que esses fungos podem formar associações com as raízes das plantas (HU & ST. LEGER, 2002).

As principais espécies deste gênero são: *M. anisopliae* (Metschn) Sorokin; *M. flavoviride* Gams & Rozypal; *M. álbum* (Petch); *M. pingshaeme* Chem & Giro; *M. guizhousense* Chem & Giro, e *M. taii* Liang & Liu (LIANG et al., 1995). A espécie *M. anisopliae* foi classificada em duas variedades sobre a base do tamanho dos conídios; *M. anisopliae* var. *anisopliae* (conídios pequenos 3,5-9 µm) e *M. anisopliae* var. *majus* (conídios longos 9-18 µm) (TULLOCH, 1976; SAMSON et al., 1988). Recentemente, através de estudos baseados em técnicas moleculares, novas variedades da espécie *M. anisopliae* foram sugeridas: *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, *M. anisopliae* var. *acridium*, *M. anisopliae* var. *majus* e *M. anisopliae* var. *dcjhyium* (DRIVER et al., 2000; DONG et al., 2007).

A muscardine verde é causada por *Metarhizium anisopliae*. Este fungo foi isolado pelo pesquisador russo Metchnikoff (1879) a partir do besouro *Anisoplia austriaca* (Coleóptera: Scarabaeidae), quem sugere a sua utilização como um agente microbiano contra pragas de insetos (TANADA & KAYA 1993; ZIMMERMANN, 1993).

2.3.3 *Isaria* spp. Persoon (Paecilomyces spp. Bainier) [Sordariomycetes: Hypocreales: Cordycipitaceae]

Este gênero é normalmente encontrado na natureza numa grande variedade de hospedeiros, principalmente em larvas de lepidópteros. Sua infecção é conhecida como muscardine amarela. Algumas espécies deste gênero são: *P. fumosoroseus*, *P. Farinosus*, *P. amoeneroroseu*, *P. Javanicus*, *P. ramosus*, *P. coleopterorum*, *P. tenuipes*, *P. cicadae*, *P. lilacinus*, *P. marquandii* e *P. Cinnamoneus* (SAMSON et al., 1988; HUMBER, 2012).

O gênero *Paecilomyces* apresenta colônias de cor lilás, rosa, marrom e cinza, dependendo da espécie, com um micélio irregular; em sua microscopia as hifas são hialinas a amareladas, septadas e de paredes finas. Apresentam ramificações verticiladas ou irregularmente ramificadas, tendo em sua parte terminal em cada rama grupos de fiálides, que também podem ser solitárias. As fiálides consistem de uma porção basal cilíndrica ou inchada, afinando abruptamente para formar muitas vezes um pescoço muito perceptível. Os conidióforos levam cadeias de conídios, hialinos, unicelulares e ovoides (DOMSCH & GAMS, 1980; BUSTILLO, 2001; HUMBER, 2012). As infecções causadas por *P. fumosoroseus* são reconhecidos pelo rosa pálido, enquanto em *P. lilacinus* são roxo claro. A espécie mais importante é *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith (BUSTILLO, 2001). As fases teleomorfas são: *Cordyceps* ou *Torrubiella*.

2.3.4 *Verticillium* spp. Nees (Gams & Zare *Lecanicillium* spp.; W. Gams & Zare *Simplicillium* spp.; e Batista & O.M. Fonseca *Pochonia* spp.)

[Sordariomycetes: Hypocreales: Cordycipitaceae- *Lecanicillium*, *Simplicillium*; Clavicipitaceae- *Pochonia*]

No ano de 1898, na ilha de Java Zimmerman descobriu o fungo chamado *Cephalosporium lecanii*, no entanto, até o ano de 1939, o mesmo fungo foi relatado como *Verticillium lecanii* por Viegas, que se referiu ao halo branco característico formado por ele sobre o inseto *Coccus viridis* (Green) (SAMSON & ROMBACH, 1985). O fungo entomopatogênico *V. lecanii* é amplamente distribuído e pode causar epizootias em larga escala em regiões de climas tropicais e subtropicais e em ambientes quentes e úmidos (GARCÍA, 1996). As condições favoráveis para o fungo são temperaturas entre 20-25 °C e umidade alta (HARPER & HAUNG, 1986). Existem inúmeros relatos em que se discute a ação de *V. lecanii* na mosca branca (*Trialeurodes vaporariorum*). Numa delas Fransen (1990), diz que esse fungo infeta as ninfas e adultos do inseto, mas não seus ovos.

Os conidióforos das espécies de *Verticillium* são pouco diferenciados das hifas vegetativas, as células conidiógenas (fiálides) estão na forma de verticilos de dois a seis, em pares ou solitários sobre hifas, ou apicalmente sobre curtas ramificações (SAMSON & ROMBACH, 1985). Os conídios são hialinos, asseptados, cilíndricos ou elipsoidais, arredondados nas extremidades. Estes conídios nascem em forma de gotas filamentosas ou cadeias (SANSÃO & ROMBACH, 1985). Os clamidósporos (em *Pochonia*) são multicelulares, globosos, de paredes espessas, principalmente em ramos laterais curtos. As fases teleomorfas são: *Cordyceps*, *Torrubiella* para entomopatógenos (HUMBER, 2012).

As espécies mais importantes deste gênero são: *L. nigrescens*, *L. dahliae*, *L. nuvilum*, *L. alboatrum* e *L. tricorpus* (DOMS & GAMS 1980).

2.3.5 *Nomurea* spp. Maublanc

[Sordariomycetes: Hypocreales]

As espécies apresentam um micélio septado, branco, com supercrescimento flocculante, escasso na cultura a denso em insetos (cobrindo completamente o hospedeiro), normalmente tornando-se roxo-cinza a violeta; conidióforos únicos (raramente) ou em sinemas (sinemas, com uma base estéril), ereto, tendo verticilos curtos, com grupos de fiálides curtas sobre métulas; células conidiógenas curtas, com ápices contundentes e pouco ou nenhum pescoço distinto; conídios asseptados, liso, redondo ao ovoide ou alongado e ligeiramente curvado, cadeias divergente, pálido ao verde escuro, roxo-cinza ao roxo, ou (raramente) branco em massa. A fase teleomorfo é: *Metacordyceps*, *Ophiocordyceps*. Nos hospedeiros: lepidópteros e aranhas (HUMBER, 2012).

A espécie mais comum, *N. rileyi*, é um agente patogênico clavicipitaceo que afeta uma ampla gama de hospedeiros de lepidópteros em todo o mundo, e pode exercer controle natural significativo sobre esses insetos. O Ophiocordycipitaceo (*N. atypicola*) patógeno de aranhas, é muito menos comum. *Nomurea rileyi* (Farlow) Samson (Clavicipitaceae) patógeno da família Noctuidae (especialmente larvas); forma uma massa de conídios (verde-cinza), cobrindo o

hospedeiro; os conídios são ovoides e em cadeias curtas. *Nomurea atypicola* Yasuda (Ophiocordycipitaceae); tem conídios cinza ao roxo (HUMBER, 2012).

2.4 O processo de infecção

Os fungos patógenos de insetos têm que cumprir vários desafios para produzir suficientemente novos esporos infecciosos em cada geração para manter as populações viáveis. Em primeiro lugar, a transmissão frequentemente requer a liberação de um número de esporos em massa ou superfícies de esporos pegajosas ou substâncias que maximizam a adesão de outras maneiras (VEGA et al., 2012). Em segundo lugar, os esporos germinam e deve iniciar a penetração do exoesqueleto do inseto de forma relativamente rápida ou sobreviver após uma ingestão oral (*Ascospaera*) (COLE & HOCH, 1991; VEGA et al., 2012). Terceiro, as células fúngicas devem proliferar dentro do hemocelo, músculos ou outros tecidos do hospedeiro para que o sistema imunitário do hospedeiro entre em colapso de forma que o hospedeiro morra depois (VEGA et al., 2012). Em quarto lugar, o fungo deve gerenciar o cadáver para otimizar a produção de esporos e dispersão em condições ambientais prevalentes (Figura 8) (ROY et al., 2006). Assim, os fungos entomopatogênicos apresentam várias fases no desenvolvimento de infecções fúngicas:

2.4.1 Adesão dos esporos na cutícula do hospedeiro e germinação de esporos.

A inoculação ocorre por contato direto entre cadáveres infecciosos e hospedeiros suscetíveis, ou indiretamente através de esporos no ar ou esporos depositados sobre a vegetação ou partículas de solo (HESKETH et al., 2010). Experimentos de infecções em laboratório mostram que um número mínimo de esporos é geralmente necessário para conseguir infecções previsíveis (INGLIS et al., 2012).

Os fungos são organismos heterotróficos, porém têm que absorver os compostos orgânicos produzidos por outros organismos como suas fontes primárias de energia. O primeiro passo para a infecção é a união dos propágulos fúngicos a cutícula do hospedeiro. Esta ligação envolve mecanismos não específicos de adesão controlados pelas propriedades hidrofóbicas da parede celular dos conídios (BOUCIAS et al., 1988). O processo refere-se à interação entre as proteínas (hidrofobinas) localizadas nos conídios e a superfície hidrofoba do exoesqueleto dos insetos susceptíveis (FANG et al., 2005).

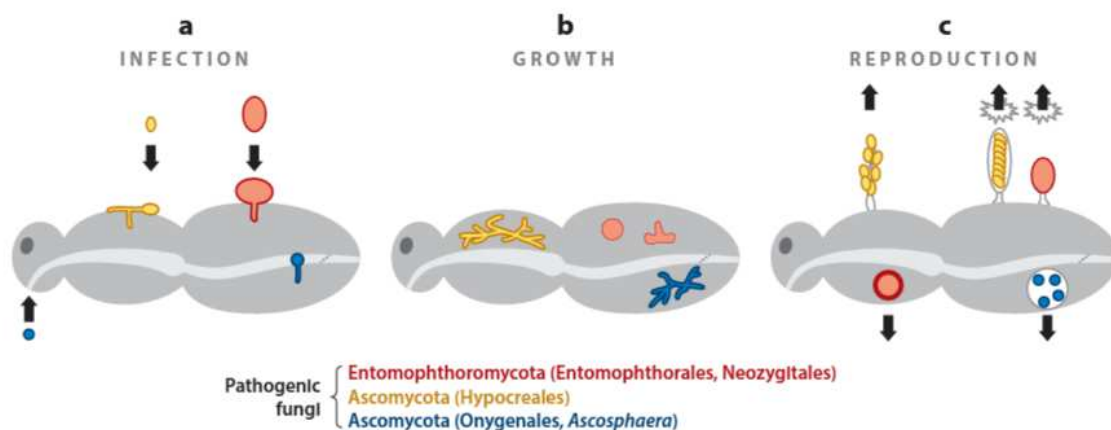


Figura 8. O diagrama ilustra as formas em que os fungos patogênicos infectam os hospedeiros artrópodes por esporos assexuais ou sexuais, proliferam e se dispersam. (a) Infecção: os fungos Entomophthorales infectam principalmente por conídios pegajosos e penetram a cutícula diretamente, e fungos Hypocreales infectam por conídios, que produzem estruturas apressoriais. Esporos de *Ascospaera* são pequenos, entram por via oral e infectam através do epitélio intestinal. (b) Crescimento: a maioria de Hypocreales e Onygenales proliferam através do crescimento de hifas, e fungos Entomophthorales proliferam através de protoplastos. (c) Reprodução: esporos assexuados de fungos Entomophthorales e ascósporos sexuais de Hypocreales são principalmente disseminados por pressão a partir da superfície dos cadáveres (flechas para cima à direita), enquanto que esporos sexuais dos fungos Entomophthorales e conídios assexuais de Hypocreales são liberados de forma passiva (flechas para cima e para abaixo à esquerda). *Ascospaera* produz apenas esporos sexuais que são liberados de forma passiva (flecha para baixo à direita). Fonte: BOOMSMA et al., 2014.

Em alguns táxons de Hypocreales como *Beauveria*, *Metarhizium* e *Paecilomyces* as propriedades hidrofóbicas dos conídios são devidas à presença na parede celular de proteínas ricas em cisteína chamadas hidrofobinas. Em contraste, *Verticillium lecanii* possui conídios hidrofílicos (INGLIS et al., 2001). Este processo ocorre em três fases sucessivas: (1) adsorção dos esporos à superfície através do reconhecimento de receptores específicos de natureza glicoprotéica no inseto, (2) a adesão ou a consolidação da interface entre o esporo pré-germinado e a epicutícula e finalmente, (3) a germinação e desenvolvimento até a formação de apressórios para iniciar a fase de penetração (TELLEZ et al., 2009). Os esporos de Entomophthorales tem um revestimento mucilaginoso disponível dentro das duas camadas da parede celular que é liberado no momento do impacto com um substrato, resultando na adesão (EILENBERG et al., 1986). Além disso, nos Entomophthorales se produzem esporos que são evolutivamente derivados de esporângios. Os esporos de muitos fungos Entomophthorales são liberados por pressão (PAPIEROK & HAJEK, 1997).

Alguns táxons, por exemplo, espécies de *Neozygites* e *Zoophthora* também produzem uma capilioconidia alongada que se desenvolve ao final em capiliconidioforos delgados. Esses propágulos se tornam facilmente removíveis quando é tocado por um inseto e adere-se a cutícula por uma gota de adesivo que exsuda da ponta do capiliconidio. Holder & Keyhani (2005), analisaram a adesão de conídios aéreos, conídios submersos e blastosporos de *B. bassiana* em superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas seus resultados mostram que: (1) os conídios aéreos se ligam bem a superfícies hidrofóbicas, mas fracamente a superfícies hidrofílicas; (2) os conídios submersos se ligam a ambas superfícies hidrofóbica e hidrofílica; e (3) os blastosporos se ligaram fortemente a superfícies hidrofílicas e fracamente a superfícies hidrofóbicas.

O processo de adesão do esporo a cutícula do inseto, é mediada pela presença de moléculas sintetizadas pelo fungo denominadas adesinas. Em *Metharizium anisopliae* se descreveu um tipo de adesina conhecida como MAD1, que está localizada na superfície dos conídios. A diferença da proteína adesina MAD2 em *M. anisopliae* envolvida com a aderência a superfícies das plantas, e também parece estar relacionada com a competência na rizosfera (PAVA-RIPOLL et al., 2011). O rompimento do gene que codifica para MAD1 afeta a germinação e a formação de blastosporos, reduzindo significativamente a virulência do fungo (WANG & ST. LEGER, 2007). Além disso, demonstrou-se que os íons divalentes tais como Ca^{2+} e Mg^{2+} reduzem as forças de repulsão eletrostáticas que promovem a adesão de esporos (PUCHETA et al., 2006).

A germinação ocorre quando o conídio encontra condições favoráveis de umidade, temperatura, fatores físicos e químicos e exigências nutricionais na cutícula podendo produzir estruturas de penetração como tubos germinativos e apressórios ou uma substância mucilagínosa que prende para iniciar a formação do tubo germinativo que penetra através dos poros ou as camadas mais externas da epicutícula (SHAH & PELL, 2003). Embora esta estrutura pode estar ausente em alguns táxons como *Beauveria* e *Nomurea*, o tubo germinativo penetra através de aberturas naturais, também alguns Entomophthorales (*Conidiolobus obscurus*, *Pandora neoaphidis*, *P. blunckii*, *Entomophthora planchoniana* e *Batkoa apiculata*) não formam apressórios e penetram a cutícula diretamente a partir do tubo germinativo (HAJEK & DELALIBERA, 2010). No caso de *Beauveria bassiana*, para a germinação de conídios, o fungo necessita de uma fonte exógena de carbono como a quitina e, a um nível inferior, certos ácidos graxos. Além disso, os lipídeos epicuticulares dos insetos podem ser importantes para a ligação do fungo com a cutícula do hospedeiro (FERRON, 1985).

De acordo com Lecuona et al. (1997), indicaram dois possíveis papéis dos lipídios epicuticulares dos insetos e sua relação com os fungos entomopatogênicos: a primeira seria fazer pouco acessíveis as fontes de energia para a germinação de conídios e a segunda poderia ser uma atividade antifúngica específica podendo inibir o crescimento das hifas. Recentemente, foi associada à degradação dos lipídios na camada externa como uma fase de crescimento prévio à penetração do fungo (BEYS DA SILVA et al., 2010). Foi ainda sugerida a posterior síntese de enzimas hidrolíticas (proteases, lipases e quitinases, entre outros) que degradam a cutícula e liberam nutrientes para o fungo (FRANCO et al., 2011).

2.4.2 Penetração no hemocele.

Para que a infecção seja um sucesso o fungo entomopatogênico deve penetrar a cutícula do inseto, composta de uma rede de polímeros de quitina (polissacarídeo) incorporada numa matriz de proteína (até 70%) (VEGA et al., 2012). A cutícula está dividida em três secções (Figura 9) (LOCKE, 2001; KLOWDEN, 2007). A camada mais externa é chamada envelope (também conhecida como camada cuticular) e é de 10-30 nm de espessura. Debaxo do envelope é a epicutícula (0,5-2 nm de espessura), seguido pela procutícula (maior do que o envelope e a epicutícula), que é onde a quitina e as proteínas formam uma matriz. A procutícula pode ainda ser dividida em uma camada interior chamada endocutícula (10-200 nm de espessura), e uma camada exterior conhecida como o exocutícula. As proteínas cuticulares

podem variar de acordo com as áreas anatômicas do inseto, bem como com o estágio de desenvolvimento do inseto (WILLIS et al., 2005). As células da epiderme são encontradas na base da procutícula e o hemocelo está por baixo das células epidérmicas. A cutícula deve ser rompida por pressão mecânica (ZACHARUK, 1970) e através da produção de enzimas degradadoras de cutícula para que o fungo possa obter a nutrição e colonizar o inseto (VEGA et al., 2012).

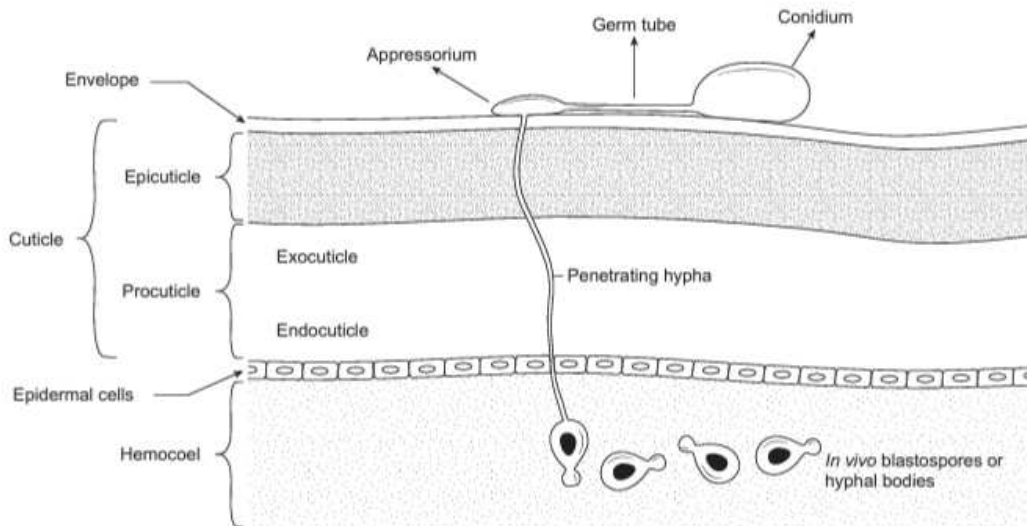


Figura 9. Modelo genérico que mostra o processo de infecção por fungos entomopatogênicos. Conídios sobre a cutícula do inseto, onde germina e forma um tubo germinativo e um apressório. A hifa penetra e rompe as camadas da cutícula, atingindo o hemocelo onde são formados blastosporos e corpos hifais. O crescimento fúngico continua e se move ao longo do hemocelo, invadindo órgãos, interrompendo processos metabólicos, e, possivelmente, produzindo metabolitos tóxicos, e causando a morte. Fonte: VEGA et al., 2012.

A maneira na qual os fungos entomopatogênicos penetram no inseto depende das propriedades da cutícula, tais como a espessura, a esclerotização e a presença de substâncias antifúngicas e nutricionais (CHARNLEY, 2003). Uma vez estabelecido o processo de adesão, contínua a penetração que é possível graças à ação combinada de dois mecanismos, um físico e um químico, o primeiro é a pressão exercida por uma estrutura do fungo chamada haustório, que distorce a primeira camada cuticular e, em seguida, rompe as áreas esclerosadas e membranosas da cutícula. O mecanismo químico envolve a ação enzimática, principalmente de atividades hidrolíticas, tais como proteases, lipases e quitinases que degradam o tecido na área de penetração, facilitando a entrada do fungo (MONZON, 2001). Estudos in vitro indicam que a digestão do tegumento segue uma sequência de lipase - protease- quitinase (TANADA & KAYA, 1993). A ação da enzima pode ser co-ajudado pela secreção de ácidos orgânicos tais como ácido oxálico (KHACHATOURIANS, 1991).

A protease PR1 é considerada um fator de virulência importante em *Metarhizium anisopliae*, a sobre-expressão desta enzima no mesmo fungo reduz um 25% o tempo de morte em *Manduca sexta*, em comparação com aqueles que foram infectados com o genótipo de tipo selvagem (ST. LEGER et al., 1996). Da mesma forma a sobre-expressão do gene que codifica para quitinase de *Beauveria bassiana* acelera o processo de morte nos insetos em um 23% (FAN et al., 2007). Assim, podemos demonstrar a importância da secreção destas enzimas hidrolíticas

na virulência dos fungos entomopatogênicos, o que poderia ser uma ferramenta para a seleção das melhores estirpes para a formulação de inseticidas biológicos.

Outro mecanismo utilizado pelo fungo para penetrar no hemocele é através da cavidade oral, espiráculos e outras aberturas externas do inseto. Já que a umidade não é um problema no trato digestivo, os esporos podem germinar rapidamente neste ambiente; apesar de que fluidos digestivos podem destruir ou degradar as hifas de germinação. Em alguns casos, a digestão de estruturas fúngicas pode causar a morte devido a toxicidade em vez da micose (CHARNLEY, 1992).

2.4.3 Replicação no hemocele.

Depois de atingir o hemocele, a maioria dos fungos realiza transição dimórfica de micélio a levedura (Entomophthorales), em outros termos muitas vezes prescindem da formação de parede celular e se desenvolvem em protoplastos (blastosporos), evitando o reconhecimento por hemócitos circulantes no hemocele (VINSON, 1991).

As vantagens desta forma celular são o aumento das taxas de aquisição de nutrientes, além de que as células fúngicas podem-se multiplicar no hemocele, sem ser detectadas pelo sistema imunológico do inseto que utiliza epítipos de parede celular como detectores. Uma vez que evadem o sistema imunológico do inseto, ocorre uma septicemia (EILENBERG & MICHELSEN, 1999).

O inseto pode responder à infecção por mecanismos humorais (fenoloxidasas, lectinas, proteínas e peptídeos de defesa), celulares (fagocitose, encapsulamento) ou ambos. No entanto, os blastosporos de algumas espécies como *Nomurea rileyi* aparentemente não são fagocitadas por hemócitos de insetos, talvez devido à falta de resíduos específicos na superfície o que torna irreconhecível pelas lectinas humorais (BOUCIAS & PENDLAND, 1998). Quando os nutrientes provenientes do inseto, especialmente fontes de nitrogênio estão esgotados, as fases leveduriformes retomam seu crescimento micelial, como observado em *Entomophthora thripidum* (FREIMOSER et al., 2003).

A infecção fúngica induz sintomas fisiológicos anormais no inseto, como convulsões, falta de coordenação, comportamento alterado e paralisia. A morte ocorre por uma combinação de efeitos que incluem danos físicos aos tecidos, toxicidade, desidratação das células por meio da perda de fluidos e consumo de nutrientes (BUSTILLO, 2001). Uma vez dentro do inseto, os fungos têm que lidar com os mecanismos de resposta do sistema imune para a qual se desenvolveram estratégias defensivas e imunossupressoras, como a produção de proteases que degradam o sistema imune humoral, produção de depsi-peptídeos cíclicos como as destruxinas que causam paralisia ao inseto pela sua capacidade de abrir os canais de cálcio, assim como outras toxinas que danificam o sistema muscular e túbulos de Malpighi, afetando a excreção e dificultando sua capacidade de alimentar-se e mover-se ou também por alterações estruturais na parede celular (PAL et al., 2007).

Existe um considerável número de metabólitos secundários com baixo peso molecular que têm sido isolados a partir de patógenos de insetos, muitos dos quais demonstraram atividade inseticida marginal (GILLESPIE & CLAYDON, 1989). Embora menos estudadas, também foram observadas que as diferentes macromoléculas de natureza proteicas têm efeito inseticida

notável como as proteínas melanizantes de *B. bassiana* (FUGUET & VEY, 2004; FUGUET et al., 2004), uma glicoproteína de *B. sulfurescens* (MOLLIER et al., 1994) e a hirsutellina A, isolada de *Hirsutella thompsonii* (WEI-ZHEN, et al., 1995). Os metabólitos inseticidas produzidos por fungos têm vários modos de ação e em muitos casos são muitas vezes a causa direta da morte do inseto, agindo sobre as células especializadas do sistema imunológico para evitar o ataque a estruturas fúngicas invasivas (TÉLLEZ et al., 2009). As toxinas produzidas por fungos entomopatogênicos podem ser macromoléculas protéicas ou moléculas de tamanho médio a pequeno com baixo peso molecular (VEY et al., 2001). Entre as toxinas produzidas por *M. anisopliae* se destaca as destruxinas como as mais estudadas, pelo seu modo de ação que é a inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas nas células de insetos (PUCHETA et al., 2006).

Finalmente, quando as condições de temperatura e umidade são favoráveis, as hifas conseguem atravessar o tegumento do inseto ocorrendo à emergência do fungo em direção ao exterior. Geralmente a emergência ocorre pelas regiões menos esclerosadas do tegumento, como a membrana intersegmentar ou espiráculos, mas isso depende do hospedeiro e estágio de desenvolvimento. Uma vez que as hifas atravessam o tegumento podem permanecer na fase vegetativa e começar o processo de esporulação (fase reprodutiva) dentro de 24 a 48 h, dependendo da umidade relativa e síntese de antibióticos para evitar o crescimento de organismos oportunistas (SRIVASTAVA et al., 2009), *Beauveria bassiana* e *B. brongniartii* produzem o antibiótico oosporeina. As hifas formam conidióforos dando origem a esporos assexuais (conídios) que são unidades infectivas com função de disseminação (CAÑEDO & AMES, 2004).

Os fatores ambientais controlam a produção de conídios, sua sobrevivência e germinação de modo que eles são críticos para o desenvolvimento de epizootias (CARRUTHERS & SOPER, 1987). A esporulação ocorre normalmente em cadáveres, mas também pode ocorrer em insetos vivos (TANADA & KAYA, 1993). A duração do período de incubação varia entre espécies, no entanto, o desenvolvimento da doença durante o período vegetativo, é geralmente dependente da temperatura (CARRUTHERS & SOPER, 1987). A dispersão de esporos pode ser um processo ativo ou passivo e depende das características do esporo e esporângio (TANADA & KAYA, 1993).

2.5 Mecanismos de defesa dos insetos

O comportamento dos insetos pode alterar o sucesso da infecção dos fungos entomopatogênicos. Em geral, a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* tem sido o organismo modelo utilizado para elucidar os mecanismos de defesa dos insetos ante o ataque dos patógenos, os quais foram classificados em: 1) barreiras físico-químicas, 2) sistema imune inato (LEVITIN WHITEWAY, 2008; TELLEZ et al., 2009) e 3) outras estratégias de defesa. No caso dos insetos sociais, como abelhas, cupins e formigas também foram observadas as adaptações do seu comportamento permitem manter a imunidade de suas colônias (RICHARDS et al., 2008).

2.5.1 Barreiras físico-químicas

A cutícula é a primeira linha de defesa a ser uma estrutura rígida que cobre a parte exterior do inseto que consiste de duas camadas: a epicutícula e procutícula. A primeira é composta principalmente de gorduras, ceras e lipoproteínas, cuja função é evitar a perda de água pela transpiração. A segunda é a mais abundante constituindo o 95% da estrutura e está composta de quitina e várias proteínas estruturais que fornecem rigidez, atuando como uma barreira física à penetração de patógenos, além de ser dificilmente degradada por enzimas líticas excretadas pelos mesmos (HAJEK & ST. LEGER, 1994).

Atualmente é considerado que a cutícula tem uma função mais ativa, uma vez que a partir da epiderme se secretam moléculas que agem especificamente inibindo os mecanismos de infecção dos entomopatógenos. Tem sido relatado que, na cutícula ocorre a produção de proteases, peptidases antifúngicas e inibidores de proteases fúngicas que podem desempenhar um papel importante durante a infecção, além da presença de ácidos gordos de cadeia curta e lipídios de cutícula que inibem a germinação de esporos fúngicos (JAMES et al., 2003).

2.5.2 Sistema imune inato

A segunda linha de defesa dos insetos a constitui o sistema imune inato e é composta pelo sistema celular e o sistema humoral, capaz de reagir ante a invasão de patógenos diferenciando o próprio do estranho. Neste processo, participam os sistemas de reconhecimento com padrões moleculares característicos de polissacarídeos microbianos presentes na parede celular como: peptidoglicanos abundantes em bactérias Gram (+); lipopolissacarídeos na membrana externa de bactérias Gram (-) e finalmente α -1,3-glucanos na parede celular dos fungos.

O sistema humoral utiliza proteínas antibióticas e outras moléculas efetoras que circulam no hemocele e/ou cutícula com a finalidade de inativar os agentes patogênicos que acessaram ao interior do inseto. Tem descrito que os insetos sintetizam moléculas com ação biocida específicas como cecropinas, defensinas, atacinas, lisozima, entre outros. (BOMAN et al., 1991). Embora é um tema ainda controverso, foi determinada a existência de fenoloxidasas e hemaglutininas (lectinas) na hemolinfa que poderia simular o papel de antígenos em combinação com proteínas depositadas na superfície dos invasores. Em alguns dípteros, o plasma da hemolinfa é encarregado de melanizar e encapsular microrganismos invasores através da via tirosina-fenoloxidase sem que os hemócitos estejam envolvidos na formação da cápsula (TANADA & KAYA, 1993).

O sistema celular, por sua parte, é composto pelos hemócitos circulantes na hemocele capaz de reconhecer os elementos estranhos mediante receptores tipo Toll (proteínas transmembrânicas de tipo I que fazem parte do sistema imunológico inato) que ativam a produção de peptídeos antimicrobianos (LEVITIN & WHITEWAY, 2008). Quando a concentração de micro-organismos patogênicos é baixa, a fagocitose é o principal mecanismo para remover os invasores. Em concentrações mais elevadas, eles formam agregados chamados nódulos. Há provas que indicam que as pró-fenoloxidasas desempenham um papel importante neste sistema, as quais são enzimas importantes para a síntese de melanina, polímero que

normalmente é depositada sobre os patógenos, para formar encapsulados (MARMARAS et al., 1996). *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são capazes de evitar a encapsulação no hemocelo (BIDOCHKA et al., 2010). *Spodoptera littoealis* (WILSON et al., 2001) e *Tenebrio molitor* (BARNES & SIVA-JOTHY, 2010) tem mostrado maior resistência a *B. bassiana* e *M. anisopliae*, respectivamente, quando são criados em condições lotadas. Este aumento da resistência parece estar relacionado á melanização cuticular, isto é a formação do pigmento melanina por polimerização de compostos fenólicos (VEGA et al., 2012). Em contraste, o aumento de resistência contra *M. acridium* em *S. agregaria* criados em condições de superlotação parece estar relacionada com o aumento da atividade microbiana (WILSON et al., 2002).

Em *Drosophila*, esta reação é regulada através de uma cascata de sinalização que envolve proteases serina induzíveis (MP1 e MP2) e o seu inibidor (serpina Spn27A), primeiro atuando como ativadores da fenoloxidase e segundo na regulação da atividade da enzima. MP1 ativa a melanização em resposta a infecções provocadas, por fungos e bactérias, enquanto que MP2 está principalmente envolvido na resposta a infecções de origem fúngica (TANG et al., 2006).

2.5.3 Outras estratégias de defesa

Como parte da luta constante pela sobrevivência, alguns insetos são capazes de melhorar suas habilidades de defesa contra patógenos de acordo com a densidade de suas populações. Sob tais circunstâncias, a seleção natural favorece aqueles indivíduos que usam sinais associadas à densidade populacional para desenvolver mecanismos de defesa ideais. Como resultado, os indivíduos que crescem superlotados são mais resistentes que aqueles indivíduos desenvolvidos em baixa densidade. Esse fenômeno chamado “profilaxia” dependente da densidade (WILSONY REESON, 1998), está presente principalmente em insetos que apresentam polifenismo, como o gafanhoto do deserto *Schistocerca gregaria*. Observa-se que quando estes insetos se desenvolvem em condições de aglomeração são significativamente mais resistentes ao fungo *Metarhizium anisopliae* que os gafanhotos solitários, devido à atividade anti-microbiana aumentada em seus sistemas de defesa (WILSON et al., 2002).

Os insetos também são capazes de modificar seu comportamento, a fim de lutar contra os agentes patogênicos, como no caso do gafanhoto *Locusta migratória* que ao ser infectado por *Metarhizium anisopliae* aumenta a temperatura do corpo pela exposição ao sol parando o desenvolvimento dos blastósporos do fungo e facilitando a ação dos hemócitos de seu sistema imune (OUEDRAOGO et al., 2003).

No caso dos insetos sociais, eles desenvolveram muitas adaptações de conduta ou comportamento para prevenir ou combater as infecções por parasitas e patógenos. O primeiro caso de adaptações de comportamento social é remover os membros da colônia com sinais de doença (RICHARD et al., 2008). No caso de abelhas, além de reconhecer e remover indivíduos doentes, são capazes de produzir uma "febre social", onde as obreiras estão aglomeradas e aumentam a temperatura em torno de larvas doentes, a fim de eliminar os patógenos (STARCKS et al., 2000). Uma segunda modificação do comportamento ocorre nos próprios indivíduos doentes para reduzir a transmissão da doença, mantendo-se fora do ninho ou

afastando-as das larvas ou a rainha. Finalmente, uma terceira modificação do comportamento é uma interação social prejudicada de grupos de indivíduos saudáveis com indivíduos infetados. O incremento do contato de indivíduos saudáveis com os doentes pode resultar numa “vacinação” coletiva de indivíduos saudáveis, aumentando sua imunidade (RICHARDS et al., 2008).

2.6 Enzimas produzidas por fungos entomopatogênicos

O tegumento dos insetos constitui-se em uma barreira físico-química altamente eficiente contra a penetração de muitos agentes entomopatogênicos. A cutícula do inseto é uma estrutura composta de nanofibras de quitina cristalina integrada a uma matriz de proteínas, polifenóis, água e pequenas quantidades de lipídios, que pode ser degradada por proteases e quitinases. Enquanto a parede celular dos fungos é uma estrutura complexa composta por quitina, glucanos, e outros polímeros, com a evidência de uma ligação cruzada entre os componentes, criando uma complexa estrutura reticular (VINCENT & WEGST, 2004).

A quitina é um polissacarídeo não ramificado, constituído por N-acetil-D-glucosamina, em que os monómeros são ligados por β -1,4 e existem três tipos de quitina: α , β e γ . As proteínas são glicoproteínas cuja fracção glicosilada é formada por manose e galactose (WESSELS, 1999). Os lipídeos nas paredes celulares dos fungos estão presentes numa gama de 1 a 10 % do seu peso seco; e são os ácidos graxos, os mais abundantes em C16 e C18 (PUCHETA et al., 2006).

Os fungos entomopatogênicos são capazes de sintetizar enzimas hidrolases, tais como lipases, proteases, quitinases, glucanases e outras, de modo que estas enzimas podem ser utilizadas para o controle biológico. St. Leger et al. (1986), verificaram que enzimas extracelulares (endoproteases, aminopeptidases, lipases, esterases e quitinases) foram produzidas em grandes quantidades por *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Verticillium lecanii* quando foram crescidos usando cutícula do gafanhoto *Schistocerca gregaria*. Além disso, foi observada uma grande variação nos níveis de produção enzimática entre os diferentes isolados, bem como entre as diferentes espécies analisadas, sendo que todos os isolados apresentaram alta produção de endoproteases. A sequência de produção dos diferentes tipos enzimáticos ocorreu de forma similar para as diferentes espécies, sendo que as primeiras atividades observadas (< 24h) foram as do complexo proteolítico e esterase. Estes mesmos autores observaram que para que ocorra a hidrólise das proteínas cuticulares é necessária a adsorção de proteases na cutícula. Posteriormente, verificou-se que a adsorção da protease Pr1 ocorre via pontes eletrostáticas não específicas entre os grupos carregados positivamente da enzima e grupos carboxil da cutícula de gafanhoto. Modificações químicas dos grupos carboxil, amino e hidroxil de proteínas cuticulares do gafanhoto revelaram que os grupos carboxil são essenciais para ligações eletrostáticas das proteases básicas produzidas por estas espécies fúngicas (BIDOCHKA & KHACHATOURIANS, 1991).

As proteases são classificadas em quatro classes diferentes: serina, cisteína, metalo e aspartil, das quais a mais comum nos fungos entomopatogênicos é a serina-protease do tipo subtilisina (ST LEGER, 1995). Também produzem proteases do tipo tripsina chamadas Pr2 (COLE et al., 1993). As duas proteases são enzimas extracelulares (TIAGO et al., 2002)

segregadas eficientemente para a degradação da cutícula, proporcionando nutrientes para o crescimento do fungo (MONOD et al., 2002). Proteases do tipo Pr1 e Pr2 também foram observadas em sobrenadantes das culturas de *B. bassiana*, *Verticillium lecanii*, *Nomurea rileyi* e *Aschersonia aleyrodis* (ST. LEGER et al., 1996). As enzimas do tipo Pr1 produzidas por estes fungos apresentaram similaridades em quanto à especificidade pelo substrato, porém, anticorpos contra a protease de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (ME1) reagiram somente com proteases produzidas por isolados da mesma espécie não ocorrendo reação com as proteases produzidas pelas demais espécies analisadas. Resultados semelhantes foram observados por Shimizu et al. (1993). Proteases produzidas por isolados de *B. bassiana* e de *B. brongniartii* foram imunologicamente idênticas, enquanto que proteases de *B. bassiana* diferiram imunologicamente daquelas produzidas por *M. anisopliae* e *Paecilomyces fumosoroseus*, apesar de apresentarem alto grau de similaridade quanto à especificidade pelo substrato. Também se podem utilizar as mesmas proteases produzidas por fungos entomopatogênicos no controle de insetos, fungos patogênicos, bactérias e nematoides (KHAN et al., 2003).

As estratégias que têm sido sugeridas, entre outros, têm sido a modificação genética de *Metarhizium anisopliae* para a sobre expressão da protease Pr1, a principal enzima que degrada a cutícula. Ao disseminar a enzima no campo mostraram que não afetam outros insetos como besouros *Calosoma sycopantha*, predadores de lagartas e estafilinídeos mantendo a estabilidade genética por um ano e, sem afetar de forma antagônica o complexo e dinâmico microambiente da rizosfera (ST LEGER et al., 1996; HU & ST LEGER, 2002). No entanto, a quitinase agindo sinergicamente com a protease e os β -1,3-glucanases são enzimas que estão diretamente envolvidas na degradação da cutícula de insetos (ST LEGER et al., 1986), além de estar envolvidas em muitas fases, como a germinação, crescimento de hifas, morfogênese, e proteção contra concorrentes (SEIDL, 2008).

Em quanto ao controle de insetos, a virulência dos fungos entomopatogênicos sobre pulgões (*Myzus persicae*) aumentou, transformando uma cepa de *B. bassiana* com a construção de um gene fundido contendo o gene *Bbchit1e* Pr1, que codificam para uma quitinase 33 kD e protease do tipo subtilisina, respectivamente; para expressar o gene, a proteína é dissociada em duas partes que tem atividade de protease e quitinase (FANG et al., 2009). Em estudos conduzidos aos efluentes da fermentação submergida do fungo *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* usando melaço de cana de açúcar como substrato, verificou-se que a partir das 16 horas começa a produção de enzimas com atividade proteolítica e lipolítica, que aumenta a medida que transcorre o processo de fermentação (GÓMEZ et al., 2004). Também se demonstrou a produção de quitinases e amilases (SAKSIRIRAT & HOPPE, 1991). Sabe-se que as enzimas produzidas por estes fungos, agem como uma unidade, e aparentemente têm uma ação conjunta o que lhes permite penetrar através do tegumento do inseto. As lipases e proteases atuam antes que as quitinases, a produção sequencial das mesmas pode ser interpretada a partir da estrutura física da cutícula do inseto, as fibras de quitina são rodeadas por uma camada de proteína; portanto a quitina não pode ser degradada até que as proteínas sejam removidas. Estas enzimas são sintetizadas de uma maneira coordenada em relação à estrutura cuticular, e são induzidas in vitro, quando eles são cultivados sobre cutícula de inseto (SHIMIZU et al., 1993).

Observou-se que as enzimas podem ser induzidas por diferentes substratos como quitina, quitosano e N-acetilglucosamina, que podem ser indutores de glucanases (NORONHA

et al., 2000). Portanto, proteases, quitinases e glucanases podem ser induzidas por substratos complexos, como a cutícula de insetos; alguns estudos têm mostrado isso, como a serina-protease P32 do fungo nematófago *Verticillium suchlasporium* induzida pela cutícula de *Callosobruchus maculatus* (TIKHONOV et al., 2002), as proteases e quitinases foram sintetizadas por *Metarhizium anisopliae* na presença de cutícula de *Callosobruchus maculatus* (MURAD et al., 2006), essa capacidade que tem os fungos para induzir a expressão de enzimas com diferentes substratos ou moléculas abre possibilidade de utilização no controle de pragas (FRANCO et al., 2011).

2.7 Metabolitos secundários tóxicos produzidos por fungos entomopatogênicos

Qualquer composto que não seja essencial para o crescimento e desenvolvimento é referido como metabolito secundário (KELLER et al., 2005). Os fungos entomopatogênicos produzem metabólitos que são tóxicos para os insetos e, geralmente, são sintetizados quando o fungo penetra o exoesqueleto (TELLEZ-JURADO et al., 2009) e alcança o hemocelo como parte dos fatores de virulência durante a patogênese, de modo que se considera que tem propriedades inseticidas (VEY et al., 2001) e outros metabolitos com atividade anti-alimentaria nos insetos (QUESADA-MORAGA et al., 2006). Muitas destas toxinas fúngicas são metabolitos secundários de baixo peso molecular com um potencial comercial como agentes de controle de insetos. Os depsipeptídeos são os metabolitos mais conhecidos, a denominação depende do fungo a que corresponda, por exemplo, a destruxina é produzida por *Metarhizium anisopliae* e a beauvericina é produzida por *Beauveria bassiana* e foi isolada pela primeira vez a partir de uma cultura líquida (Figura 10) (HAMILL et al., 1969).

Beauveria spp. foram relatadas como produtoras de diferentes ciclodepsipeptídeos (peptídeos de lactonas). Os ciclodepsipeptídeos podem atuar como antibióticos ionoforos devido a suas interações seletivas com íons de potássio ou de sódio, alterando assim a permeabilidade das membranas celulares (NGOKA et al., 1999). Outros ciclodepsipeptídeos produzidos por *Beauveria* spp. incluem beauverolides (MOCHIZUKI et al., 1993) e bassiatine (KAGAMIZONO et al., 1995). Experimentos feitos por Xu et al. (2009), mediante o rompimento do gene que codifica para o bassianolide, confirmou que este metabolito serve como um fator significativo na virulência, quando o bassianolide foi testado em bioensaios envolvendo a imersão de várias espécies de Lepidópteros (*G. mellonella*, *S. exigua*, ou *Helicoverpa zea*) na suspensão de conídios. O bassianolide também foi tóxico para o bicho da seda (*Bombyx mori*) quando foi injetado nas larvas ou incorporado na dieta (KANAOKA et al., 1978), ou também quando foi injetado em *H. zea* (CHAMPLIN & GRULA, 1979). Kwon et al. (2000), relatou a detecção do bassianolide e beauvericina em larvas de *B. mori* que foram mortas por *Beauveria bassiana*. Os beauverolides I e II têm sido relatados com atividade inseticida moderada contra *Callosobruchus chinensis* e *Spodoptera litura* (MOCHIZUKI et al., 1993). *Beauveria* spp. não são só os fungos que produzem estes metabolitos secundários. Por exemplo, o bassianolide também é produzido por *Verticillium lecanii* (SUZUKI et al., 1977), os beauverolides são produzidos por *I. fumorosea* (JEGOROV et al., 1994) e beauvericina é produzida por *Cordyceps*, *Fusarium* e *Isaria* (LUANGSA-ARD et al., 2009).

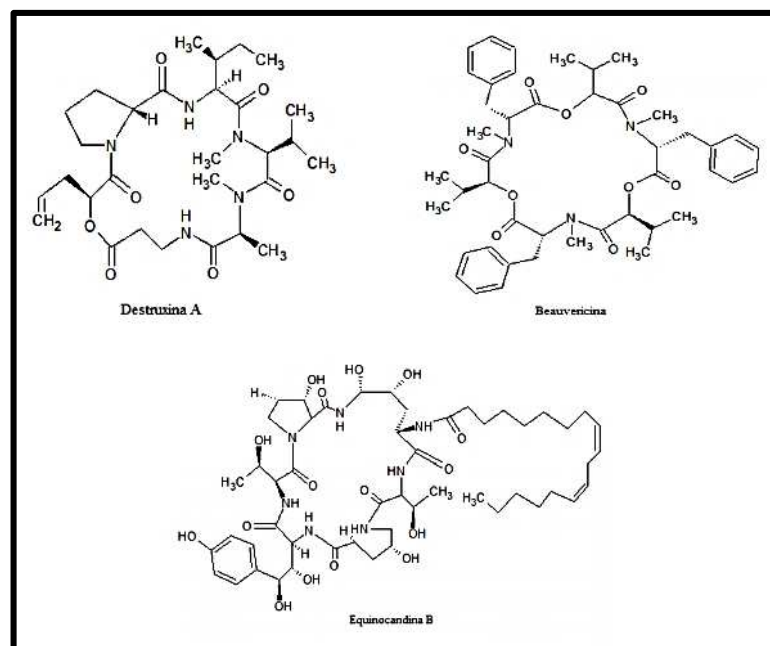


Figura 10. Estruturas químicas de metabólitos sintetizados por fungos com propriedades inseticidas e fungicidas. Fonte: FRANCO, 2012.

Quimicamente os depsipeptídeos cíclicos possuem um alfa-hidroxiácido e cinco resíduos de aminoácidos, designados da A á E que diferem no grupo -R dos resíduos de hidroxiácidos, e têm identificado 35 análogos de outras espécies de fungos entomopatogênicos (LIU et al., 2000). Estas toxinas têm uma ampla gama de efeitos biológicos sobre os insetos, entre os quais incluem induzir a despolarização da membrana, devido à abertura dos canais de Ca^{2+} , causando a paralisia tetânica e a morte (SAMUELS et al., 1988), também causam mudanças morfológicas no citoesqueleto e nos plasmócitos dos insetos, afetando parte da resposta imune, como encapsulação e fagocitoses (VEY et al., 2002). Além de reduzir a expressão de peptídeos antimicrobianos que têm um papel importante na resposta imunitária humoral dos insetos (PAL et al., 2007), também induzem alterações estruturais nas células epiteliais que causam a ruptura da membrana, e um estresse oxidativo nas células (SOWJANYA & PADMAJA, 2008), inibindo a taxa de secreção de fluido nos túbulos de Malpighi (RUIZ-SANCHEZ et al., 2010).

Outros metabólitos secundários produzidos por *Beauveria* incluem três pigmentos não peptídicos: a oosporeina (vermelho dibenzoquinone) (VINING et al., 1962), o amarelo 2-piridona tenellina e bassianina (WAT et al., 1977). Takahashi et al. (1998), relataram dois alcaloides de piridina de *B. bassiana*: piridovecina e piridomacrolidina, enquanto Quesada-Moraga & Vey (2004), relataram o isolamento de bassiacridine de *B. bassiana*, seguido por testes que demonstraram a sua toxicidade para gafanhotos depois da injeção no seu hemocelo. O efeito tóxico dos depsipéptidos em diferentes espécies de insetos abriu uma grande oportunidade para a produção como inseticida por fermentação líquida (LIU et al., 2000), achando que sua produção depende muito da disponibilidade de nitrogênio (WANG et al., 2009).

Os beauverolides produzidos por *Beauveria tenella* e *Paecilomyces fumosoroseus* não têm um efeito inseticida diretamente, no entanto, estes metabólitos têm uma atividade imunomoduladora e, portanto, podem ser usados no controle biológico de insetos (JEGOROV

et al., 1994). Outro metabolito é o ácido 2,6 piridin dicarboxílico, vulgarmente conhecido como ácido dipicolínico, e foi demonstrado ser tóxico para as ninfas de *Bemisia argentifolii* (ASAFF et al., 2005). As destruxinas são ciclodepsipeptídeos produzidos por vários fungos e foram isoladas em primeiro lugar por *Metarhizium anisopliae* (KODAIRA, 1961, 1962) e mais tarde a partir de *Aschersonia* sp. (KRASNOFF et al., 1996). Algumas das 38 destruxinas diferentes ou destruxinas análogas têm mostrado ser inseticidas (SCHRANK & VAINSTEIN, 2010), aparentemente por abertura dos canais de cálcio nas membranas do músculo dos insetos (SAMUELS et al., 1988a). Samuels et al. (1988b), testaram quatro *M. anisopliae* contra larvas de *Manduca sexta*; destes, três foram patogênicos, mas a detecção de destruxinas na hemolinfa foi positiva apenas para a cepa mais virulenta. Para este isolado, o crescimento foi escasso na hemolinfa, em comparação com as outras duas cepas patogênicas, que exibiram uma proliferação de hifas.

Outros metabolitos produzidos por fungos entomopatogênicos incluem o trichotechane tenuipesine A, produzido *Paecilomyces tenuipes* (KIKUCHI et al., 2004); o piridone akanthomicina, produzido por *Akanthomyces gracilis* (WAGENAAR et al., 2002); cordyanhidrides, produzido por *cordyceps pseudomilitaris* (ISAKA et al., 2000); cordycepina, produzida por várias espécies *Cordyceps* (Cunningham et al., 1950; Ling et al., 2002); ciclosporina, produzidos por *Tolypocladium inflatum* (AARNIO & AGATHOS, 1989); e hopanoides, produzidos por *Aschersonia aleyrodinis* (VAN EIJK et al., 1986). *Hirsutella thompsonii* foi relatado para produzir phomalactona (KRASNOFF & GUPTA, 1994), bem como a proteína hirsutellina (MAZET & VEY, 1995; LIU et al., 1995). O phomalactona mostrou-se tóxico para o tefritídeo *Rhagoletis pomonella* e *Ceratitis capitata*, e para inibir a germinação de conídios de *B. bassiana*, *Tolypocladium geodes*, *T. cylindrosporium*, e *Metarhizium anisopliae* (KRASNOFF & GUPTA, 1994). Em laboratório bioensaios, com hirsutellina mostraram ser tóxica para as larvas da maior traça da cera, *G. mellonella*, e a mosca comum da fruta, *Drosophila melanogaster* (VEY et al., 1993), e para o ácaro dos citros da falsa ferrugem (OMOTO & MCCOY, 1998).

2.8 Fatores que afetam a diversidade e distribuição dos fungos entomopatogênicos

A diversidade e abundância dos fungos entomopatogênicos é afetada por fatores bióticos e abióticos, diminuindo a capacidade de sobreviver, propagar-se e infectar a seu hospedeiro; entre os fatores abióticos mais importantes que afetam a viabilidade e a persistência dos fungos entomopatogênicos no campo se mencionam: a radiação UV, a temperatura, o tipo de solo, a umidade e os agroquímicos. A susceptibilidade e a relação com os hospedeiros dependem dos nutrientes presentes nos insetos, que são o meio de propagação, dispersão e persistência dos fungos (PUCHETA et al., 2006).

Um dos principais limitantes para a sobrevivência de conídios no habitat é a exposição à radiação solar. Os espectros solares contêm radiação eletromagnética em comprimentos de onda diferentes (nm). A luz ultravioleta (UV) ocorre em três espectros diferentes: UVC (100-280 nm), UVB (280-315 nm) e UVA (315-400 nm). O visível ocorre no intervalo de 380-780 nm (VEGA et al., 2012). Os conídios são muito susceptíveis ao UVB. O dano prejudicial causado pela luz UV é devido à foto reações de ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e

membranas (TEVINI, 1993). A subletal exposição à radiação UV pode causar alterações fisiológicas ou genéticas que reduzem a virulência, por exemplo, reduz e retarda a germinação (BRAGA et al., 2001). A pigmentação de conídios muitas vezes influencia a susceptibilidade a radiação solar, sendo que os conídios mais pigmentados são geralmente mais tolerantes à radiação UV (BRAGA et al., 2006).

Com respeito à temperatura, é um fator chave no crescimento e desenvolvimento de todos os organismos. Geralmente as cepas de fungos entomopatogênicos são mesófilas e os rangos de temperatura para o seu desenvolvimento variam entre 8 a 37 °C (FARGUES et al., 1992), por exemplo, *B. brongniartii* cresce entre 8- 30 °C, *B. Bassiana* 8- 32 °C, *I. fumosorosea* 11- 30 °C e 15- 32°C para *N. rileyi* (FARGUES et al., 1992), no entanto, as espécies de *M. flavoviride* apresentam uma variação no seu rango de crescimento com valores de 8- 32 °C e 11- 32 °C, mas as temperaturas maiores a 25 °C estimulam seu crescimento (FARGUES et al., 1992), *M. anisopliae* tem desenvolvimento a temperaturas de 8/11- 35/37 °C (FARGUES et al., 1992), e temperaturas menores ou iguais a 25 °C estimulam seu crescimento (QUEDRAOGO et al., 1997). Temperaturas entre 15- 35 °C tem um efeito significativo na porcentagem de germinação e crescimento vegetativo de *B. bassiana*, com uma maior germinação a 25 e 30 °C (JAMES et al., 1998), para *B. brongniartii* a 8 °C se estimula o seu crescimento. Vidal et al. (1997), trabalhando com 37 isolados de *I. fumosorosea*, relataram temperaturas ótimas de 20-30 °C, enquanto temperaturas ótimas para 65 isolados de *B. bassiana* foram entre 25-28 °C, embora as temperaturas ótimas para alguns isolados foram de 20-30 °C. Em contraste, os fungos Entomophthorales tem temperatura ótima para o crescimento abaixo de 20° C (HAJEK, 1997), embora algumas espécies, tais como *Neozygites tanajoae* e *N. floridana* são encontradas em regiões tropicais (FARGUES et al., 1997). Alguns fungos entomopatógenos demonstraram permanecer infecciosos a baixas temperaturas. Assim, Doberski (1981), avaliaram a infecção de besouros em casca inoculada com *B. bassiana* e *I. farinosa* e foram incubados a 2, 6, 10, 15, e 20 °C, e relatou infecção positiva mesmo em 2 °C. Estes resultados implicam que a infecção pode ocorrer a temperaturas em que os insetos hospedeiros são inativos. Obviamente, a temperatura ótima para uma cepa fúngica é crucial para ser utilizado como um agente de controle microbiano. O rápido desenvolvimento do micélio e, portanto, a evolução da infecção depende da temperatura (FERRON, 1978). Porém, a temperatura ótima para a função no solo pode ser diferente dependendo da espécie de fungo. As cepas de *Metarhizium* spp. há sido selecionadas e isoladas de insetos que se encontram nos solos em regiões temperadas com prolongada temperatura baixa (YIP et al., 1992) e cepas de *Beauveria bassiana* tem sido identificadas a partir de insetos coletados nos solos tropicais e os conídios tem maior supervivência a altas temperaturas (MCCOY et al., 1988).

Vários gêneros de fungos entomopatógenos têm sido isolados na Antártida, por exemplo, *B. bassiana* (MAHANEY et al., 2001), *Neozygites cf. acaridis* (BRIDGE & WORLAND, 2004), *Conidiobolus antarcticus* (TOSI et al., 2004). Várias espécies não descritas de *Strongwellsea* foram encontradas em infecções de *Spilogona* spp. em Greenland Artic (EILENBERG, 2002), enquanto que *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram isolados do solo subantártico em Macquarie Island, e *M. anisopliae* foi capaz de germinar a 2.5 °C (RODDAM & RATH, 1997). De Croos & Bidochka (1999), recuperaram 26 isolados de *M. anisopliae* em Ontário, Canadá, e pelo menos sete delas poderiam germinar e crescer a 8 °C.

A umidade é importante para a germinação dos conídios, crescimento de fungos e esporulação no cadáver do inseto, além da viabilidade dos conídios no solo. Os fungos requerem de uma umidade alta para iniciar uma epizootia natural (JARONSKI, 2010). Além disso, a água é um fator importante na migração ou movimento do fungo patogênico e seu hospedeiro. Para o crescimento vegetativo Ferron (1977), mostrou que o desenvolvimento do micélio de *B. bassiana* no cadáver de um inseto requer uma umidade superior a 92%.

A umidade da superfície do solo em comparação à umidade a diferentes profundidades varia numa maior medida tanto no espaço como no tempo. Os conídios de fungos tendem a sobreviver bem em condições de alta temperatura e umidade ou de baixa temperatura e umidade, mas com temperaturas mais altas e umidades mais baixas a sobrevivência se reduz drasticamente (MCCOY, 1990). A germinação de conídios no solo ocorre praticamente em todos os níveis de umidade, mas cada cepa fúngica tem um nível ótimo. Duniway & McCoy (1990), observaram que a água satura os solos argilosos (capacidade de retenção de água: >35%) e pode inibir a infecção por *B. bassiana*, enquanto que no solo arenoso não ocorreu inibição. A alta umidade relativa favorece o processo de infecção de *M. anisopliae* (EKESI et al., 1999). As lesões produzidas pelo patógeno são desenvolvidas em todas as condições ambientais, mas são maiores a 24 °C com 95 e 100% UR, e a 28 °C com 100% UR (HANNUSCH & BOLAND, 1996). O estudo de Walstad et al. (1970), indica que a maior germinação ocorre em 100% de umidade relativa e diminui a 0 a 85% UR. Níveis elevados de UR são necessários para a esporulação. A um nível de 100% de UR a esporulação ocorreu em quatro dias, mas em uma UR 92,5% foram necessários cinco ou mais dias, enquanto que a esporulação foi inibida com UR inferior a 90%.

A primeira formulação comercial de micélio granular de *Metarhizium anisopliae* (BIO1020) foi desenvolvida por Bayer AG para o controle de insetos do solo (ANDERSCH et al., 1990). O grânulo requer reidratação a fim de que esporule, pelo tanto, os fatores abióticos afetam a cinética de conidiação dos grânulos de micélio em diferentes solos. Sem conidiação, não pode haver infecção de um hospedeiro e não haverá controle de pragas. Os estudos realizados por Storey et al. (1990), mostraram que a temperatura e a umidade do solo são fatores chave para formação de conídios no solo.

Naturalmente, a distribuição dos conídios dos fungos dentro do solo tenderá um impacto na eficácia da micopatogenicidade no controle biológico. Uma investigação sugere que o movimento de conídios difere em função da composição do tipo de solo (KELLER & ZIMMERMANN, 1989). Os estudos realizados por Storey & Gardner (1987), com uma fórmula de pó umectante de conídios de *B. bassiana* mostrou que a porcentagem de propágulos de fungos recuperados nos 5 cm superiores das colunas do solo se correlaciona positivamente com a composição da areia e negativamente com a argila e o limo. *Beauveria bassiana* é reportada com maior abundância no solo argiloso, com um pH alto e baixo conteúdo de matéria orgânica, sendo as duas últimas variáveis importantes na presença dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* (QUESADA-MORAGA et al., 2007).

Os praguicidas aplicados sobre ou no solo para o controle de patógenos de plantas (fungicidas), insetos (inseticidas) ou ervas (herbicidas), assim como, os fertilizantes, podem afetar diretamente ou indiretamente a sobrevivência dos fungos entomopatogênicos no solo. Embora os fungicidas parecem mais prejudiciais, o grau no qual os pesticidas afetam a

supervivência de fungos difere em grande medida. Na gestão de pragas, o efeito secundário de pesticidas sempre deve ser considerado (MCCOY et al., 1988; KELLER & ZIMMERMANN, 1989).

A interação entre fungos entomopatogênicos e seu inseto hospedeiro pode ser influenciada por fatores bióticos como outros micro-organismos do solo, artrópodes do solo e exsudados das plantas (IGNOFFO & GARCIA, 1992).

A microbiota exterior da cutícula dos insetos proporciona proteção contra outros fungos, que normalmente seriam patógenos. Em experimentos com *Metarhizium anisopliae* e seu hospedeiro curculionídeo Schabel (1976), detectou supressão completa da germinação de conídios na cutícula não estéril do adulto o qual sugere uma forte antibiose. Os insetos com uma superfície esterilizada resultaram em alta germinação de conídios. Pequenos artrópodes do solo, especialmente ácaros e colêmbolos, tem sido reportado como importantes na dispersão dos fungos entomopatogênicos no solo (KELLER & ZIMMERMANN, 1989).

Os fatores fungistáticos associados com certos artrópodes podem também influir na supervivência de fungos entomopatogênicos. O alcaloide do veneno da formiga de fogo (*Solenopsis invicta*) pode retardar a germinação de conídios e induzir crescimento micelial de *B. bassiana*, *in vitro*. Além disso, os componentes fungistáticos, dos alcaloides do veneno, foram detectados em solo não estéril por Storey et al. (1991).

A fungistasis é um fator importante na supervivência dos conídios em solo não estéril. Numerosas investigações têm demonstrado que a germinação de conídios e a patogenicidade de muitos fungos entomopatogênicos se suprimem em solo não estéril, enquanto que a germinação e crescimento micelial ocorreu em solo estéril (DUNIWAY & MCCOY, 1990). O efeito fungistático é atribuído a actinomicetes, bactérias do solo, protozoos (FARGUES et al., 1983) e diversos fungos do solo (WALSTAD et al., 1970). Os conídios, blastosporos, tubos germinativos e micélio parecem ser susceptíveis a ataque microbiano enquanto que os esporos de resistência não germinados dos *Entomophthorales* parecem mais resistentes (HAJEK & SHIMAZU, 1996; HAJEK & ST. LEGER, 1994).

Pouco se sabe sobre o efeito das raízes das plantas e exsudados de raiz na atividade dos fungos entomopatogênicos. Porém, Zimmermann (1984), trabalhando no controle dos bicudos negros com *M. anisopliae* encontrou que o patógeno foi menos eficaz nos ciclos da cultura, comparado com outras plantas.

2.9 Caracterização molecular de fungos entomopatogênicos

Diversos tipos de técnicas de biologia molecular têm sido utilizados para estudar a diversidade genética existente entre as espécies de fungos entomopatogênicos, por exemplo, sondas para a detecção de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) (HEGEDEUS & KHACHATOURIANS, 1993; MAURER et al., 1997) e métodos com base na reação em cadeia da polimerase (PCR), tal como a utilização de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) (FEGAN et al., 1993; BIDOCHKA et al., 1994; JENSEN et al., 2001; GAITAN et al., 2002), sequências simples repetidas (SSR) ou análise com microssatélites (KRETZNER et al., 2000; ENKERLI et al., 2001, 2005) e espaçador interno transcrito (ITS) -

rDNA análise de sequência RFLP (RAKOTONIRAINY et al., 1994; BUSCOT et al., 1996; COATES et al., 2002a).

A tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi descrita por Kary Mullis nos anos 80, e a partir de então, devido à sua rapidez, versatilidade e facilidade de realização, a PCR causou uma verdadeira revolução nos conceitos da biologia, por ser uma técnica eficaz para estudos genéticos moleculares (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). O seu princípio é simples e baseia-se na amplificação *in vitro* do ADN, resultando na replicação exponencial da sequência alvo até em um milhão de vezes, mesmo em presença de muitas moléculas de ADN não relacionadas, obtendo-se como produto um DNA altamente homogêneo, torna-se excelente fonte para várias manipulações moleculares (RIVERA et al., 1997). O ciclo da PCR envolve três etapas: desnaturação, pareamento e extensão. O DNA é primeiramente desnaturado em alta temperatura. Logo após, os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) pareiam-se às sequências homologas, em baixa temperatura, e a extensão ocorre a partir do *primer*, com a ação da polimerase termoestável, Taq polimerase, a 72° C. Ciclos repetidos de desnaturação, pareamento e extensão permitem uma rápida amplificação das sequências de DNA. Os fragmentos amplificados podem ser separados por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. A técnica de PCR pressupõe o uso de *primers* específicos para a sequência de DNA que se quer amplificar. No caso dos fungos entomopatogênicos, a técnica de PCR foi utilizada para avaliar o polimorfismo nas regiões dos genes rRNA e RNA transportador (tRNA). Fegan et al. (1993) e Hegedus et al. (1996), exploraram a técnica de PCR, a fim de identificar e diferenciar os isolados de *B. bassiana*, e revelam o elevado grau de diversidade genética em *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Maimala et al. (2002), usaram esta técnica para a amplificação do gene da toxina Hirsutellina A produzida por *H. thompsonii* a partir de ADN genômico. Neste estudo demonstrou-se a variabilidade dos diferentes isolados desta espécie fúngica enquanto a presença e expressão deste gen.

Em geral, para espécies próximas, os produtos amplificados do complexo de genes ribossômicos são do mesmo tamanho. Para visualizar diferenças, faz-se necessário cortar os fragmentos amplificados com enzimas de restrição e depois detectar em eletroforese com gel de agarose diferenças entre os tamanhos dos fragmentos obtidos, ou então clonar os fragmentos amplificados, sequenciando-os, e comparar diretamente as sequências obtidas. Na técnica de sequenciamento, utiliza-se um iniciador com o objetivo de alongar uma fita do DNA e além dos desoxirribonucleotídeos são utilizados também análogos chamados didesoxi, que não possuem a hidroxila - 3' marcados radioativamente ou por corantes fluorescentes, para que interrompam o alongamento da cadeia de nucleotídeos, gerando vários fragmentos de tamanhos diferentes. Atualmente o sequenciamento automático utiliza um sistema a laser que detecta fluorescência para a separação dos fragmentos (TRALAMAZZA, 2011).

Os principais alvos para a detecção, ao nível de gênero, incluem o gene que codifica para RNA ribossômico 18S, DNA mitocondrial, região do espaço intergênico e regiões espaçadoras internas do DNA ribossômico (ITS). Duas regiões que flanqueiam os genes rDNA são os denominados Espaçadores Internos Transcritos ITS1 e ITS2 (Figura 11) (LARENA et al., 1999). A região ITS1 foi descrita por possuir uma rápida evolução e a região ITS2 uma evolução moderada para rápida. Estas regiões estão localizadas entre os genes 18S e 28S do

rDNA, são áreas de particular importância na discriminação entre espécies pois essas regiões possuem áreas de alta variabilidade (DE OLIVEIRA et al., 2005).

Algumas das extensas aplicações desta tecnologia em fungos entomopatogênicos são os estudos de discriminação espécies (MANICOM, et al., 1987; CARDER & BARBARA, 1991), patotipos (CODDINGTON et al., 1987), graus de virulência (COOK et al., 1989), estudo das origens geográficas (HARTUNG & CIVEROLO, 1997), de populações e mecanismos de recombinação genética (HULBERT & MICHELMORE, 1998).

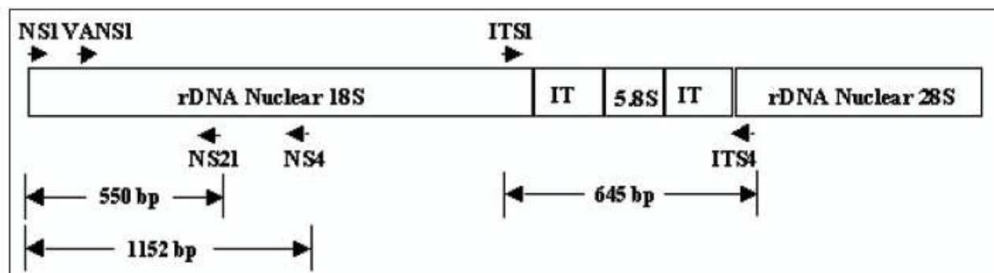


Figura 11. Localização dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação das diferentes regiões do rDNA de fungos. Fonte: DE OLIVEIRA et al. 2005.

As técnicas de amplificação e posterior sequenciamento do gene 5.8S com as regiões Intergênicas (ITS1 e ITS2) foram aplicadas para *Metarhizium*. A análise filogenética dos dados de sequenciamento mostrou que *M. anisopliae* constitui um grupo monofilético, e *M. flavoviride* e *M. album* representam duas linhas evolucionárias separadas (SOSA-GOMEZ et al., 1998). Dentro da espécie *M. anisopliae*, reconheceram-se dois grupos que não correspondem as duas variedades definidas por características morfológicas. Alguns isolados de *M. flavoviride* e *M. album* (CURRAN et al., 1994). Na análise do sequenciamento parcial do gene 28S em *Metarhizium*, Rakotoniarainy et al. (1994), mostraram que dois isolados da Nova Zelândia identificados como *M. anisopliae* diferiam muito dos outros isolados da mesma espécie. Também é possível utilizar a análise do sequenciamento do gene 18S do RNA ribossômico para avaliar a filogenia das espécies de Entomophthorales (NAGAHAMA et al., 1995).

Pela análise das sequências do rRNA 28S, confirmou-se a separação entre os gêneros *Beauveria* e *Tolypocladium*, que possuem características morfológicas similares (RAKOTONIARAINY et al., 1991). Para *B. brongniartii*, observaram, através do sequenciamento do fragmento 28S do rDNA amplificado por PCR, diferenças entre isolados relacionados à inserção do intron grupo-I (NEUVÉGLISE & BRYGOO, 1994). Um alto grau de polimorfismo entre isolados de *B. brongniartii* também foi observado através da digestão por enzimas de restrição dos produtos de amplificação dos ITS (NEUVÉGLISE et al., 1994).

Os genes do tRNA normalmente aparecem em um número de grupos repetitivos. Assim como os genes ribossômicos, os genes do tRNA apresentam-se separados por regiões de sequência e tamanho variáveis. *Primers* com sequências complementares de regiões conservadas dos genes de tRNA foram utilizadas para *Paecilomyces* spp. De geraram produtos de tamanhos variáveis entre isolados e espécies. Diferenças nesses produtos geralmente representam tamanhos diferentes entre as regiões Intergênicas. Os resultados obtidos sugerem que a identificação de fragmentos de tRNA polimórficos poderia significar um critério a ser

utilizado para melhorar a classificação de espécies no gênero *Paecilomyces*, quando as características morfológicas de estruturas assexuais utilizadas para os Hyphomycetes não podem claramente definir espécies (TIGANO-MILANI et al., 1995a, c, d).

2.10 Diversidade de Fungos Entomopatogênicos

O solo fornece um habitat para uma grande diversidade de microrganismos, que inclui espécies de fungos entomopatogênicos (KELLER & ZIMMERMAN, 1989). Os fungos entomopatogênicos estão globalmente distribuídos em quase todos os ecossistemas terrestres. A ocorrência e distribuição de fungos entomopatogênicos em solos são amplamente investigadas (MEDO & CAGÁN, 2011; MEYLING et al., 2011). O conhecimento da composição de espécies indígenas e distribuição de fungos patogênicos de insetos são essenciais para avaliar o potencial no controle biológico em um ecossistema específico (MEYLING & EILENBERG, 2006). A maioria dos estudos anteriores sobre a ocorrência e diversidade de fungos patogênicos de insetos no solo têm-se concentrado sobre as diferenças na composição de espécies entre as áreas definidas pelos tipos de habitat (por exemplo, solos cultivados, solos naturais, etc.). Quase 90% das espécies de artrópodes pragas gastam uma parte do seu ciclo de vida no habitat do solo (KAYA & GAUGLER, 1993), portanto, o solo é um importante reservatório de fungos entomopatogênicos e servem para controlar as populações de insetos pragas (HAJEK, 1997).

Metarhizium anisopliae (Metchnikoff) Sorokin caracteriza-se como uma espécie "agrícola", enquanto *Isaria* spp. são raros no campo, mas são frequentemente encontrados em ecossistemas florestais. Outros como *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vilemin pode ocupar uma ampla gama de habitats (MEYLING & EILENBERG, 2007). Keller et al. (2003), encontraram *M. anisopliae* em campos agrícolas e prados, mas esta espécie ocorreu em maiores densidades nos prados. No Canadá, *M. anisopliae* foi mais frequente em campos agrícolas comparado com habitats florestais (BIDOCHKA et al., 1998). No entanto, na Finlândia foi isolado mais frequentemente em partes meridionais do país, e a ocorrência não foi afetada pelos solos cultivados (VAINNINEN, 1996). Bidochka et al. (1998), encontraram *B. bassiana* associada à sombra e habitats não cultivados.

A diversidade é mais elevada em florestas tropicais, mas os fungos entomopatogênicos são também encontrados em habitats extremos: como na alta tundra ártica (EILENBERG, 2002) e Antártica (BRIDGE & WORLAND, 2004). Em geral, a tendência mundial de padrões de distribuição indica que os fungos entomopatogênicos nos Entomophthorales ocorrem principalmente em climas temperados, diminuindo em abundância nos trópicos e subtrópicos (HAJEK, 1997). Embora *N. tanajoae* é um importante patógeno de ácaros em climas tropicais (DELALIBERA et al., 2004). Os estágios sexuais dos Hypocreales são encontrados principalmente em climas tropicais enquanto que, os estágios assexuados são encontrados tanto em climas tropicais e temperados (VEGA et al., 2012).

Os fungos entomopatogênicos muitas vezes não são facilmente visíveis, fazer a avaliação de sua distribuição no ambiente é muito desafiador. As estruturas fúngicas emergentes de um cadáver hospedeiro são sinais viáveis da presença de um fungo, mas muitas vezes os hospedeiros são pequenos e morrem em um lugar discreto como: em baixo da terra, em habitats

aquáticos, ou embaixo do córtex. Algumas exceções são alguns Entomophthorales que causam a morte de hospedeiro em um ponto elevado sobre a vegetação para melhorar a dispersão conidial, segurando a fixação do cadáver ao substrato por produção de rizoides (ROY et al., 2006). Da mesma forma, alguns táxons dos Ascomycetos, geralmente nos estágios teleomorfos produzem um estroma visível que emerge de seus hospedeiros (VEGA et al., 2012).

Os estágios anamórficos de muitos fungos Ascomycetos ocorrem de forma generalizada na maioria dos ecossistemas terrestres. No entanto, as suas estruturas fúngicas são sutis na aparência e muitas vezes minúsculas, os hospedeiros são artrópodes infectados pelo fungo localizado. Além de cadáveres, os esporos de fungos microscópicos podem ser localizados fora de seus hospedeiros, mas podem ser encontrados nos compartimentos do ecossistema. Estes compartimentos incluem predominantemente o ambiente do solo, que geralmente fornece um habitat estável para populações fúngicas e proteção contra condições abióticas prejudiciais (VAN DER PUTTEN et al., 2001).

2.10.1 Padrões de distribuição dos fungos entomopatogênicos

Os métodos específicos são muitas vezes necessários para a detecção indireta da presença de fungos entomopatogênicos no ambiente do solo. O mais utilizado é o método isca com insetos, originalmente desenvolvido para o isolamento de nematoides entomopatogênicos, mas adaptado para o isolamento de fungos entomopatogênicos em amostras de solo usando larvas de *Galleria mellonella* (Lepidóptera) ou *Tenebrio molitor* (Coleóptera) como insetos isca (ZIMMERMANN, 1986; VANNINEN et al., 1989; STEENBERG, 1995; TKACZUK & MIETKIEWSKI, 1996). O princípio é forçar um inseto suscetível através de um substrato que contém micro-organismos patógenos, é intrigante e tornou-se amplo como um método padrão em pesquisas de comunidades de fungos entomopatogênicos em solos. A principal vantagem da utilização do método isca com insetos em amostra de solo é que este método isola seletivamente fungos entomopatogênicos que são biologicamente ativos. No entanto, diferentes insetos que são utilizados como isca não podem infectar-se pelos mesmos fungos entomopatogênicos (KLINGEN et al., 2002; GLOBE et al., 2010). Isto sugere que usando mais de um inseto hospedeiro como isca irá resultar em uma melhor avaliação da diversidade de fungos entomopatogênicos em solos. O método isca com insetos foi denominado semi-quantitativo (JARONSKI, 2007) ou meramente qualitativo (SCHEEPMAKER & BUTT, 2010).

O método de plaqueo com diluição em série de amostras do solo, em ágar seletivo irá fornecer informações quantitativas de densidades do inoculo fungico em amostras individuais. Além disso, o crescimento de uma colônia de fungos em meios artificiais não prova os postulados de Koch's de patogenicidade, porém o teste de Koch's deve ser realizado. As densidades de fungos entomopatogênicos ocorrem de forma natural nos solos com base nas técnicas de diluição em placa que foram revisadas por Scheepmaker & Butt (2010). As densidades de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram muito variáveis, mas os meios estavam no rango de 10^2 e 10^3 unidades formadoras de colônias (UFC)/g de solo (SCHEEPMAKER & BUTT, 2010). Keller et al. (2003), utilizaram ambos métodos para avaliar as comunidades de fungos entomopatogênicos no solo da Suíça e concluíram que o uso de *G. mellonella* como isca

em amostras de solo foi mais sensível para a detecção de fungos entomopatogênicos que a utilização de ágar seletivo. Como foi discutido anteriormente, os fungos entomopatogênicos são afetados por fatores abióticos e os táxons são afetados de forma diferente por esses fatores (ZIMMERMANN, 2007,2008; JARONSKI, 2007). Assim, as variações do tipo de solo é outra característica que afeta os padrões de distribuição de fungos entomopatogênicos. No entanto, Bidochka et al. (2001) sugeriram que os fatores abióticos prevalentes em campos agrícolas, tais como radiação UV elevada e temperaturas temporalmente altas, permitiram selecionar os genótipos de fungos capazes de ser resistentes a essas condições. Com efeito, um clado específico de *M. anisopliae* foi isolado com mais frequência a partir de solos agrícolas em Canada, e isolados deste clado foram mais tolerantes a temperaturas e radiação UV altas do que isolados de outro clado a partir de solos da floresta (BIDOCHKA et al., 2001). Isolados selecionados a partir de dois cladogramas foram identificadas como *M. robertsii* e *M. brunneum*, respectivamente (BISCHOFF et al., 2009).

2.10.2 Bioinseticidas baseados em fungos entomopatogênicos

Os primeiros testes com fungos que infectam insetos foram realizados pelo russo Metschnikoff no final do século XIX, quando avaliou o potencial de *Metarhizium anisopliae* para o controle de uma espécie de besouro. Somente um século depois os primeiros resultados práticos começaram a surgir, havendo atualmente vários inseticidas biológicos à base de fungos (micoinseticidas) em comercialização em diferentes países. Atualmente, a maioria dos biopesticidas baseados em fungos entomopatogênicos no mercado incluem *M. anisopliae* ou *B. bassiana*. Estas duas espécies, chamadas fungos “Muscardine” têm intervalos de hospedeiros amplos, apesar de que as diferentes cepas podem ser restritas no número de espécies de insetos que podem atacar. Estas espécies são relativamente fáceis de produzir, uma vez que produzem grandes quantidades de conídios assexuados na cultura, bem como em insetos. Geralmente tem baixa toxicidade para mamíferos e não causam nenhum dano ao meio ambiente (DE FARIA & MAGALHÃES, 2001).

Os fungos entomopatogênicos estavam entre os primeiros organismos que permearam o nosso meio ambiente a serem utilizados no controle biológico de pragas (HAJEK, 1997). Pela eficiência no controle de pragas e vectores, podem produzir-se bioinseticidas a partir de diferentes gêneros e espécies de fungos entomopatogênicos cujo ingrediente ativo é o próprio fungo (LOZANO et al., 2000). No total, 171 produtos foram identificados, com base em 12 espécies, principalmente *B. bassiana* (34%), *M. anisopliae* (34%), *Isaria fumorosea* (6%) e *B. brongniartii* (4%). A distribuição regional desses produtos foi como se segue: América do sul 42,7%, América do Norte 20,5%, Europa e Ásia 12,3% cada, América central 7%, África 2,9% e Oceania 2,3%. Apenas um dos produtos listados é baseado em um Entomophthorales (*Conidiobolus thromboides*) (DE FARIA & WRAIGHT, 2007). Exemplos desses produtos comprovadamente eficazes como bioinseticidas é Green Guard a base de *Metarhizium anisopliae* var, *Acridium* produzido para o controle de gafanhotos em culturas na Austrália, Ago biocontrol baseado em *Paecilomyces fumoserosus* na Colômbia, Micos Plag® baseado em *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces lilacinum*, produzido na

Colômbia para o controle de diversas pragas como tripés, pulgões, ácaros, nematoides e broca do café (RAMOS et al., 2000; VALLE et al., 2003).

No Brasil, *M. anisopliae* é usado em grande escala para controlar um complexo de cigarrinhas, incluindo *Mahanarva fimbriolata* (Stål) e *M. posticata* em cultivos de cana-de-açúcar, e *M. fimbriolata*, *Deoisflavopicta* (Stål) e *Notozulia entreriana* (Berg) em pastagens (ALVES, 1998; DE FARIA & MAGALHÃES, 2001). Produtos à base desse fungo representam 55% dos produtos comercialmente disponíveis ou em processo de registro, seguido por *B. bassiana* (30,0%), *Lecanicillium* spp. (7,5%) e “*Sporothrix insectorum*” (7,5%). Além das cigarrinhas, atualmente as principais pragas-alvo de micopesticidas são o percevejo-de-renda da seringueira, *Leptopharsa hevea*; a broca da bananeira, *Cosmopolites sordidus* (Germar); a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), ácaros *Tetranychidae* e *Eriophyidae* em plantas ornamentais e citros e a cochonilha *Orthezia praelonga* Douglas em citros (ALMEIDA & BATISTA, 2007). Cerca de 48 micopesticidas já foram disponibilizados no Brasil, sendo que 40 produtos encontram-se atualmente disponíveis no mercado e aproximadamente 19 nas biofábricas (empresas com fins lucrativos) estão em funcionamento (MICHEREFF et al., 2009).

Outros produtos da América Latina são myControl ES®, Naturalis-L®, Mycotech®, Conidi® (*Beauveria bassiana*), Tracer® (*Saccharopolyspora spinosa*), (OROZCO et al., 2000; RAMOS et al., 2000; VALLE et al., 2003). Com fungos entomopatogênicos têm desenvolvido uma série de produtos que são vendidos comercialmente no mundo, enquanto no México está limitado a alguns produtos, como o BEA-SIN®, SAP®-SIN, META-SIN-SIN® e VERTA® de Agrobionsa (TORRES et al., 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de estudo

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, na cidade de Seropédica/RJ.

3.2 Localização das coletas

A área de coleta das amostras de solo está localizada dentro do Parque Natural Municipal do Curió no município de Paracambi no estado do Rio de Janeiro, pertencente ao Bioma Mata Atlântica, situado aproximadamente entre as coordenadas geográficas, latitude: 22°26'34" S e longitude: 043°27'33" W e altitude média de 690 m, cobrindo uma área de aproximadamente 900 ha. A localização geográfica dos pontos de amostragem foi realizada através de dados obtidos a partir de GPS. Optou-se por uma extensão de 100 m com uma faixa de 2,5 m de largura nas laterais devido às condições de declividade da região (Figura 12).

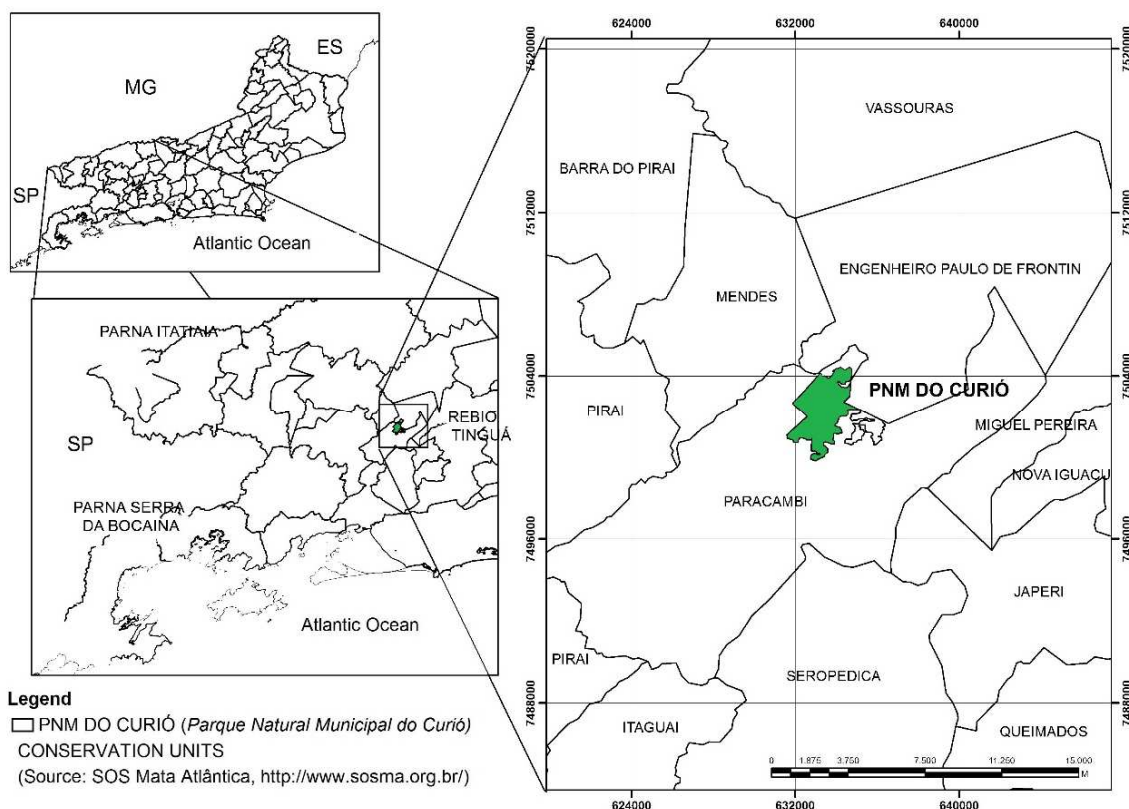


Figura 12. Localização geográfica do Parque Natural Municipal do Curió (PNM Curió), Município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Fonte: CYSNEIROS et al., 2015.

3.3 Amostragem do solo

As amostras foram coletadas em dois períodos diferentes, o primeiro período, seco, realizado no final de Agosto de 2014 (C1), e o segundo período, úmido, realizado no início de março de 2015 (C2). Foram selecionados 5 pontos de coleta com uma distância de 10 m entre eles, e a amostragem foi realizada de acordo com a técnica proposta por Almeida et al. (1997). O protocolo de amostragem foi o seguinte: 1- A vegetação da superfície do solo e serapilheira foram removidas; 2- de cada ponto foram coletadas 10 sub-amostras simples aleatórias na rizosfera, a uma profundidade de 5-20 cm com distância de 1 m entre cada sub-amostra e um volume de aproximadamente 250 g; as sub-amostras foram misturadas para formar 2,5 kg de amostra composta; 3- As amostras foram colocadas em sacos plásticos estéreis e transportadas para o laboratório em caixas térmicas com gelo, e armazenadas em câmara fria com temperatura de 4 °C até o processamento e análise das amostras.

A caracterização física e química do solo amostrado foi realizada pelo Laboratório de Fertilidade do Solo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A fertilidade do solo foi avaliada através dos seguintes parâmetros: pH em água (método do potenciômetro) (PANSU & GAUTHEYROU, 2006), teor de Al (trocável), H + Al, P, K, Ca, C/N e Mg (trocáveis), para profundidades de 5-20 cm para solo. Os métodos de análise de solos foram os adotados pela Embrapa (Embrapa, 1997). Enquanto que para a classificação, foi usada a metodologia do Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos.

3.4 Isolamento de fungos entomopatogênicos

Foram usados os seguintes métodos para o isolamento de fungos entomopatogênicos: 1- “método isca” com *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) e *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (MI) aplicando a metodologia descrita por Meyling & Eilenberg (2006) e Zimmermann (1986), 2- método de plaqueamento em meio seletivo Ágar Batata dextrose suplementado com Tegumento de inseto (*T. Molitor*) (BDA+TI) e Meio Martin (MS).

3.4.1 Meios seletivos (Martin e BDA+TI)

Cinco gramas de solo de cada amostra foram ressuspendidas em 45 mL de água peptonada 1% com 0,1 mL de Tween 80. A solubilização total foi feita por meio de um agitador a 150 rpm durante 30 min (FRAGA et al., 2012). Desta suspensão homogênea, foi retirada uma alíquota 1 mL e colocada em um tubo de 9 mL de água peptonada, e após agitação outra alíquota de 1 mL deste tubo foi retirada e colocada em outro tubo contendo 9 mL de água peptonada, e assim sucessivamente, formando as diluições 10^{-2} a 10^{-4} . Em meio Martin (Anexo A), foram inoculados 100 μ L das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Cada diluição teve três repetições e cada amostra teve três diluições plaqueadas, dando um total de 9 placas de petri por amostra de solo. Após os plaqueamentos, os fungos foram acondicionados em câmara de crescimento a uma temperatura de 25 °C durante 7 dias na ausência de luz. O mesmo procedimento foi repetido usando o meio seletivo modificado de acordo com Gonzalez et al. (2001). O meio seletivo foi

BDA suplementado com tegumento de inseto (*T. molitor*) (Anexo A). Para a preparação foram recolhidos insetos adultos da criação, desinfetados com hipoclorito de sódio a 1% e macerados em solução de tampão fosfato pH 7,0 e esterilizado em autoclave durante 20 min. Cinco gramas do macerado de insetos foram usados, o qual foi adicionado a 1L de meio de BDA, em seguida, a mistura foi esterilizada. Depois de esfriado até 60 °C, foram adicionados, 500 mg de Cloranfenicol.

Todas as placas foram observadas diariamente, as unidades formadoras de colônias (UFCs) por grama de solo seco foram contadas desde o dia 5 a 7 após da inoculação (FRAGA et al., 2012). Os fungos entomopatogênicos foram isolados em tubos contendo 5 mL do meio de cultura BDA (Anexo B). Feito o isolamento, os tubos foram acondicionados em câmara de crescimento a temperatura de 25 °C durante 7 dias. Uma vez constatado tal crescimento, os tubos contendo as colônias isoladas foram acondicionados em geladeira a uma temperatura de 4 °C, até a identificação das mesmas (MURO & LUCHI, 1989).

3.4.2 Iscas (*Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor*)

Foram usadas larvas de *G. mellonella* e *T. molitor* do quarto estágio, provenientes do Instituto Biológico em Campinas - SP. Antes da iscagem, as larvas de *G. mellonella* foram imersas em água destilada a 56 °C durante 15 s para minimizar a sua capacidade de produzir seda no solo (WOODRING & KAYA, 1998, Citado por: MEYLING & EILENBERG, 2006). Cinco larvas de cada espécie de inseto foram colocadas por separado num recipiente de plástico (2L) que continha 250 g de amostra de solo, umedecido e mantidas a 25 ± 1 °C, cada amostra teve três repetições (Figura 13). Cada recipiente foi invertido durante os primeiros 3 dias e posteriormente a cada 2 dias. Após 5 dias os recipientes foram avaliados diariamente para larvas mortas (MEDO & CAGÁN, 2011).

As larvas mortas foram removidas e esterilizadas com hipoclorito de sódio a 0,5% durante 1 min, e colocados em uma câmara úmida com temperatura de 25 ± 1 °C durante 7 dias para favorecer o desenvolvimento dos fungos entomopatogênicos. Após da esporulação do fungo, as larvas foram colocadas em meio BDA + Cloranfenicol (Anexo B) e incubou-se a 25 ± 1 °C durante 7 dias (MEDO & CAGÁN, 2011).



Figura 13. Método de isolamento de fungos entomopatogênicos com larvas isca: A) larvas de *Galleria mellonella*, B) *Tenebrio molitor*.

3.5 Identificação das espécies e preservação de fungos

As espécies de fungos obtidas por ambos métodos foram identificadas baseadas nas características macroscópicas e microscópicas usando chaves de identificação (SAMSON, 1988; SAMSON et al., 1988; HUMBER, 1998, 2012).

Os isolados de fungos entomopatogênicos mais virulentos foram caracterizados através da técnica molecular de sequenciamento de DNA, utilizando as regiões ITS1 e ITS4.

3.5.1 Análise morfológica

Os esporos dos isolados de fungos entomopatogênicos foram inoculados em 2,0 mL de ágar semi sólido. Com um alça de platino foi retirada uma pequena porção a qual, foi utilizada para inoculação no centro da placa de Petri contendo 20 mL dos meios de cultura: Agar Extrato de Malta (MEA) e ágar Batata Dextrose (BDA), em triplicata para cada meio de cultura (Anexo B). A inoculação ocorreu a 25 °C durante 7 dias.

Foram analisadas características macroscópicas, como: cor da superfície e reverso da colônia nos meios, diâmetro da colônia, presença ou ausência de pigmentos em MEA e BDA a 25 °C. Após o preparo de lâminas foram observadas as características microscópicas, como: diâmetro e forma das fiáldes, comprimento e largura do conidióforo, tamanho, forma e textura dos conídios e cor das hifas. Todas as espécies foram observadas com um microscópio óptico modelo OLYMPUS (CX31-P).

3.5.2 Análise molecular

A caracterização molecular dos isolados mais virulentos de fungos entomopatogênicos foi realizada pelo laboratório de Fitopatologia e Biologia Molecular no Instituto Biológico, São Paulo.

3.5.2.1 Extração de DNA

Após o cultivo dos isolados em meio de Batata Dextrose Ágar (BDA), por 7 dias, a 25 °C, extraiu-se o DNA, segundo o método CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987).

O micélio foi macerado sob nitrogênio líquido (100-200 mg), foram adicionados 600 µL do tampão de extração CTAB (Anexo D) e incubados sob agitação a 65 °C durante 20 min. Foi adicionada a solução aquosa 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e agitado em vortex por alguns segundos. Centrifugou-se a 4 °C por 10 min a 12000 rpm, 500 µL da fase aquosa foram transferidos para um microtubo novo tipo *ependorf* de 1,5 mL e foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol (300 µL) e misturou-se por inversão. Centrifugou-se a 4 °C por 10 min a 12000 rpm. Em seguida o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Os

ácidos nucleicos foram lavados com 500 µL de etanol 70%, centrifugou-se a 4 °C por 5 min a 12000 rpm. Descartou-se o sobrenadante cuidadosamente para não perder o pellet. O pellet foi secado a temperatura ambiente e depois em centrifuga ao vácuo. Posteriormente foi ressuspenso em 50 µL de água MilliQ autoclavada. A presença do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio sob luz ultravioleta.

3.5.2.2 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A caracterização molecular dos isolados entomopatogênicos foi feita utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores da região Internal Transcribed Spacers (ITS), ITS1 (5'-TCGGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990), gerando produtos de tamanho aproximado de 500 pb.

Para a reação de amplificação (PCR) foram utilizados 2 µL de DNA (entre 100 e 200 ng); 10 µL tampão Taq para PCR (5X); 6 µL de MgCl₂(25mM); 1 µL de dNTP (10mM); 5 µL GoTaq DNA Polimerase; 1,2 µL de DMSO; 1,5 µL de cada iniciador: ITS1 f(direto) e ITS4 (reverso) (100 pmol/µL) para um volume final de 50 µL. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC100 (MJ Research). As condições de amplificação foram: uma etapa de pré-desnaturação a 94 °C por 2 min, 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 seg, anelamento 56 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 4 min. Um controle negativo sem DNA foi incluído nas amplificações da PCR, ao final das reações, o produto foi mantido a -20 °C. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% submetidos a uma voltagem de 80 volts por 30 min. Em seguida, o gel foi visualizado em transiluminador (Alpha Innotech Corporation) e as bandas foram comparadas com um padrão de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

3.5.2.3 Sequenciamento dos fragmentos amplificados

Para o processo de sequenciamento foi feito primeiramente uma nova amplificação em placas de PCR, utilizando 6,68 µL do produto de PCR purificado, 0,32 µL do iniciador ITS1, 2 µL do reagente BigDye 3.1 (AppliedBiosystems) e 1 µL de tampão 5X para um volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram: uma etapa de pré-desnaturação a 94 °C por 2 min, 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 seg, anelamento 56 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 4 min.

Após a reação as placas de PCR foram retiradas do termociclador e as amostras foram precipitadas adicionando 40 µL de isopropanol 75%. O DNA foi precipitado por centrifugação a 4.000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado foi lavado com 100 µL de isopropanol 75% e depois descartado o sobrenadante. O precipitado foi secado através de incubação em estufa a 37°C por 30min. Após foi ressuspenso em 2µL de formamida, desnaturado a 95 °C e submetido a sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador automático ABI3500 (Applied Biosystems) utilizando os mesmos iniciadores (ITS1 e ITS4).

3.5.2.4 Análise Filogenético (Arvore)

Construiu-se a árvore filogenética com sequências similares das regiões ITS1 e ITS4 dos isolados e sequências de diferentes espécies de fungos obtidas no GENBANK/NCBI, através do método de Maximum Likelihood (ML), para avaliar a robustez da topologia, a árvore foi avaliada pelo método de Jukes-Cantor com 1000 repetições de bootstrap, e a análise filogenética foi conduzida no programa Molecular Análise Genética Evolutiva-MEGA 6.0.

3.5.3 Preservação

Para preservar as espécies de interesse, foram utilizados dois métodos: conservação por suspensão em água destilada em tubos *Eppendorfs*. Descrito por Castellani em 1939 (JONG & ATKINS, 1986), sendo um método muito usado e com porcentagens maiores de viabilidade para fungos ascomicetos e fungos mitosporicos (SMITH & ONIONS, 1994). Consistiu em suspender em 1 mL de água destilada estéril células da cultura como conídios, esporos, picnídios, esclerócios, etc. Paralelamente, foram inoculados esporos em tubos contendo 5 g de solo estéril, autoclavados três vezes em intervalos de 24h (MURO & LUCHI, 1989). Após a inoculação do fungo foi armazenado em refrigeração a 4 °C.

3.6 Avaliação patogenicidade de fungos isolados em meio seletivo (Postulados de Koch's)

3.6.1 Preparação do inoculo fúngico

Para preparar o inoculo, os isolados foram cultivados em Ágar Arroz (Anexo B) e incubados a 25 °C até esporulação. Os conídios foram removidos com alça de platino estéril (0,1 a 1 g), e adicionados em 30 mL de água destilada estéril e Tween 80 a 0,1%. A concentração de conídios foi determinada utilizando uma câmara de contagem de Neubauer, e foi ajustada por diluição a 1×10^7 conídios.mL⁻¹ para provocar mortalidade em *G. mellonella* e *T. molitor*, foram feitas três repetições de 10 larvas para cada espécie de inseto (FAJARDO & CANAL, 2011).

3.6.2 Métodos para avaliar a patogenicidade

O método para avaliar a patogenicidade consistiu na imersão das larvas por um minuto (1') na suspensão; posteriormente as larvas tratadas foram transferidas para câmara úmida com alimento e incubadas durante 10 dias a 25 °C. Utilizou-se o controle de larvas tratadas com água destilada e 0,1% de Tween 80. As avaliações foram realizadas por meio da observação diária da mortalidade de larvas e através da observação dos sintomas e sinais da doença. Uma vez no tegumento do inseto foi observada a mumificação foram transferidos para meio BDA + Cloranfenicol e as características macroscópicas e microscópicas dos fungos entomopatogênicos foram descritas (RODRIGUEZ et al., 2006; DIAZ et al., 2010).

3.7 Caracterização fisiológica

Esta caracterização é baseada na avaliação do desempenho e do número de conídios, viabilidade deles (percentagem de germinação) (CANEDO et al., 2004). Os isolados foram reativados em meio BDA+TI.

A concentração de esporos foi determinada tomando uma amostra aleatória de cada isolado por remoção dos conídios com alça de platino estéril (0,1 a 1 g), os conídios foram adicionados em um tubo de ensaio contendo 10 mL de água destilada estéril e 0,5 mL de Tween 80 ao 0,1%, a concentração de conídios foi ajustada em câmara de contagem de Neubauer até obter uma concentração de 10^7 conídios.mL⁻¹ (Figura 14), a qual foi utilizada para o teste de viabilidade (GONZÁLEZ et al., 1993).

A seguinte fórmula foi utilizada calcular a concentração de esporos: Esporos/mL = número de esporos contados \times 50.000. A contagem foi repetida cinco vezes para cada cepa de fungo entomopatogênico.

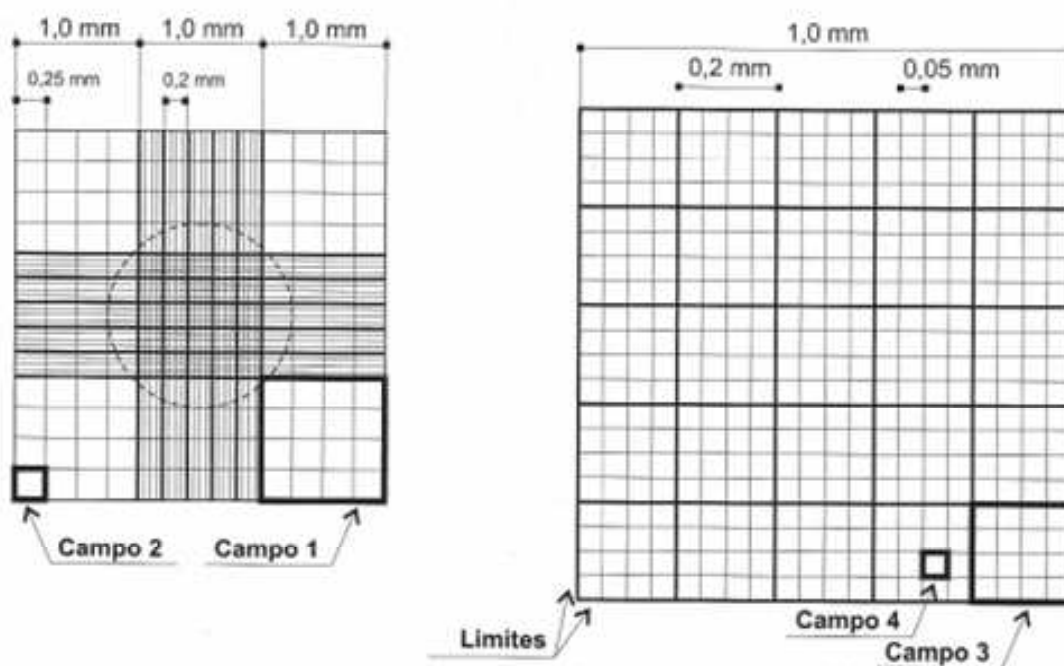


Figura 14. Câmara de Neubauer com os respectivos campos de contagem para conídios dos fungos entomopatogênicos. Fonte: ALVES & MORAES, 1998.

3.7.1 Avaliação da viabilidade

A avaliação da viabilidade foi realizada para cada isolado utilizando dois meios de cultura: 1- A germinação foi determinada no meio de cultura Agar-Agua 2% Segundo a metodologia de Gonzalez et al. (2001), (Anexo B) e 2- A germinação foi determinada no meio BDA+TI de *T. molitor*. Cinco alíquotas da suspensão fúngica (10^7 conídios.mL⁻¹) foi distribuída sobre o meio de cultura. Em seguida, as alíquotas foram espalhadas com uma alça de Drigalsky

previamente flambada e resfriada, após a inoculação o fungo foi incubado a 25 °C. Finalmente a contagem conídios foi efetuada num microscópio ótico a 40 X, após 24 h.

Os esporos foram considerados viáveis, se o tubo de germinativo era duas vezes o diâmetro do esporo, a contagem foi de 400 esporos por repetição, a viabilidade devia estar acima de 90% para que os isolados foram considerados eficazes (MILNER et al., 1991). As variáveis avaliadas foram: número de conídios germinados, número de conídios não germinados e conídios totais. Três repetições de cada um dos isolados por método e por concentração foram realizadas.

3.8 Avaliação patogenicidade dos fungos entomopatogênicos isolados usando o método (MI) e (MS) (Postulados de Koch's)

3.8.1 Preparação de Inoculo fúngico

Para preparar o inoculo, os isolados foram cultivados em Ágar Arroz (Anexo B) e incubados a 25 °C até esporulação. Os conídios foram removidos com alça de platino estéril (0,1 a 1 g), e adicionados em 30 mL de água destilada estéril e Tween 80 a 0,1%. A concentração de conídios foi determinada utilizando uma câmara de contagem de Neubauer, e foi ajustada por diluição a 1×10^7 conídios.mL⁻¹ para provocar mortalidade em *G. mellonella* e *T. molitor*, foram feitas três repetições de 10 larvas para cada espécie de inseto (FAJARDO & CANAL, 2011); a fim de determinar a variabilidade na patogenicidade dos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

3.8.2 Métodos para avaliar a patogenicidade

O método para avaliar a patogenicidade consistiu na imersão das larvas por um minuto (1') na suspensão; posteriormente as larvas tratadas foram transferidas para câmara úmida com alimento e incubadas durante 10 dias a 25 °C. Utilizou-se o controle de larvas tratadas com água destilada e 0,1% de Tween 80. As avaliações foram realizadas por meio da observação diária da mortalidade de larvas e através da observação dos sintomas e sinais da doença. Nesse período, foi calculada, para cada isolado, a mortalidade acumulada [= (número de indivíduos mortos/número total de indivíduos) *100] (RODRIGUEZ et al., 2006; DIAZ et al., 2010; FAJARDO & CANAL, 2010).

3.8.3 Avaliação da infecção das larvas de *G. mellonella* e *T. molitor*

O processo de germinação e colonização de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em larvas de *G. mellonella* e *T. molitor* foi observado em um microscópio e estereoscópio. As larvas infectadas foram imersas em hipoclorito de sódio 0,5% por um minuto (1') e lavadas com água destilada estéril. Após a secagem das larvas infectadas foram abertas longitudinalmente usando uma lâmina de bisturi estéril, para visualização interna do micélio do fungo. A germinação do fungo

foi ressaltada pelo aparecimento de manchas pretas na superfície do inseto e produção de antibióticos foi observada pela mudança de cor das larvas (EYAL et al., 1994).

3.9 Teste de virulência

Neste trabalho foram testados os fungos *M. anisopliae* (Ma58MI, Ma10MI, Ma11MI e Ma12MI) e *B. bassiana* (Bb27MI, Bb11MI, Bb79MI e Bb53MI) que foram caracterizados no teste de patogenicidade.

Os fungos selecionados que estavam armazenados foram cultivados em meio arroz parboilizado até esporulação, e foram preparadas suspensões de conídios em água destilada estéril e Tween 80 a 0,1 % na concentração de 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9 conídios.mL⁻¹, foram feitas três repetições por tratamento, a unidade experimental foi de 10 larvas do quarto estágio de *G. mellonella* e *T. molitor*.

As larvas foram imersas por um minuto (1') em cada suspensão; posteriormente as larvas tratadas foram transferidas para uma câmara úmida com alimento. Utilizou-se o controle de larvas tratadas com água destilada e 0,1% de Tween 80. Foram efetuadas observações diárias por um período de 10 dias. Foi determinada a concentração letal (CL) de 50 (CL₅₀) e 90% (CL₉₀), e o tempo letal (TL) de 50 (TL₅₀) e de 90% (TL₉₀), para cada isolado.

3.10 Análise Estatística

3.10.1 Isolamento de fungos entomopatogênicos com meios seletivos

O delineamento para o experimento em Meio seletivo foi inteiramente casualizado com 15 repetições e os tratamentos consistindo do fatorial 2 x 2, sendo dois meios de cultura (Martin e BDA+TI) e as duas épocas de avaliação (seca e chuvosa). As medias dos dados de UFC foram avaliadas pelo teste F da análise de variância e a frequência de ocorrência dos fungos (*B. bassiana*, *M. anisopliae* e *P. lilacinus*) e das combinações entre eles (Bb+Ma) foram comparadas pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, a 5% de probabilidade.

3.10.2 Isolamento de fungos entomopatogênicos pelo método isca

Os dados de: porcentagem de larvas mortas por fungos, porcentagem de larvas vivas, porcentagem de larvas mortas por outros organismos, e frequência da ocorrência dos fungos (*B. bassiana*, *M. anisopliae* e combinações) foram avaliados conforme o delineamento inteiramente casualizado, com 15 repetições (larvas), em esquema fatorial 2 x 2, totalizando 4 tratamentos. Os tratamentos consistiram das combinações entre os níveis dos fatores tipos de isca (*G. mellonella* e *T. molitor*) e épocas de avaliação (seca e chuvosa). A comparação das medias entre os níveis fatores foi realizada por meio do teste não paramétrico de Wilcoxon, a 5% de probabilidade, por não atender as pressuposições de uma análise paramétrica (análise de variância).

3.10.3 Avaliação da Virulência

Os resultados da mortalidade dos insetos *G. mellonella* e *T. molitor* foram analisados conforme o delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições, em esquema fatorial 5 x 8, correspondendo à 5 concentrações (1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9) e 8 espécies de fungos (Bb11MI, Bb27MI, Bb53MI, Bb79MI, Ma10MI, Ma11MI, Ma12MI e Ma58MI). Após a realização da análise de variância, as médias entre os níveis dos fatores, às 192 horas de avaliação, foram comparadas pelo teste de Scott Kant, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o programa SISVAR (Ferreira, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de fungos entomopatogênicos

Foram isolados 216 fungos entomopatogênicos do Bioma Mata Atlântica. Foi observado deste total de isolados, 88,0% provenientes do método de isca com larvas e 12,0% provenientes do método com meios seletivos.

Considerando o método de isolamento usando meios seletivos (Martin e BDA+TI), obtiveram-se diferenças significativas ao nível de 5% entre as épocas e entre os meios de cultura usados (Figura 15). No meio seletivo Martin observou-se maior UFCs na época chuvosa (65×10^2 UFC/g solo) em relação à época seca, em que as UFCs foram menores (60×10^2 UFC/g solo). Também houve diferença estatística entre as épocas para o meio BDA suplementado com tegumento de *T. molitor*, com os períodos chuvoso e seco apresentando $4,7 \times 10^3$ e 4×10^3 UFC/g solo, respectivamente. Entre os meios, o Martin apresentou médias de UFC (g/solo) significativamente superior ao BDA suplementado com tegumento de *T. molitor* tanto no período chuvoso ($6,5 \times 10^3$ e $4,7 \times 10^3$ UFC/g solo, respectivamente) quanto no seco ($5,9 \times 10^3$ e 4×10^3 UFC/g solo, respectivamente). Na primeira coleta (Agosto/2014), a média das temperaturas foi $16,7$ °C e da umidade relativa foi de 66,6%. Já para a segunda coleta (Março/2015) a temperatura média foi $23,8$ °C e a umidade relativa foi de 73,5%. O clima predominante da região (PNM do curió) é caracterizado como Aw, de acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger (PEEL et al., 2007).

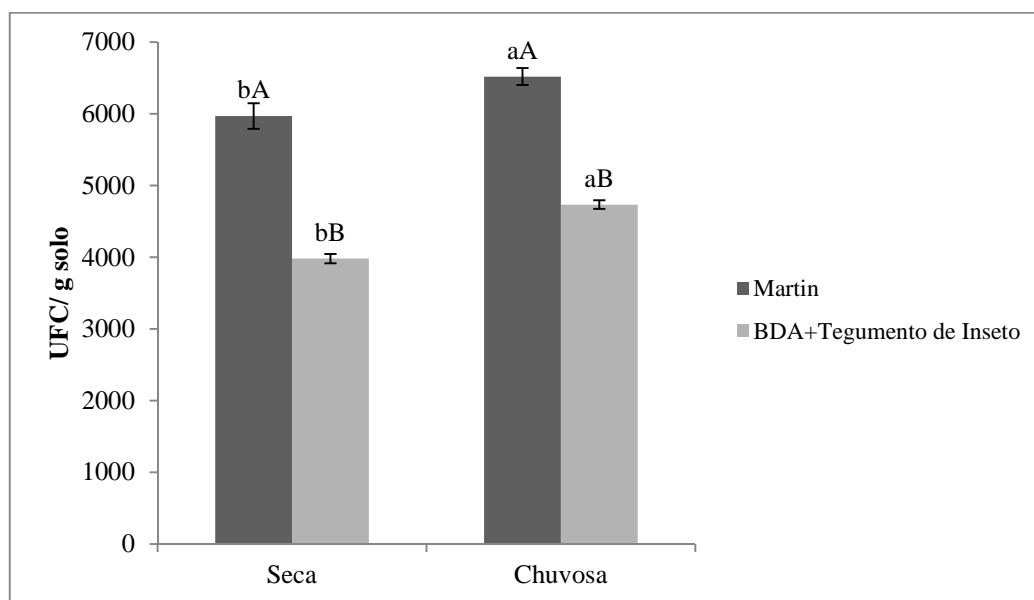


Figura 15. Unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos no meio seletivo Martin e BDA+TI nas épocas seca e chuvosa. Barras seguidas de letras iguais, minúsculas entre épocas e maiúsculas entre meios de cultura, não diferem entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

O isolamento usando meios seletivos proporcionou uma menor taxa de detecção geral (12,03%). Dessa forma os isolados foram normalmente encontrados em maior quantidade no período chuvoso (Tabela 1). *Beauveria bassiana* foi menos prevalente no meio Martin,

observou-se uma frequência de ocorrência de 13,3% no período seco e de 33,3% no período chuvoso. *Paecilomyces lilacinus* foi observado nas placas ocorrendo em 6,7% no período chuvoso quando usado o meio Martin, com relação ao meio BDA+TI ocorreu no período chuvoso em 33,3% e no seco em 13,3%. No entanto, esta espécie não foi incluída em outras análises porque não é considerada patógena de insetos. A frequência de ocorrência de *B. bassiana* no período seco (33,3%) foi maior que no período chuvoso (20,0%) usando o meio BDA+TI. A maior ocorrência de *M. anisopliae* (26,7%) foi obtida no período chuvoso quando usado o meio BDA+TI. Não foi observado crescimento de *Metarhizium anisopliae* no meio Martin. As combinações entre *B. bassiana* e *M. anisopliae* tiveram maior ocorrência também no período chuvoso (26,7%), provenientes do meio BDA+TI.

Tabela 1. Frequência de ocorrência de fungos entomopatogênicos em 15 amostras de solo coletadas no Parque Natural Municipal do Curió e reveladas usando o método de isolamento com meio de cultura Martin e BDA+ TI, nas épocas seca e chuvosa.

| Espécie de Fungo | Seca | | | | Chuvosa | | | |
|------------------|--------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| | Martin | | BDA+ TI | | Martin | | BDA+ TI | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Bb | 2,0 | 13,3 | 5,0 | 33,3 | 5,0 | 33,3 | 3,0 | 20,0 |
| Ma | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 13,3 | 0,0 | 0,0 | 4,0 | 26,7 |
| Pl | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 13,3 | 1,0 | 6,7 | 5,0 | 33,3 |
| Combinações | | | | | | | | |
| Bb+Ma | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 6,7 | 0,0 | 0,0 | 4,0 | 26,7 |

Beauveria bassiana (Bb), *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Paecilomyces lilacinum* (Pl).

As densidades de fungos entomopatogênicos ocorrem de forma natural no solo com base nas técnicas de diluição em placa que foram revisadas por Scheepmaker & Butt (2010). As densidades de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram muito variáveis, mas os meios estavam no rango de 10^2 e 10^3 unidades formadoras de colônias (UFC)/g de solo (SCHEEPMAKER & BUTT, 2010). Medo & Cagan (2011), obtiveram uma taxa de detecção de fungos entomopatogênicos de 70% usando meio seletivo com Dodine e a espécie mais prevalente foi *M. anisopliae* (37%). As densidades máximas de esporos foram de $5,4 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ para *B. bassiana*, $8,13 \times 10^2$ UFC.g⁻¹ para *M. anisopliae* e $7,89 \times 10^2$ UFC.g⁻¹ para *I. fumosorosea*. Rocha et al. (2013), determinaram a ocorrência natural de *Metarhizium* spp. em solos do Cerrado Brasileiro usando meio seletivo com Dodine, onde foram obtidos 12 isolados.

Há uma escassez de informações relacionadas com o uso de BDA suplementado com tegumento de inseto (*T. molitor*) para o isolamento de fungos entomopatogênicos. O isolamento de espécies de fungos entomopatogênicos foi provavelmente devido à presença de nutrientes proporcionados pela cutícula do inseto tais como quitina, proteínas e alguns lipídeos no meio de cultura, tornando-se um meio seletivo para espécies de fungos com atividade enzimática (quitinases, lipases, proteases).

Uma ampla gama de fungos que habitam no solo pode crescer em meios artificiais, por tanto os meios de cultura específicos foram desenvolvidos para o isolamento de fungos entomopatogênicos (GOETTEL & INGLIS, 1997). Os fungos entomopatogênicos pertencentes aos Hypocreales crescem relativamente lento nos meios de isolamento em comparação com os

fungos saprófitos do solo. Assim, o conteúdo dos meios para o isolamento de fungos entomopatogênicos específicos do solo deve ter uma fonte de nutrientes para seu crescimento e um agente antimicrobiano em concentrações apropriadas para inibir o crescimento dos fungos saprófitos e permitir o crescimento de fungos entomopatogênicos (LUZ et al., 2007). Um meio seletivo usado para o isolamento de fungos entomopatogênicos foi baseado em um meio utilizado para o isolamento geral de fungos do solo que continha glicose, oxgall e peptona com rosa de bengala, cloranfenicol e cicloheximida como antibióticos (VENN & FERRON, 1996). Doberski & Tribe (1980), desenvolveram um meio baseado em ingredientes similares substituindo o rosa de bengala por cristal violeta. Este meio foi usado para isolar *B. bassiana* e *M. anisopliae* do córtex do olmo e solo. Um meio com suco V-8, glicose, extrato de levedura, e oxgall como nutriente base, modificado com cicloheximida, sulfato de estreptomicina e tetraciclina, foi desenvolvido para o isolamento de *B. tenella* em solo (JOUSSIER & CATROUX, 1976). O meio Sabouraud-dextrose e oxgall foi usado como outro meio base modificado com penicilina G, sulfato de estreptomicina, oxitetraciclina, cicloheximida e binapracril (Morocide, um fungicida) desenvolvido para o isolamento em solo (LINGG & DONALDSON, 1981).

Beilharz et al. (1982), descobriu que a dodine (n-dodecylguanidine acetate) inibe seletivamente alguns fungos de solo, mas quando adicionado a taxa formulada 1 g/L (Cypex 65 WP, American Cyanamid) permitiu o isolamento de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. O meio ágar farinha de aveia (OTA) com 0,46 g/L dodine e 0,38 g/L benomilo permitiu a recuperação de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em altas frequências na ausência de outros fungos do solo (CHASE et al., 1986). Vários fungicidas (tais como Oxgall, sulfato cúprico, cobre (II), cloreto de cobre (CuCl₂), benomil e dodine) e antibióticos (tais como cloranfenicol, tetraciclina e estreptomicina) foram utilizados separadamente ou em combinação para detectar vários fungos entomopatogênicos em meios seletivos (KELLER et al., 2003; MEYLING & EILENBERG, 2006; FERNANDES et al., 2010). Entre eles, dodine e CuCl₂ foram avaliados como os mais eficazes para o isolamento de fungos entomopatogênicos do solo (SHIMAZU & SATO, 1996). Cada meio foi desenvolvido em resposta a necessidade de buscas para avaliar vários efeitos dos tratamentos na sobrevivência destes entomopatogênicos.

Segundo o método de isolamento usando larvas como isca a ocorrência dos fungos entomopatogênicos em *T. molitor* foi de 61,3% no período seco e 64,0% no período chuvoso. Em *G. mellonella* a ocorrência de fungos entomopatogênicos foi de 60,0% e 68,0% no período seco e chuvoso respectivamente. Porém não foram observadas diferenças estatísticas da ocorrência dos fungos entomopatogênicos entre os períodos seco e chuvoso (Figura 16). Apesar deste trabalho não ter sido encontradas diferenças estatísticas entre os períodos a umidade tem sido apontada por vários autores como um dos principais fatores que afetam o crescimento e a sobrevivência de fungos entomopatogênicos no solo (STUDDERT et al., 1990; EKESI et al., 2003). Ignoffo & Garcia (1992), destacaram que a umidade é um requisito fundamental para a germinação de conídios e sobrevivência de fungos entomopatogênicos. De acordo com Keller & Bidochka (1998), solo com umidade reduzida pode contribuir para o decréscimo na abundância de fungos. Krueger & Roberts (1997), reportaram ao solo como um ambiente favorável ao uso de fungos entomopatogênicos devido à umidade alta e estável. Segundo Keller & Zimmerman, 1989, a temperatura também é um dos fatores ambientais mais importantes que

afetam a densidade dos fungos patógenos de insetos como, *B. bassiana* no solo. A temperatura ótima para o desenvolvimento e atividade dos fungos é aproximadamente 24 °C (STUDDERT & KAYA, 1990); temperaturas altas por cima de 27 °C inibe o desenvolvimento do micélio e esporos (AREGGER-ZAVADIL, 1992; KESSLER et al, 2003). A quantidade de esporos do fungo de interesse presente no solo é variável e depende de condições específicas de cada ecossistema.

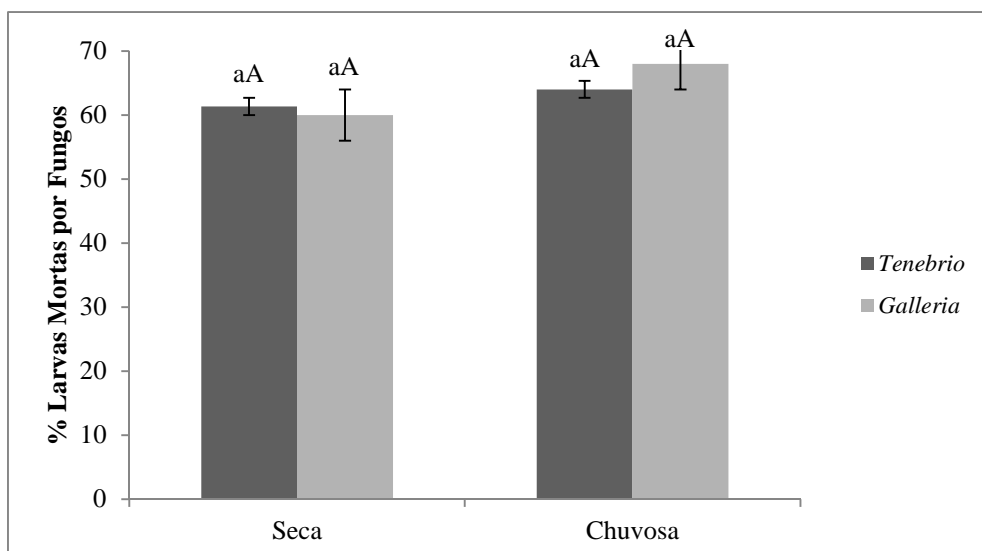


Figura 16. Porcentagem de mortalidade das larvas (*G. mellonella* e *T. molitor*) por fungos entomopatogênicos no período seco e chuvoso. Barras seguidas de letras iguais, minúsculas entre épocas e maiúsculas entre meios de cultura, não diferem entre si pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, a 5% de probabilidade.

A maior ocorrência de fungos entomopatogênicos foi observada usando larvas de *G. mellonella*. Verificou-se que o método de isca com *G. mellonella* (ZIMMERMANN, 1986), tem sido um método muito sensível para a detecção de fungos entomopatogênicos em amostras de solo (KELLER et al., 2003). Levantamentos detalhados da diversidade de fungos entomopatogênicos usando insetos isca em amostras de solo foi investigada por Chandler et al. (1997), Steenberg (1995), Hughes et al. (2004) e Meyling & Eilenberg (2006).

A porcentagem de larvas vivas foi calculada para cada espécie de inseto em cada período. No período seco a porcentagem de larvas vivas de *T. molitor* foi de 14,7% e de 12,0% para *G. mellonella*. No período chuvoso a porcentagem de larvas vivas para *T. molitor* foi de 14,7% e 9,3% para larvas de *G. mellonella*. Não havendo diferenças estatísticas entre os períodos (Figura 17).

Observou-se um aumento na mortalidade de larvas de *G. mellonella* e *T. molitor* por outros microrganismos no período seco sendo de 28,0% e 24,0% respectivamente (Figura 18). Provavelmente as condições do ecossistema no período seco favoreceu o desenvolvimento de outros organismos entomopatogênicos. A mortalidade no período chuvoso foi de 21,3% para larvas de *T. molitor* e 22,7% para larvas de *G. mellonella*. Não foram obtidas diferenças estatísticas significativas.

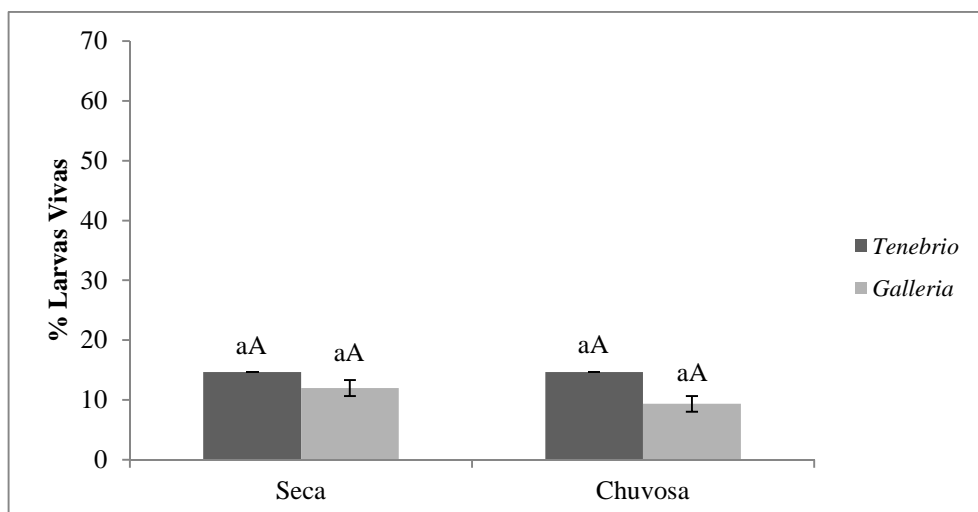


Figura 17. Porcentagem larvas vivas (*G. mellonella* e *T. molitor*) no período seco e chuvoso. Barras seguidas de letras iguais, minúsculas entre épocas e maiúsculas entre meios de cultura, não diferem entre si pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, a 5% de probabilidade.

Estes resultados corroboram com os de Medo & Cagan (2011), onde observaram que, quatro espécies de fungos entomopatogênicos foram detectadas em amostras de solo na Eslováquia pelo método isca (MI) com *G. mellonella*: *Beauveria bassiana* (31% de amostras), *Metarhizium anisopliae* (8%), *Isaria farinosa* (6%) e *Isaria fumosorosea* (6%). Apenas três espécies foram detectadas com meio seletivo (cicloheximida e dodine): *B. bassiana* (36% de amostras), *M. anisopliae* (37%), e *I. fumosorosea* (9%).

Vanninen (1996), detectou fungos em 38,6% nas amostras de solo da Finlândia, enquanto Quesada-Moraga et al. (2007), encontraram os fungos em 71,7% das amostras de solo em Espanha e Chandler et al. (1997), em 15,8% das amostras de solo no Reino Unido, todos usando o MI com *G. mellonella*. Keller et al. (2003), utilizaram meio seletivo juntamente com o MI usando *G. mellonella* e encontraram fungos entomopatogênicos em 96% das amostras de solo da Suíça, concluíram também que a iscagem com *G. mellonella* em amostras de solo tende a ser mais sensível para a detecção de fungos entomopatogênicos que a utilização de ágar seletivo. Hughes et al. (2004), determinaram a diversidade de fungos entomopatogênicos em solos de floresta tropical em Panamá usando larvas de *G. mellonella* e *T. molitor* e meio seletivo com dodine, onde obteve 58 isolados de *Metarhizium anisopliae* usando o método isca, e uma cepa de *B. bassiana* isolada com meio seletivo presente só em uma amostra de solo.

No Brasil foi determinada a ocorrência de *Metarhizium* spp. usando ninfas de *Triatoma infestans* (Hemíptera: Reduviidae) e meio seletivo modificado com dodine: um total de 107 (22%) isolados de *Metarhizium* foram obtidos em solos do cerrado brasileiro, no estado de Goiás. A maioria dos isolados (95) foram obtidos usando as ninfas de *T. infestans* e 12 isolados foram obtidos em meio seletivo (ROCHA et al., 2013). Gonzalez et al. (2014), determinou a abundância e diversidade de fungos entomopatogênicos em solo agrícolas na região do México, usando larvas de *G. mellonella* como isca. Apenas fungos entomopatogênicos do gênero *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp. foram recuperados. Em geral, um total de 121 isolados foram registados, sendo 112 do gênero *Beauveria* e 9 do gênero *Metarhizium*.

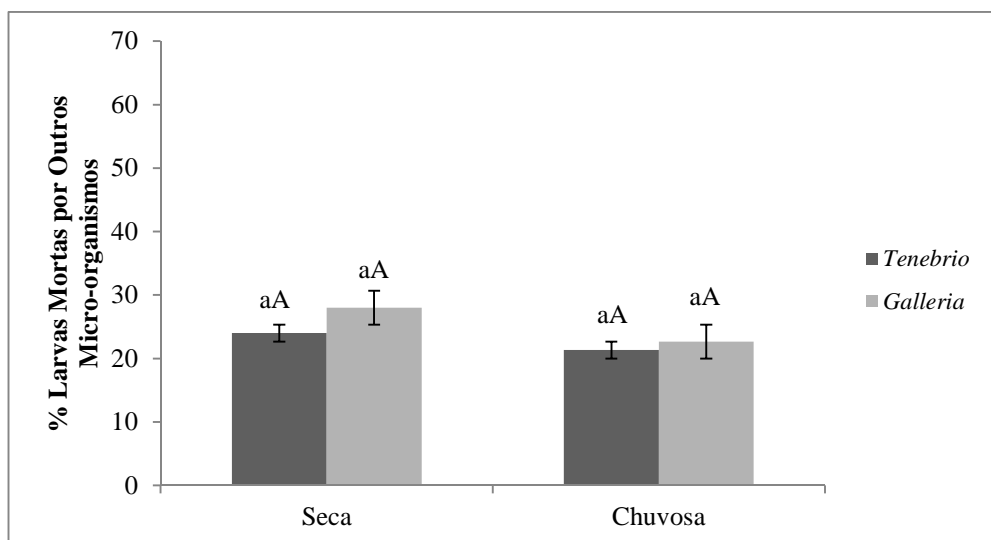


Figura 18. Porcentagem de mortalidade das larvas (*G. mellonella* e *T. molitor*) por outros microrganismos no período seco e chuvoso. Barras seguidas de letras iguais, minúsculas entre épocas e maiúsculas entre meios de cultura, não diferem entre si pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, a 5% de probabilidade.

Os fungos entomopatogênicos foram encontrados em todas as amostras, a ocorrência das espécies isoladas diferiu consideravelmente segundo as espécies de insetos usadas como isca (Tabela 2). A espécie mais predominante foi *Beauveria bassiana* isolada com *G. mellonella* no período seco e chuvoso (36,0% e 36,0% respectivamente). *Beauveria bassiana* em larvas de *T. molitor* ocorreu no período seco 25,33% e chuvoso 24,0%. *Metarhizium anisopliae* foi mais isolado em larvas de *T. molitor* no período seco 33,3% e chuvoso 32,0%. Em larvas de *G. mellonella* o *M. anisopliae* ocorreu em 18,7% e 18,7% nos dois períodos avaliados. Foi apresentada co-infecção de uma larva por dois ou mais entomopatogênicos. Foi obtido, um total de 168 isolados, dos quais 91 pertencem a espécie *B. bassiana* e 77 a espécie *M. anisopliae*. Outros isolados do gênero *Fusarium* e *Trichoderma* foram obtidos, mas estes são considerados como patógenos oportunistas (SUN & LIU, 2008). Conforme Sun et al. (2008) estudaram a ocorrência e diversidade de espécies de fungos associadas a insetos no solo usando *G. mellonella*. Os fungos associados a artrópodes foram classificados em: (1) patógenos de insetos que inclui os fungos: *B. bassiana*, *Lecanicillium lecanii*, *M. anisopliae*, *P. farinosus* e *P. fumosoroseus*, (2) patógenos oportunistas como: *Absidia* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Mortiella* sp., *Mucor* spp., *Penicillium chysogenum*, *P. thomii* e *Penicillium* spp., e (3) os colonizadores secundários que são: *F. aqueductum*, *F. proliferatum*, *Rhizopus oryzae*, *Phialophora phaeophora*, *Trichoderma álbum*, *T. harzianum* e *Williopsis satumus*. As espécies de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. foram descartados neste trabalho mas serão usados para futuros análises. Espécies de fungos entomopatogênicos do gênero *Nomurea* e *Verticillium* foram isolados em combinação com outros fungos em larvas de *G. mellonella*. Geralmente, de um total de 168 isolados obtidos, 91 isolados pertencem a espécie *B. bassiana* e 77 a espécie *M. anisopliae*.

Tabela 2. Frequência de ocorrência de fungos entomopatogênicos em 15 amostras de solo coletadas no Parque Natural Municipal do Curió e usando o método de isolamento com larvas (*T. molitor* e *G. mellonella*), nas épocas seca e chuvosa.

| Espécie de Fungo | Seca | | | | Chuvosa | | | |
|------------------|-------------------|------|----------------------|------|-------------------|------|----------------------|------|
| | <i>T. molitor</i> | | <i>G. mellonella</i> | | <i>T. molitor</i> | | <i>G. mellonella</i> | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Bb | 19,0 | 25,3 | 27,0 | 36,0 | 18,0 | 24,0 | 27,0 | 36,0 |
| Ma | 25,0 | 33,3 | 14,0 | 18,7 | 24,0 | 32,0 | 14,0 | 18,7 |
| Combinações | | | | | | | | |
| Ma+F | 1,0 | 1,3 | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 2,6 | 1,0 | 1,3 |
| Bb+F | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 1,3 | 0,0 | 0,0 | 4,0 | 26,7 |
| V+F | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 2,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Bb+Ma | 1,0 | 1,3 | 4,0 | 5,3 | 1,0 | 1,3 | 6,0 | 8,0 |
| N+F+T | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,0 | 4,0 |

Beauveria bassiana (Bb), *Metarhizium anisopliae* (Ma), *Paecilomyces lilacinum* (Pl), *Fusarium* sp. (F), *Verticillium* sp., (V), *Nomurea* sp. (N) e *Trichoderma* sp. (T).

Segundo Zimmermann (2008), o hospedeiro mais susceptível para *I. farinosa* e *I. fumosorosea* corresponde a espécies de Lepidóptera. Conforme Zimmermann (2007), para *M. anisopliae* são espécies de Coleópteros. Para *B. bassiana* mais de 700 espécies de hospedeiros de artrópodes foram reportadas. A maior abundância de espécies de *Metarhizium* foi apresentada em larvas de Coleóptera, e a maior ocorrência de *Beauveria* foi apresentada em larvas de Lepidóptera. Isto se pode atribuir à efetividade do método isca com insetos susceptíveis, onde se requer de uma quantidade de propágulos viáveis para garantir a infecção e devem estar na ordem de 10^4 unidades por inseto como mínimo (BATEMAN et al. 1996; MOORE & CAUDWELL, 1997). Sabe-se que o estabelecimento de populações de fungos entomopatogênicos no solo está determinado tanto pelas propriedades físicas e químicas do solo como pelas da cepa fúngica (RHODES & SMITH, 1992). Também existe a possibilidade de que os micro-organismos competidores com sua produção de metabolitos ativos afetem a viabilidade dos conídios fúngicos desejados (JENKINS & GRZYWACZ, 2000). Por isso, o método isca precisa de uma concentração alta de esporos viáveis do microrganismo de interesse no solo.

Beauveria bassiana (Bals) Vuill. assim como *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Metarhizium flavoviride* Gams e Rozsypal estão entre os fungos entomopatogênicos mais usualmente encontrados na natureza (ELOSEGUI, 2006). Sun et al. (2008), afirma que *B. bassiana* e *I. fumosorosea* foram isolados mais frequentemente a partir de um ecossistema "natural" que em solos cultivados. Embora não consistentemente assim, *M. anisopliae* parece ser mais frequente em solos de habitats cultivados. Esta observação tem sido interpretada como que as populações de *M. anisopliae* mostram mais resistência a perturbação, que é uma característica dos habitats cultivados (BIDOCHKA et al, 1998; MEYLING & ELLENBERG, 2007). Em florestas tropicais, *M. anisopliae* pode ser facilmente isolado a partir de amostras de solo usando larvas de *G. mellonella* e larvas de *T. molitor* (HUGHES et al., 2004). Todos os fungos encontrados neste estudo também foram registrados em outras partes do mundo (VANNINEN et al., 1989; VANNINEN et al, 1995; BIDOCHKA et al., 1998; KUBATOVA & DVORAK, 2005; MEYLING & EILENBERG, 2006; AUNG et al., 2008; SUN et al., 2008;

MEYLING et al., 2011; SANCHEZ et al., 2011). A prevalência de espécies de *Beauveria* em habitats naturais tem sido estudada em Europa (MIETKIEWSKI et al., 1991; STENZEL, 1992; VANNINEN, 1995; KLINGEN et al., 2002), em América (BIDOCHKA et al., 1998) e Austrália (RATH et al., 1992). Assim, o conhecimento da composição local de espécies de fungos entomopatogênicos no solo é necessário para avaliar o potencial deste grupo de inimigos naturais como um reservatório para o controle de insetos praga em um ecossistema específica.

A ocorrência de *B. bassiana* foi dinâmica e persistente. Isto sugere que altas densidades de *B. bassiana* persistiram após o estabelecimento dentro de uma área. A persistência permanente de *B. bassiana* em altas densidades no solo depende de interações com o ambiente circundante. Alguns fatores abióticos foram demonstrados para a influência da persistência de *B. bassiana* no solo. Por exemplo, umidade alta e temperaturas baixas reduzem a sobrevivência de conídios e a infecção em provas de laboratório (LINGG & DONALDSON, 1981). O conteúdo de matéria orgânica e atividade biológica adversa do solo afeta a persistência de *B. bassiana* devido a efeitos antagônicos de outros microrganismos do solo (LINGG & DONALDSON, 1981; KELLER & ZIMMERMAN, 1989). Vanninen et al. (2000), mostraram que o aumento de conídios de *B. bassiana* persistiu mal no solo finlandês em comparação com *M. anisopliae*. Além disso, Gottwald & Tedders (1984), encontraram que *B. bassiana* cresceu e proliferou bem a partir de insetos hospedeiros infectados no solo. Isso sugere que *B. bassiana* se baseia em infecções repetidas de hospedeiros suscetíveis para manter níveis de alta densidade em solos (FARGUES & ROBERT, 1985), como demonstrado para *B. brongniartii* (Saccardo) Petch (KESSLER et al., 2004).

A maior ocorrência de *B. bassiana* no solo pode ser devida a sua preferência neste ambiente natural. Esta preferência também foi descrita por vários autores incluindo Vanninen (1996), Chandler et al. (1997) e Quesada-Moraga et al. (2007). *Metarhizium anisopliae* é geralmente mais resistente a distúrbios agrícolas e vários estudos reportaram que é significante maior a prevalência em áreas cultivadas que em habitats naturais (BIDOCHKA et al., 1998; HUMMEL et al., 2002; QUESADA-MORAGA et al., 2007; SUN et al., 2008). Meyling & Eilenberg (2006b), reportaram uma baixa frequência destas espécies em solos cultivados em Denmark, mas encontraram que *M. flavoviridae* foi significativamente mais comum que o usualmente reportado. No nosso estudo se encontraram várias espécies de *M. anisopliae* com uma ocorrência de 45,83% e espécies de *B. bassiana* ocorrendo em um 54,16% usando o método isca.

Encontramos diferenças significativas entre os resultados obtidos pelos métodos usados. O método com meio seletivo não foi capaz de detectar altas frequências de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, embora o método com larvas isca resultou em maiores taxas de detecção de espécies de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Keller et al. (2003), reportou a habilidade para detectar *M. anisopliae* e Landa et al. (2002), detectou três espécies pertencente ao gênero *Isaria/Paecilomyces* em meio seletivo que continha dodine (50-100 mg l⁻¹). Em outros estudos *M. anisopliae* foi isolado aproximadamente quatro vezes mais frequentemente pelo meio seletivo que pelo método isca com *G. mellonella*, embora maior sensibilidade do método isca com *G. mellonella* foi reportada por vários autores e as diferenças foram relatadas também para *B. bassiana* (BRUCK, 2004; IMOULAN et al., 2009; KELLER et al., 2003; LANDA et al., 2002).

Porque diferentes resultados foram obtidos por diferentes métodos, a seguinte questão é levantada: é um método simples e suficiente para avaliar a presença de fungos entomopatogênicos no solo? Se sim, qual método deve ser preferido? Principalmente, a escolha do método deve refletir efeitos de investigação especial. Quase todos os métodos atualmente utilizados mostram alguma seletividade a espécies. Os métodos de iscagem usadas com mais frequência podem detectar relativamente um amplo espectro de espécies, mas detectam apenas os isolados patogênicos para insetos isca. Variações foram detectadas quando se usaram diferentes espécies de insetos isca (ENKERLI et al., 2005; KLINGEN et al., 2002; VANNINEN, 1996). *Galleria mellonella* foi usualmente usada como inseto isca e, assim, os resultados devem ser comparáveis. No entanto, diferentes condições de iscagem foram utilizadas em quase todos os estudos, e variações em temperatura, o número de larvas e a quantidade do solo usado pode influenciar os resultados (VANNINEN, 1996; CHANDLER et al., 1997; BIDOCHKA et al., 1998; TKACZUK et al., 2000). Além, diferentes respostas imunes dos indivíduos ou populações podem causar algumas variações nos resultados (TINSLEY et al., 2006).

Em contraste com o método isca, os meios seletivos podem ser preparados de forma semelhante em diferentes laboratórios e isso iria facilitar comparações entre resultados de diferentes grupos. Atualmente, os meios seletivos descritos, são usualmente capazes de detectar confiantemente um estreito espectro de entomopatógenos, tipicamente, apenas uma espécie pertencente a um género. Muitos fungos entomopatógenos ou contaminantes tinham padrões claros de suscetibilidade ou resistência a diferentes concentrações de fungicidas, que são os principais fatores dos meios seletivos (LUZ et al., 2007). A Dodine é usualmente adicionado ao meio seletivo e foi recentemente mostrado ser um fator limitante no crescimento de algumas espécies de *Metarhizium* (RANGEL et al., 2010). Assim, mais de um meio é necessário para obter uma visão realista sobre a composição de espécies de fungos entomopatogênicos no solo. Apesar de métodos melhorados recentemente descritos para o isolamento de fungos por Ghanbary et al. (2009), grande atenção tem sido focada na detecção de microrganismos no solo por análise de DNA (Métodos baseados em PCR). Pode-se detectar o DNA de fungos entomopatogênicos isolados do solo ou plantas com relativamente boas taxas de detecção. Além disso, a quantificação e análise de genótipos fúngicos são possíveis se são selecionados os marcadores apropriados (ENKERLI & WIDMER, 2010).

4.2 Análise Físico Químico

Na Tabela 3 são apresentados os valores dos nutrientes, Na, Al, H + Al, S, Corg, P, K e os valores pH, para o solo na primeira e segunda coleta, respectivamente. De maneira geral, observou-se que na segunda coleta ocorreram os maiores valores de pH, K, Na, Ca, S, Mg e H + Al.

A ocorrência de *M. anisopliae* e *B. bassiana* não foi afetada pelas propriedades do solo. O solo analisado apresentou uma textura franco-arenosa e um teor de C orgânico de 2,012% na primeira coleta e 2,118% para a segunda coleta (Tabela 3). Vários autores (LINGG & DONALDSON, 1981; FARGUES & ROBERT, 1985; KELLER & ZIMMERMAN, 1989), relataram que o teor de matéria orgânica e a atividade biológica do solo afeta adversamente a

persistência de *Beauveria* spp. devido aos efeitos antagônicos de outros micro-organismos do solo.

Tabela 3. Análise físico químico do solo realizada em cada período de coleta (seca e chuvosa).

| Elementos Químicos | Textura | Na | Ca | Mg | K | H+Al | Al | S | pH | Corg % | P mg/L |
|------------------------|----------------|------|------|------|------|------|------|------|-----|--------|--------|
| | | | | | | | | | | | |
| Primeira Coleta | Franco-arenosa | 0,04 | 3,46 | 1,54 | 0,13 | 2,22 | 0,55 | 5,16 | 5,3 | 2,016 | 17,4 |
| Segunda Coleta | Franco-arenosa | 0,06 | 3,86 | 2,56 | 0,71 | 6,14 | 0,20 | 7,19 | 5,5 | 2,128 | 16,6 |

Segundo Medo & Cagan (2011), foi encontrada maior ocorrência de *B. bassiana* e *I. farinosa* em solos com alto teor de matéria orgânica e solos minerais de textura fina. Por outro lado, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* foram menos comuns em tais condições. Quesada-Moraga et al. (2007), encontraram *M. anisopliae* em solos de textura grossa com alto conteúdo de matéria orgânica e *B. bassiana* foi encontrada em solos com alto teor de argila, pH maior e teor de matéria orgânica inferior 1-3% (41,3% ocorrência) ou 2-3% (25% de ocorrência), sendo as duas últimas variáveis importantes na presença dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium*. Lanza et al. (2004) investigaram a influência do tipo e compactação do solo na sobrevivência do fungo *M. anisopliae*, e observaram maior crescimento no solo de textura areno-argilosa com maior teor de matéria orgânica (4,9%) e no solo de textura arenosa média, mas com conteúdo de matéria orgânica relativamente baixo (2,6%). Devido ao fato dos solos arenosos conterem proporcionalmente grande quantidade de poros médios e grandes (OLIVEIRA, 2001), possivelmente isso facilita o crescimento hifas, permitindo exploração mais efetiva dos recursos nutricionais e melhor troca gasosa, o que contribuiu para o crescimento do fungo. A umidade é um fator que está relacionado com a textura do solo, porém Studdert et al. (1990), encontraram que nos solos argilosos saturados com água (capacidade de retenção de água > 35%) parecem inibir a infecção de *B. bassiana*, enquanto que em solos arenosos não ocorreu inibição.

De acordo com estudos de Storey et al. (1990), mostraram que a temperatura e a umidade do solo são fatores fundamentais para a formação de conídios no solo. A alta umidade e temperatura do solo reduzem a sobrevivência de conídios e infecciosidade de *Beauveria* spp. (LINGG & DONALDSON, 1981). Além disso, a água em forma de chuva tem uma influência sobre o movimento vertical dos fungos entomopatogênicos em solos. Naturalmente, a distribuição de conídios de fungos no solo irá impactar a eficácia do micopatógeno como biocontrolador. Alguns estudos têm sugerido que o movimento de conídios difere de acordo com a composição do tipo de solo (KELLER & ZIMMERMANN, 1989). Storey (1987), usando conídios de *B. bassiana* em uma formulação como um pó molhável mostrou que a porcentagem de propágulos do fungo recuperados a partir da primeira camada do solo (5 cm de profundidade), foi positivamente correlacionada com a composição da areia e negativamente com argila ou limo.

Os fungos, em geral, são mais tolerantes à acidez do que a alcalinidade (Foth, 1984). Neste estudo o pH obtido na primeira e segunda coleta foi de 5,3 e 5,5 respectivamente (Tabela 3). Segundo Medo & Cagan (2011) encontraram uma correlação significativa entre o pH do solo e a presença de fungos. *M. anisopliae* ocorreu mais frequentemente em solos com pH

alcalino enquanto *B. bassiana* e *I. farinosa* preferiram um ambiente ácido. Na Espanha, Quesada-Moraga et al. (2007), encontraram que *B. bassiana* teve a maior ocorrência (52,9%) com $\text{pH} \geq 8-8,5$ e *M. anisopliae* apresentou alta ocorrência com $\text{pH} < 7$ (27,8%) e $\geq 8-8,5$ (38,9%). Estudos in vitro sobre a gama de pH ótimo para o crescimento de ambas as espécies indicam que, apesar da variabilidade intraespecífica, *M. anisopliae* se adapta melhor que *B. bassiana* em solos levemente ácidos (PADMAVATHI et al., 2003; ISSALY et al., 2005), o que poderia explicar porque em nosso estudo *B. bassiana* e *M. anisopliae* predominaram neste solo. Além disso, embora Rath et al. (1992), descobriram que um isolado específico de *M. anisopliae* foi capaz de crescer através de uma ampla faixa de pH (4 a 7,8). Karthikeyan et al. (2008) acharam que, o pH ótimo para o cultivo de *B. bassiana* variou de 6 a 8. Dillon & Charnley (1985), estudaram o efeito do pH sobre a germinação e crescimento de *Metarhizium* sp. em que constatou-se que a germinação e crescimento foi possível entre pH 3 a 10 mas, o pH ótimo para o crescimento foi próximo de 6, enquanto que a germinação mostrou um pico amplo de pH 5 a 7.

4.3 Caracterização fisiológica (Porcentagem de germinação)

A taxa de germinação de esporos foi utilizada como uma medida da viabilidade (SOETOPO 2004). Os esporos foram considerados viáveis se o comprimento do tubo germinativo foi duas vezes o diâmetro do esporo. Foi avaliada a viabilidade dos 216 isolados de fungos entomopatogênicos, e foram selecionados os que apresentaram uma viabilidade superior a 90% como os mais eficazes. Diferenças significativas foram constatadas na viabilidade de conídios, no qual foram observados dois grupos. No primeiro, apresentam-se os fungos inoculados em meio Ágar Água, com baixa viabilidade e, no segundo grupo, encontram-se os inoculados em BDA+TI de (*T. molitor*) com alta viabilidade (Tabela 4).

Observaram-se hifas mais grossas, longas e escuras e uma maior germinação para os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* quando foi usado o meio BDA+TI. Estes resultados mostraram que a germinação é mais rápida quando se utilizam substratos enriquecidos, o que traduz em uma maior virulência do patógeno. Isto foi comprovado por outros pesquisadores que há encontrado estímulo ao processo germinativo em outros fungos, ao adicionar ao médio de cultura tegumento de insetos (AL-AIDROOS & ROBERTS, 1978; DILLON & CHARNLEY, 1990; EL SAYED et al., 1991; EL SAYED et al., 1993a,1993b).

A germinação foi menor quando usado o meio de cultura Ágar-Água (AA), um meio ausente de nutrientes. Alves (1998), ressalta que a germinação de conídios de fungos entomopatogênicos pode ser influenciada pela presença de nutrientes no meio de cultura, tais como aminoácidos, esterol, hexoses, entre outros. Tendo em vista que o fungo *B. bassiana* é mais exigente que o fungo *M. anisopliae*, essa pode ser a provável explicação de uma maior germinação do primeiro fungo. Francisco et al. (2006), comprovaram que meios ricos em nutrientes como BDA, BDA + 1% de extrato de levedura e meio completo (AZEVEDO & COSTA, 1973) favorecem a germinação e meios pobres como ágar-água e meio mínimo (PONTECORVO et al., 1953) promovem baixa germinação de isolados entomopatogênicos. Nesse sentido, Boucias et al. (1988), estudando processos iniciais sobre a infecção de fungos entomopatogênicos, reportaram que conídios podem ter atividades enzimáticas diversas,

especialmente sobre carboidratos e proteínas. A síntese e a secreção de tais enzimas dependem dos mecanismos de indução/repressão gênicos, altamente influenciados pelo meio de cultura em que os mesmos se encontram.

Tabela 4. Germinação de conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em meio de cultura BDA+TI e Agar Agua após de 24h de crescimento.

| Isolado | Germinação (%) | |
|----------------------|----------------|--------|
| | Agar Agua 2% | BDA+TI |
| <i>B. bassiana</i> | | |
| Bb11MI | 94,5 | 100 |
| Bb27MI | 95 | 100 |
| Bb41MI | 93,75 | 99,5 |
| Bb72MI | 92,75 | 99,5 |
| Bb79MI | 95 | 99,75 |
| Bb90MS | 95,75 | 100 |
| Bb51MI | 93,25 | 99 |
| Bb53MI | 96,25 | 100 |
| Bb101MS | 97,5 | 100 |
| Bb32MI | 98 | 100 |
| <i>M. anisopliae</i> | | |
| Ma10MI | 94,5 | 100 |
| Ma11MI | 93 | 99,75 |
| Ma12MI | 91,5 | 98 |
| Ma13MI | 95,75 | 100 |
| Ma71MS | 92,75 | 98 |
| Ma26MI | 93,75 | 99,25 |
| Ma58MI | 94,25 | 99 |
| Ma37MI | 91 | 97,75 |

Hallsworth & Magan (1995), testando isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok), *B. bassiana* e *Paecilomyces farinosus* (Holmsk.) Brown & Smith, constataram o crescimento do tubo germinativo mais rapidamente nos conídios que possuíam altas concentrações intracelulares de glicerol e eritritol; visto que as concentrações intracelulares desses componentes são determinadas pelo meio de cultura do fungo, foi possível a correlação do meio de cultura utilizado com a viabilidade dos conídios pelos autores.

Para um controle efetivo, os conídios, que são as unidades infectantes, devem possuir alta viabilidade (isto é, alta habilidade para germinar) e virulência contra o inseto praga a ser controlado (DAOUST & ROBERTS, 1982). A germinação do conídio é um fator de grande importância na determinação da virulência de um fungo entomopatogênico. Drummond et al. (1987), demonstraram que isolados de *L. lecanii* mais virulentos germinaram mais rápido na superfície do inseto que isolados pouco virulentos.

4.4 Avaliação patogenicidade dos fungos entomopatogênicos isolados usando o método (MI) e (MS) (Postulados de Koch's)

Nos experimentos realizados *in vitro*, por meio da imersão de larvas de *G. mellonella* e *T. molitor* foi possível estimar a porcentagem da mortalidade causada por todas as cepas; com base na atividade inseticida observada foram selecionadas as cepas Bb79MI, Bb27MI, Bb11MI e Bb53MI de *B. bassiana* e Ma11MI, Ma10MI, Ma12MI e Ma58MI de *M. anisopliae* que apresentaram uma alta mortalidade de larvas de *G. mellonella* e *T. molitor* de 80 a 96,66% após 10 dias.

O Gráfico 5 mostra a análise de mortalidade diária acumulada de *G. mellonella* após 10 dias da inoculação com as cepas de *B. bassiana* a uma concentração de 1×10^7 conídios.mL⁻¹. Todas as cepas causaram doença e morte dos insetos. A maior mortalidade para as larvas de *G. mellonella* e *T. molitor* foi apresentada com as cepas Bb79MI (93,33% e 86,66% respectivamente) e Bb53MI (96,66% e 90% respectivamente). Os primeiros sintomas da doença sobre a população de *G. mellonella* foi iniciada 24h após a inoculação, observando-se uma perceptível diminuição da atividade do inseto. As cepas Bb101MS e Bb90MS foram as menos patogênicas para tanto para as larvas de *G. mellonella* como para *T. molitor* (Figura 19 A-B).

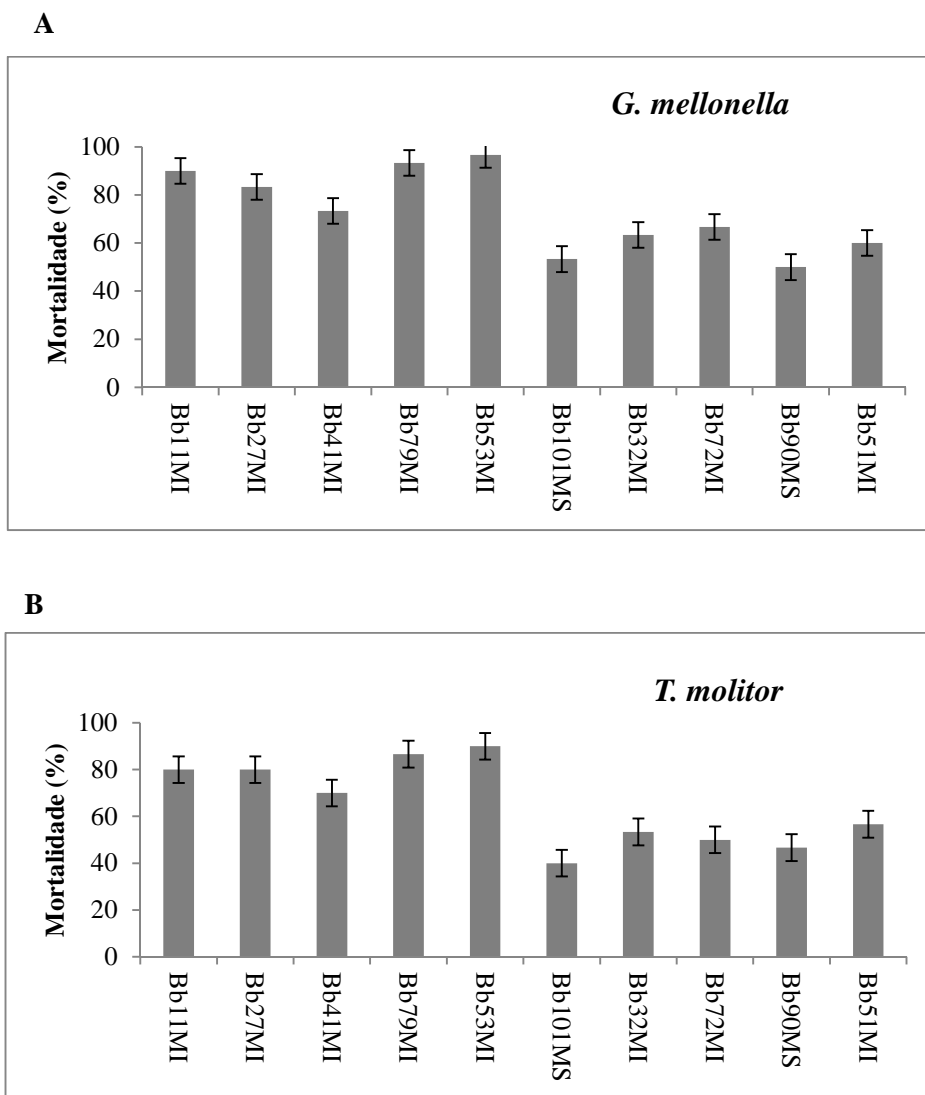


Figura 19. Porcentagem de mortalidade de larvas *G. mellonella* e *T. molitor* após 10 dias de inoculação com cepas de *B. bassiana* (\pm erro padrão da média).

Khalid et al. (2012), pesquisaram 90 isolados de *B. bassiana* quanto à produção de proteases e lipases, mostrando variações significativas na atividade enzimática entre os isolados. Os isolados selecionados evidenciaram alta virulência contra larvas de *G. mellonella* do quarto estágio. Os isolados BbaAUMC3076 e BbaAUMC3263 tiveram mortalidade de 100% em concentrações de $5,5 \times 10^6$ conídios/mL⁻¹, $5,86 \times 10^5$ conídios/mL⁻¹, respectivamente. Safavi (2010), determinou a patogenicidade de *B. bassiana* sobre larvas de *T. molitor* usando uma concentração de esporos de 1×10^7 conidia/mL⁻¹. O cálculo do valor de TL₅₀ para DEBI008 e BEH (novo isolado) foi de 2,72 e $4,38 \pm 0,3 \pm 0,6$ dias, respectivamente. Estes dados mostraram que o novo isolado era menos virulento do que DEBI008 contra *T. molitor*.

Com base nos resultados, as cepas de *M. anisopliae* mais virulentas contra *G. mellonella* foram Ma10MI, Ma13MI e Ma58MI (Figura 20 A), a mortalidade foi de 90%, 83,33% e 80% respectivamente após 10 dias da inoculação nos insetos. A cepa menos virulenta foi Ma71MS (50%). Resultados semelhantes foram obtidos por Neupane (2005), o qual obteve estirpes de *M. anisopliae* com mortalidade de 96,6% sobre *G. mellonella*, depois de 10 dias após ter sido aplicada a uma concentração de 1×10^7 conídios/mL⁻¹. Além disso, Khalid et al. (2012) e Klingen et al. (2002), obtiveram estirpes com mortalidade de 100% sobre *G. mellonella* a uma concentração de $5,5 \times 10^6$ e $3,6 \times 10^6$ conídios/mL⁻¹, respectivamente. Torres da Cruz et al. (2014), avaliaram a patogenicidade de 40 isolados monospóricos nativos de *M. anisopliae* sobre larvas de *G. mellonella* usando uma concentração de 2×10^7 conídios/mL⁻¹. Os isolados de *M. anisopliae* mais patogênicos, e que superaram o 80% de mortalidade foram: MaA4(5), MaA1(4) e MaA3(7), com 100, 88,9 e 83,3%, respectivamente.

Tenebrio molitor foi usado como hospedeiro do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* em diversos estudos de virulência (SOSA GÓMEZ, 1983; VANNINEN et al., 1989) e é considerada uma espécie modelo para este tipo de estudos devido a sua facilidade de manipulação, a condições e requisitos simples, e ciclo de vida simples (SEVALA et al., 1994). De acordo com os resultados de mortalidade acumulada, as cepas com maior virulência sobre larvas de *T. molitor* foram Ma58MI, Ma10MI, Ma11MI e Ma12MI; a cepa menos virulenta foi o Ma71MS que apresentou uma mortalidade de 53,33% (Figura 20 B). Estes resultados concordam com os de Ann et al. (2013), que avaliaram a virulência de isolados de *Metarhizium* spp. sobre larvas de *T. molitor* com uma concentração de 1×10^7 conídios/mL⁻¹; os isolados UP001 e AB001, causaram $100\% \pm 0\%$ de mortalidade após 7 dias de inoculação, seguido pelo isolado JK001 com $87.5\% \pm 14.43\%$ de mortalidade de larvas. O isolado F52 (Met52 ®) causou a menor virulência, apresentando uma mortalidade para as larvas de $81.25\% \pm 37.5\%$. No estudo feito por Safavi et al. (2007), com o objetivo de comparar a virulência de uma cepa de *M. anisopliae* sobre larvas de *T. molitor*, os autores reportaram que ao variar a relação C/N do meio de cultura se obtêm TL₅₀ que vão de 2.68 a 4.14 dias, também é possível encontrar TL₅₀ que vão desde 3.7 a 5.57 dias segundo a cepa de *M. anisopliae* e ao número de subculturas em meios artificiais. Outros autores compararam a patogenicidade dos fungos entomopatogênicos usando larvas de *G. mellonella* e *T. molitor*, Oreste et al. (2012), avaliaram a patogenicidade de 23 isolados de *B. bassiana* e 4 de *M. anisopliae* sobre usando uma suspensão fúngica de 2×10^6 conídios/mL⁻¹. Bidochka et al. (2002), determinaram a patogenicidade de 61 isolados de *B. bassiana* usando uma concentração de 1×10^7 conídios/mL⁻¹.

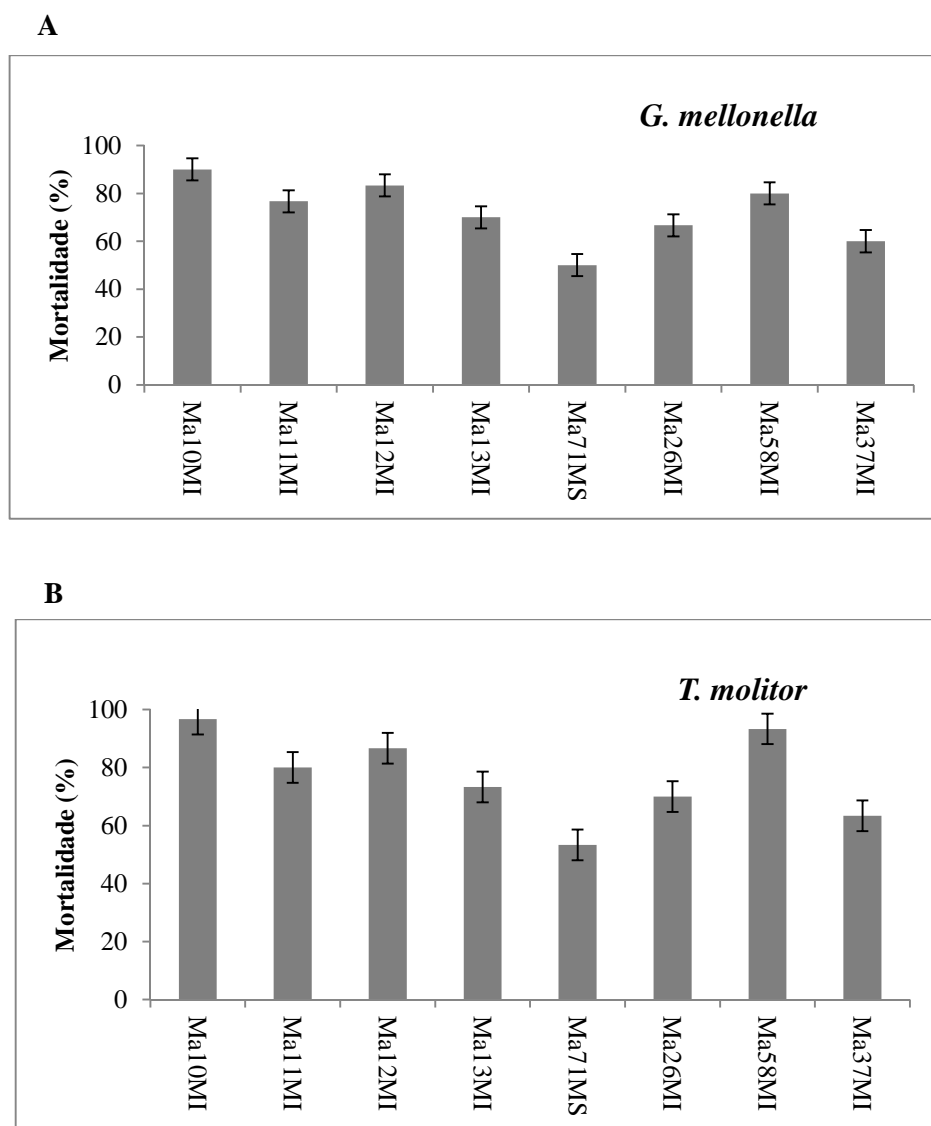


Figura 20. Porcentagem de mortalidade de larvas *G. mellonella* e *T. molitor* após 10 dias de inoculação com cepas de *M. anisopliae* (\pm erro padrão da média).

Foi observada uma mortalidade mínima no controle (larvas inoculadas com água + Tween 80%), além disso, foi encontrada uma importante diferença com relação aos hospedeiros, as larvas de *T. molitor* inoculadas com as cepas de *M. anisopliae* tiveram um tempo de sobrevivência menor que para larvas de *G. mellonella*. Estas diferenças podem ser devidas a que *M. anisopliae* apresenta maior especificidade para coleópteros (*T. molitor*) que para lepidópteros (*G. mellonella*) (Zimmermann, 1993). De igual forma se observaram diferenças significativas para as cepas de *B. bassiana* com relação aos hospedeiros, onde foi apresentada maior patogenicidade para larvas de *G. mellonella*. As cepas Ma71MS, Bb90MS e Bb101MS apresentaram uma mortalidade inferior quando comparadas com as outras cepas, indicando uma diminuição na atividade biocontroladora provavelmente relacionada com seu método de isolamento (meio seletivo BDA+TI). Segundo Wraight et al. (2001), a história da cultura também pode influenciar na virulência.

4.4.1 Infecção de larvas por fungos entomopatogênicos

Os sintomas da infecção de *B. bassiana* sobre as larvas de *G. mellonella* e *T. molitor*, inicialmente observados foram a supressão da alimentação e, posteriormente o retardamento dos seus movimentos. Inicialmente observou-se uma coloração rosácea (Figura 15 C) e consistência endurecida. Após a colonização do corpo dos insetos pela massa micelial, ocorreu a produção de conídios, de coloração branca (Figura 21). Estes sintomas também foram similares aos observados por outros autores em diferentes hospedeiros (ALVES, 1998; FRANCE et al., 2002). As larvas infectadas por *M. anisopliae* também apresentaram consistência endurecida, foram observados conídios de coloração verde na superfície do hospedeiro (Figura 22).

Segundo Almeida e Batista Filho (2006), os sintomas de insetos doentes por fungos são: manchas escuras pelo corpo, paralisação da alimentação, paralisia geral, perda de coordenação de movimentos. Posteriormente o tegumento torna-se róseo, para depois assumir coloração esbranquiçada, devido ao crescimento do micélio e a partir da esporulação o inseto assume a coloração da espécie do fungo. Exemplo: branco para *Beauveria bassiana* e verde para *Metarhizium anisopliae*.

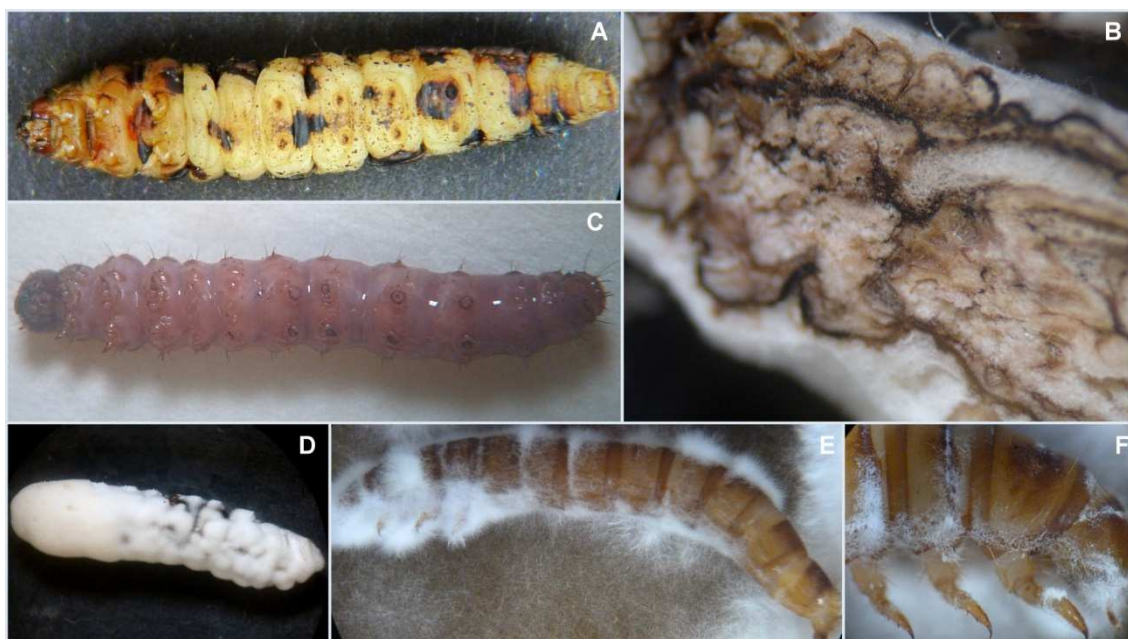


Figura 21. Infecção de *B. bassiana* sobre larvas de *G. mellonella* e *T. molitor*. A. Pontos pretos como a resposta imune indicando penetração direta do fungo, B. Hifas e esporos de *B. bassiana* no interior do hospedeiro, C. Pigmento vermelho causado pela oosporeína produzida pelo fungo, D. Colonização de *G. mellonella*, E. Colonização de *T. molitor*, F. Conidióforos de *B. bassiana* sobre as regiões intersegmentais. Foto: Esparza, 2015.

Observou-se que o crescimento do fungo começou nas áreas mais fracas (região intersegmentar) e depois na cutícula mais grossa, tanto em *T. molitor* como em *G. mellonella*, sugerindo que essa região seria o local de predileção para a penetração do fungo, como ilustrada na (Figura 21 E-F e Figura 22 E). Alguns autores citam que as membranas intersegmentais do abdome são mais comumente acometidas pelos fungos, porém espiráculos respiratórios,

aparelho bucal, ânus e tarsos, também são locais de penetração fúngica (STEINHAUS, 1968; WRAIGHT et al., 1990; ST. LEGER, 1991; ALVES, 1998).

Os nossos resultados mostraram que a cutícula de algumas larvas tratadas tornou-se escura e com manchas pretas devido a melanização excessiva, indicando ataque direto do fungo no sistema de defesa dos insetos (Figura 21A e Figura 22 F). Bitondi et al. (1998), afirmaram que tratamento hormonal induziu a atividade anterior de fenoloxidase, um sistema de enzima que está envolvida nos processos de melanose e resistência a patógenos. Bitondi et al. (1998) acrescentaram que *B. bassiana* é um inibidor de quitina, atuando principalmente em estruturas cuticulares de um inseto quando entra através da cutícula. Os conídios dos fungos se aderem a cutícula do inseto e depois da germinação as hifas penetraram a cutícula e proliferaram no corpo do inseto. Os tecidos do corpo em decomposição fornecem suficiente umidade para o crescimento do fungo profusamente, sendo a água essencial para a germinação de conídios (Figura 21 B e Figura 22 C). As mesmas espécies fúngicas foram reisoladas das larvas mortas e cultivadas em Agar Batata Dextrose.

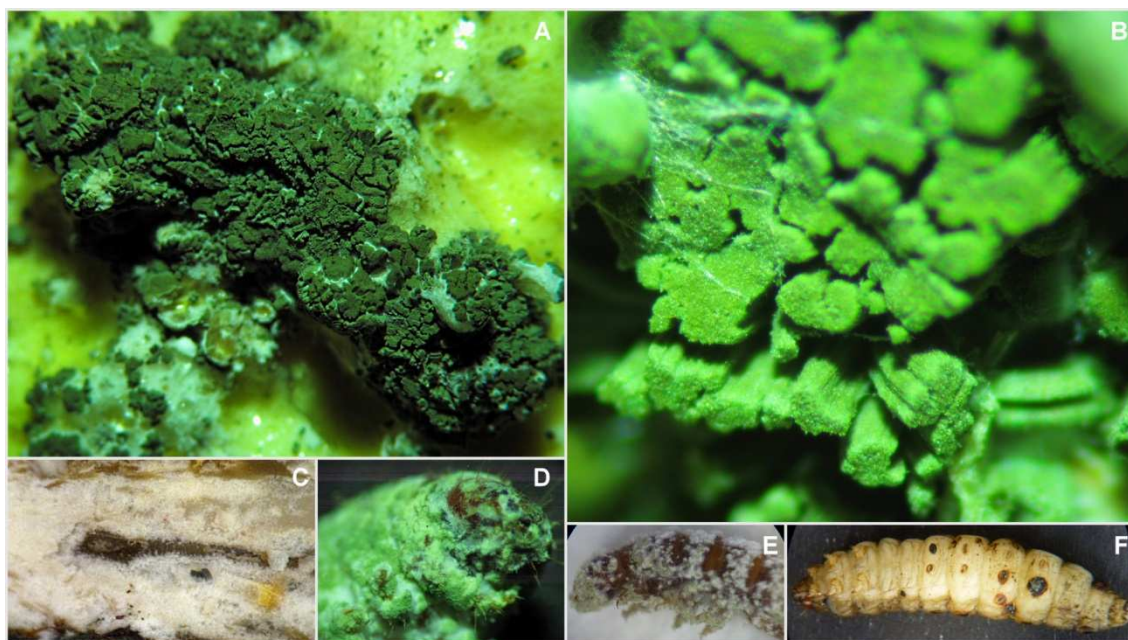


Figura 22. Infecção de *M. anisopliae* sobre larvas de *G. mellonella* e *T. molitor*. A. Colonização do *G. mellonella*, B. Conidióforos de *M. anisopliae*, C. Hifas e esporos de *M. anisopliae* no interior do hospedeiro, D. Micélio de *M. anisopliae* sobre a cabeça de *G. mellonella* E. Colonização do *T. molitor* F. Pontos pretos como a resposta imune indicando penetração direta do fungo. Foto: Esparza, 2015.

Algumas cepas de *B. bassiana* produziram um pigmento rosado sobre as larvas (Figura 21 C), provavelmente pela atividade da oosporeina (EL BASYOUNI et al., 1968; EYAL et al., 1994). A oosporeina é tóxica para uma gama de diferentes organismos (EYAL et al., 1994; THOMSEN, 1999) e a alta mortalidade de *G. mellonella* causada pelas cepas Bb11MI, Bb79MI e Bb53MI poderia dever-se a produção de oosporeina. A produção de compostos antibióticos por parte dos fungos é realizada para inibir o crescimento de competidores nos ambientes naturais, além das propriedades inibitórias tais compostos podem ter características de moléculas sinal (FAJARDO & MARTINEZ, 2008).

4.5 Caracterização morfológica

A tabela 5 e figura 23 apresentam as características macroscópicas para as espécies isoladas de *Beauveria* e *Metarhizium*, onde foram avaliadas em MEA e BDA após 7 dias a 25 °C. A tabela 6 e figura 18 mostram as características microscópicas das espécies isoladas de *Beauveria* e *Metarhizium*, após crescimento em MEA por 7 dias a 25 °C.

As espécies de *Beauveria* apresentaram células conidiógenas densamente agrupadas (verticiladas ou solitárias), incolor, com base globosa ou em forma de balão, conídios hialinos e asseptados com forma globosa a elipsoidal, colônia em MEA 25 °C com diâmetro de 2,5-4 cm, coloração branca para amarelo pálido com massas de esporos ou aspecto pulverulento e reverso bege claro (Figura 23 A-B). Em BDA, a coloração das colônias é creme e o reverso com tons amarelos pálidos (Figura 23 C-D), diâmetro de 2,3-3,6 cm. O conidióforo de $175-200 \times 1-2 \mu\text{m}$. As fiálides de $10-14 \times 2 \mu\text{m}$, conídios com diâmetro de $1,5-3,5 \mu\text{m}$ (Figura 24 A-B).

As espécies de *Metarhizium* apresentam conidióforos em manchas densas, individuais amplamente ramificados (como candelabro), densamente interligados, células conidiógenas com ápice arredondado para cônico, densamente ramificado ou entrelaçado, conídios sem septos, cilíndricos ou ovoides, em cadeias longas, com coloração verde brilhante para verde amarelado, oliva ou branco. As colônias em MEA 25 °C com diâmetro de 4,2-5 cm, coloração verde amarelado para verde escuro com massas de esporos ou aspecto pulverulento e com reverso bege escuro (Figura 23 E-F). Em BDA, a coloração das colônias é verde oliva e reverso com tons amarelos escuros (Figura 23 G-H), diâmetro de 4,5-6,5 cm. O conidióforo de $\geq 200 \times 2-3 \mu\text{m}$. As fiálides cilíndricas de $16-18 \times 2-3 \mu\text{m}$, conídios com diâmetro $9-10 \mu\text{m}$ (Figura 24 C-D).

Portanto, com base nos caracteres morfológicos os fungos foram caracterizados como: *B. bassiana* e *M. anisopliae* var. *anisopliae* conforme Humber, (2012) e Samson et al. (1988).

Poeaim et al. (2014), observaram colônias brancas para amarelo pálido tendo massas de esporos em pó. Para o meio BDA, as hifas e conídios em *Beauveria* são delicados e hialinos. A microscopia mostrou que os conídios tem forma globosa a elipsoidal e os conidióforos em forma de balão. Os tamanhos dos conídios variavam de largura $1,91 \pm 0,42 \mu\text{m}$ (Bb012) para $3,34 \pm 0,22 \mu\text{m}$ (Bb009) e comprimento de $3,11 \pm 0,39 \mu\text{m}$ (Bb015) para $4,50 \pm 0,37 \mu\text{m}$ (Bb028) a relação comprimento/largura dos conídios foi calculada e gerou dois grupos: os isolados com a relação comprimento/largura < 2 é o grupo de baixa relação e isolados com a relação comprimento/largura > 2 é o grupo de alta relação (Bb012, Bb013, Bb027 e Bb028).

Tabela 5. Características macroscópicas dos isolados de fungos entomopatogênicos de solo de Mata Atlântica.

| Isolado | Cor da Colônia | | Diâmetro da Colônia (cm) | |
|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------|---------|
| | MEA | BDA | MEA | BDA |
| | verso/ reverso | verso/ reverso | (25°C) | (25°C) |
| <i>Beauveria bassiana</i> | Branco amarelado /Bege claro | Creme /Amarelo claro | 2,5-4 | 2,3-3,6 |
| <i>Metarhizium anisopliae</i> | Verde amarelado /Bege escuro | Verde oliva/ amarelo escuro | 4,2-5 | 4,5-6,5 |

Tabela 6. Características microscópicas dos isolados de fungos entomopatogênicos de solo de Mata Atlântica.

| Isolados | Conídio | | | Fiálide | | | Conidióforo | | |
|-------------------------------|--------------|---------|---------------------|--------------|-----------------------------|---------|---------------|----------------|---------|
| | Tamanho (µm) | Cor | Forma | Tamanho (µm) | Forma | Cor | Tamanho (µm) | Nº de Fiálides | Cor |
| <i>Beauveria bassiana</i> | 1,5-3,5 | Hialino | Globosa/ Elisoipdal | 10-14 x 2 | Globosa | Hialino | 175-200 x 1-2 | 2 - 5 | Hialino |
| <i>Metarhizium anisopliae</i> | 9-10 | Hialino | Cilíndricos/ Ovoide | 16-18 x 2-3 | Ápice arredondado ou cônico | Hialino | ≥200 x 2-3 | 2 - 4 | Hialino |

No entanto, a identificação baseada nas características morfológicas não conseguiu identificar corretamente as espécies de *Beauveria* assim, a diversidade genética de *Beauveria* sp. foi detectada utilizando técnicas de sequenciamento, PCR-RFLP, da região ITS1-5,8S-ITS2 e a pequena porção de rDNA 18S e 28S e RAPD. Encontraram que os isolados de *Beauveria* foram agrupados em dois grupos principais; *Beauveria bassiana* e *Beauveria brongniartii*.

A classificação atual de *Metarhizium* baseada em caracteres morfológicos foi revisada por Tulloch (1976), que aceitou apenas *M. flavoviridae* e *M. anisopliae*, a segunda espécie foi subdividida em var. *anisopliae* ou var. *majus*, dependendo do tamanho do conídio. Macedo (2005), encontrou que as colônias dos isolados de *M. anisopliae* apresentaram coloração que variou de verde acinzentado até verde escuro (oliva). Alguns isolados apresentaram crescimento micelial mais denso e mais proeminente (aspecto cotonoso). Yip et al. (1992), observaram as mesmas características quando estudaram 204 culturas de *M. anisopliae* isoladas de solos de pastagem da Tasmânia. Os autores observaram três cores básicas da colônia após a esporulação: verde acinzentado, cinza escuro e verde escuro. A cor da colônia foi observada por ser um caráter estável e é considerada uma característica confiável para a separação de isolados. Macedo (2005), observou que o crescimento das colônias (diâmetro) variou de 28 mm para o isolado IBCB-353 a 38 mm para o isolado IBCB-348 após oito dias de crescimento. As dimensões dos conídios variaram entre 5,465 e 7,970 μm comprimento para os isolados IBCB-345 e ESALQ 1301, respectivamente.

Riba et al. (1986), comparando as dimensões de conídios de 96 isolados de *M. anisopliae* observaram que os mesmos variaram entre 3,5 a 17,7 μm de comprimento. Yip et al. (1992), caracterizando *Metarhizium* isolados de solos da Tasmânia observaram conídios com dimensões de 5 a 9 μm de comprimento. Driver et al (2000), concluíram que a morfologia do conídio tinha como único potencial de uso a classificação morfológica dos isolados de *Metarhizium* testados e sugerem que o tamanho dos conídios seja útil na determinação das espécies.

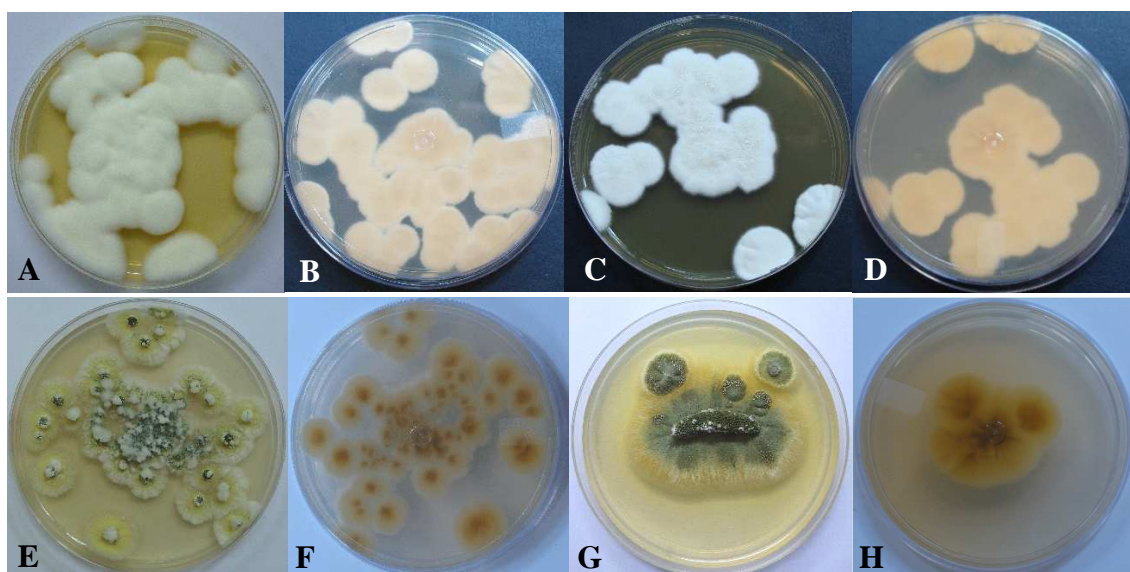


Figura 23. Características macroscópicas das colônias dos isolados de *Beauveria bassiana* (A-D) e *Metarhizium anisopliae* (E-H), verso e reverso em MEA e BDA, respectivamente a 25 °C após 7 dias.

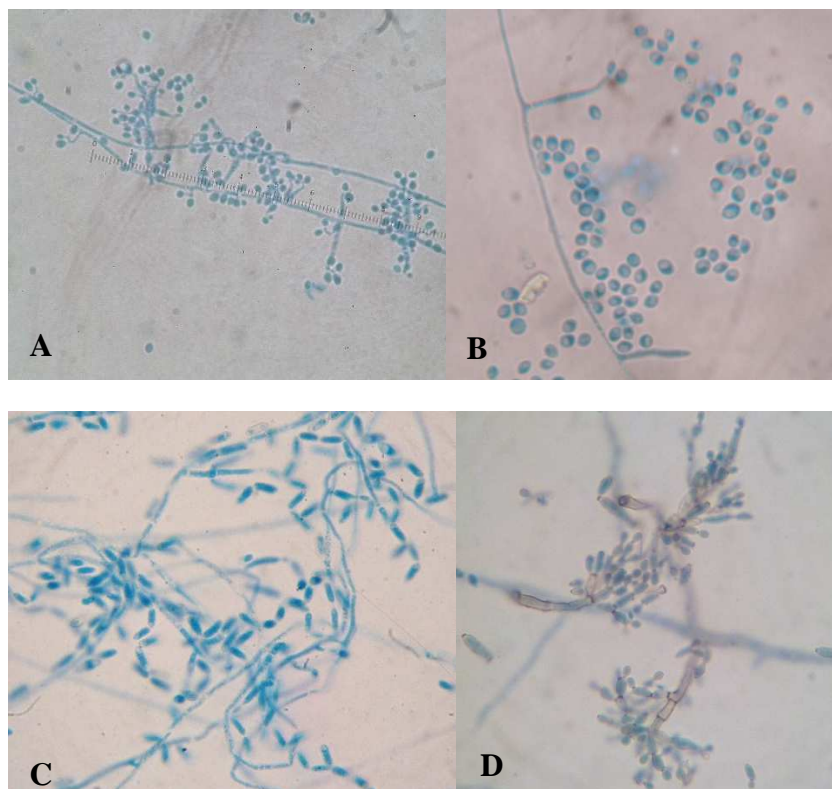


Figura 24. Características microscópicas dos isolados de *Beauveria bassiana* (A-B) e *Metarhizium anisopliae* (C-D), em MEA a 25 °C após 7 dias.

4.6 Avaliação da virulência das cepas selecionadas

De acordo com o teste de Scott Knott ($\alpha=0,05$), as cepas mais patogênicas para *G. mellonella* foram Bb79MI, Bb27MI, Ma10MI e Ma58MI em 3 concentrações (1×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9 conídios.mL⁻¹) e Bb53MI moderadamente (1×10^8 e 1×10^9 conídios.mL⁻¹); comparando os valores médios e baixos da mortalidade das larvas com as distintas concentrações se observou que as cepas Bb11MI, Ma11MI e Ma12MI foram menos patogênicas nas concentrações 1×10^6 , 1×10^7 e 1×10^8 conídios.mL⁻¹ (Tabela 7). As cepas de *B. bassiana* mais patogênicas para *T. molitor* foram, Bb27MI e Bb79MI nas concentrações 1×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9 conídios.mL⁻¹; as cepas de *M. anisopliae* Ma10MI e Ma58MI foram as mais patogênicas para *T. molitor* nas concentrações (1×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9 conídios.mL⁻¹). As cepas Bb11MI de *B. bassiana* e Ma11MI de *M. anisopliae* foram as menos patogênicas para *T. molitor* (Tabela 8).

A cepa que teve a mais alta patogenicidade sobre as larvas de *G. mellonella* foi a Bb79MI de *B. bassiana*, com uma mortalidade média de 80,66%, CL₅₀ de $1,04 \times 10^7$ conídios.mL⁻¹ e TL₅₀ de 5,27 dias (Tabela 9). A cepa Ma58MI de *M. anisopliae* foi a mais virulenta para as larvas de *G. mellonella* apresentando uma mortalidade de 83,33%, CL₅₀ de $6,31 \times 10^7$ conídios.mL⁻¹ e TL₅₀ de 5,18 dias. A cepa Bb79MI causou uma mortalidade de 78% em *T. molitor*, e apresentou uma CL₅₀ de $1,03 \times 10^7$ conídios.mL⁻¹ e TL₅₀ de 5,57 dias. Finalmente a cepa Ma58MI de *M. anisopliae* causou uma mortalidade de 82% sobre larvas de *T. molitor*, o CL₅₀ foi de $1,00 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹ e o TL₅₀ de 4,05 dias. A cepa menos virulenta para larvas de *G. mellonella* e *T. molitor* foi Bb11MI correspondente a *B. bassiana* (mortalidade de 73,33%, CL₅₀ de $9,12 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹ e TL₅₀ de 6,99 dias e 70,00%, CL₅₀ de $7,94 \times 10^7$

conídios.mL⁻¹ e TL₅₀ de 5,42 dias, respectivamente). Finalmente a cepa Ma11MI de *M. anisopliae* foi a menos patogênica para *G. mellonella* e *T. molitor* as mortalidades foram de 63,33% e 67,33%, CL₅₀ de 2,12x10⁹ e 6,21x10⁸ conídios.mL⁻¹ e TL₅₀ de 7,69 e 6,27 dias, respectivamente.

Segundo esta análise se requer menor quantidade de inoculo com os tratamentos de Bb79MI de *B. bassiana* e Ma58MI de *M. anisopliae* para matar as larvas de *G. mellonella* e *T. molitor*. Resultados semelhantes foram obtidos por Garcia et al. (2011), que avaliaram a atividade inseticida de 8 isolados de *B. bassiana* e 4 de *M. anisopliae* sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* e *Epilachna varivestis* com seis concentrações (10⁴ até 10⁹); o isolado Bb18 de *B. bassiana* foi o mais virulento para larvas de *E. varivestis* com mortalidade de 93,3%, CL₅₀ de 1,20x10⁶ conídios.mL⁻¹ e TL₅₀ de 5,1 dias. O isolado Bb42 de *B. bassiana* causou a maior mortalidade sobre larvas de *S. frugiperda* (96,6%, CL₅₀ de 5,92x10³ conídios.mL⁻¹ e TL₅₀ de 3,6 dias). Zayed (2004), determinou a virulência de dois isolados de *B. bassiana* (Bb1 e Bb2) sobre *G. mellonella* em concentrações de 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 12.5 e 25x 10⁶ conídios.mL⁻¹. *Galleria mellonella* foi mais susceptível para Bb2, a CL₅₀ para Bb1 foi de 8,2x10¹⁰, 2,3x10⁸ e 2,2x10⁷ conídios.mL⁻¹ após inoculação por 4, 6 e 8 dias respectivamente. Contudo, a CL₅₀ avaliada para Bb2 foi de 19 x10⁷, 3,3x10⁶ e 10⁶ conídios.mL⁻¹, para o mesmo período de exposição. As duas concentrações, 2,5x10⁶ e 5x10⁶ conídios.mL⁻¹ foram selecionadas para ajustar a comparação o TL₅₀ para cada isolado. A concentração 2,5x10⁶ conídios.mL⁻¹, induziu 50% de mortalidade dentro de um período de 10 dias para o isolado Bb1, para Bb2, o LT₅₀ foi de 6,4 dias. Na concentração 5x10⁶ conídios.mL⁻¹, o TL₅₀ de Bb1, foi de 8,4 dias, foi significativamente maior do que a de Bb2, 5,5 dias.

Os valores de TL₉₀ para as cepas de *B. bassiana* sobre larvas de *G. mellonella* variaram de 8,03 para 10,23 dias e para as cepas de *M. anisopliae* sobre larvas de *G. mellonella* variaram de 8,29 para 10,47 dias. Nas larvas de *T. molitor* os TL₉₀ das cepas de *B. bassiana* variaram de 9,24 para 10,04 dias, nas cepas de *M. anisopliae* os TL₉₀ variaram de 7,18 para 11,26 dias. A CL₉₀ também variou dependendo da espécie de inseto e linhagem. A cepa de *B. bassiana* que apresentou a menor CL₉₀ para larvas de *G. mellonella* foi Bb79MI (6,31x10⁹ conídios.mL⁻¹) e a maior CL₉₀ foi apresentada pela cepa Bb11MI (8,31x10¹¹ conídios.mL⁻¹). *Metarhizium anisopliae* Ma11MI apresentou a maior CL₉₀ (2,88x10¹¹ conídios.mL⁻¹) e a menor CL₉₀ foi da cepa Ma58MI (1,00x10⁹ conídios.mL⁻¹) em larvas de *G. mellonella*. Finalmente para as larvas de *T. molitor* a CL₉₀ variou com as cepas de *B. bassiana* de 1,00x10¹⁰ a 8,46x10¹¹ conídios.mL⁻¹; com as cepas de *M. anisopliae* a CL₉₀ variou de 9,90x10⁸ a 1,26x10¹² conídios.mL⁻¹ (Tabela 10). Diferenças entre os tempos letais é uma ferramenta bastante utilizada na seleção de linhagens, pois é interessante que o fungo mate rapidamente seus hospedeiros (LOHMEYER & MILLER, 2006).

Tabela 7. Mortalidade de larvas de *G. mellonella* em diferentes concentrações de esporas de *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

| Concentração Conídios.mL⁻¹ | Bb11MI | Bb27MI | Bb53MI | Bb79MI | Ma10MI | Ma11MI | Ma12MI | Ma58MI |
|--|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1x10 ⁹ | 100,0 Aa | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA |
| 1x10 ⁸ | 93,3 bB | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 76,7 bC | 93,3 bB | 100,0 aA |
| 1x10 ⁷ | 83,3 cB | 100,0 aA | 96,6 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 63,3 cD | 70,0 cC | 100,0 aA |
| 1x10 ⁶ | 70,0 dC | 73,3 bC | 80,0 bB | 83,3 bB | 86,7 bB | 56,7 dD | 73,3 cC | 96,7 aA |
| Testemunha | 20,0 eA | 20,0 cA | 20,0 cA | 20,0 cA | 20,0 cA | 20,0 eA | 20,0 dA | 20,0 bA |

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Média de mortalidade aos 8 dias.

Tabela 8. Mortalidade de larvas de *T. molitor* em diferentes concentrações de esporas de *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

| Concentração Conídios. mL⁻¹ | Bb11MI | Bb27MI | Bb53MI | Bb79MI | Ma10MI | Ma11MI | Ma12MI | Ma58MI |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1x10 ⁹ | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA |
| 1x10 ⁸ | 90,0 bB | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 90,0 bB | 100,0 aA | 100,0 aA |
| 1x10 ⁷ | 86,7 bC | 100,0 aA | 93,3 bB | 100,0 aA | 100,0 aA | 70,0 cD | 83,3 bC | 100,0 aA |
| 1x10 ⁶ | 63,3 cE | 70,0 bD | 80,0 cC | 80,0 bC | 100,0 aA | 66,7 cD | 86,7 bB | 100,0 aA |
| Testemunha | 10,0 dA | 10,0 cA | 10,0 dA | 10,0 cA | 10,0 bA | 10,0 dA | 10,0 cA | 10,0 bA |

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Média de mortalidade aos 8 dias.

Tabela 9. Valores de CL₅₀ e TL₅₀ das cepas de *B. bassiana* e *M. anisopliae* contra *G. mellonella* e *T. molitor*.

| Cepa/Inseto | CL ₅₀ | Intervalo de confiança a 95% | TL ₅₀ (dias) | Intervalo de confiança a 95% |
|----------------------|----------------------|---|-------------------------|------------------------------|
| Bb11MI | | | | |
| <i>G. mellonella</i> | 9,12x10 ⁸ | 4,97x10 ⁶ -2,28x10 ⁹ | 6,99 | 5,69-7,02 |
| <i>T. molitor</i> | 7,94x10 ⁷ | 4,76x10 ⁶ -2,23x10 ⁸ | 5,42 | 5,31-5,90 |
| Bb53MI | | | | |
| <i>G. mellonella</i> | 3,98x10 ⁷ | 1,34x10 ⁷ -2,29x10 ⁸ | 5,46 | 5,36-6,09 |
| <i>T. molitor</i> | 5,87x10 ⁷ | 1,68x10 ⁷ -2,05x10 ⁸ | 5,73 | 5,43-6,12 |
| Bb79MI | | | | |
| <i>G. mellonella</i> | 1,04x10 ⁷ | 1,45x10 ⁶ -5,75x10 ⁸ | 5,27 | 5,11-5,74 |
| <i>T. molitor</i> | 1,03x10 ⁷ | 1,32x10 ⁶ -4,76x10 ⁸ | 5,57 | 5,39-6,03 |
| Bb27MI | | | | |
| <i>G. mellonella</i> | 5,53x10 ⁷ | 7,74x10 ⁶ -2,05x10 ⁸ | 5,56 | 5,37-5,99 |
| <i>T. molitor</i> | 3,98x10 ⁷ | 7,74x10 ⁶ -2,05x10 ⁸ | 5,83 | 5,63-6,18 |
| Ma58MI | | | | |
| <i>G. mellonella</i> | 6,31x10 ⁷ | 1,67x10 ⁷ -2,38x10 ⁹ | 5,18 | 4,79-5,36 |
| <i>T. molitor</i> | 1,00x10 ⁶ | 2,88x10 ⁵ -3,48x10 ⁹ | 4,06 | 3,89-4,68 |
| Ma10MI | | | | |
| <i>G. mellonella</i> | 1,10x10 ⁸ | 1,96x10 ⁷ -1,28x10 ⁸ | 6,37 | 5,79-6,89 |
| <i>T. molitor</i> | 1,00x10 ⁷ | 2,88x10 ⁶ -3,48x10 ¹⁰ | 5,22 | 4,97-5,66 |
| Ma12MI | | | | |
| <i>G. mellonella</i> | 1,59x10 ⁸ | 3,93x10 ⁷ -1,21x10 ⁹ | 6,17 | 6,00-6,45 |
| <i>T. molitor</i> | 1,13x10 ⁸ | 4,60x10 ⁶ -2,77x10 ⁷ | 6,59 | 5,15-5,87 |
| Ma11MI | | | | |
| <i>G. mellonella</i> | 2,12x10 ⁹ | 1,28x10 ⁸ -3,51x10 ¹⁰ | 7,69 | 6,87-7,91 |
| <i>T. molitor</i> | 6,21x10 ⁸ | 3,15x10 ⁶ -1,22x10 ⁹ | 6,27 | 6,11-6,46 |

Rodriguez et al. (2005), avaliaram a virulência de Qu-M558 de *M. anisopliae* e Qu-B912 de *B. bassiana* sobre larvas de *Tuta absoluta* e obtiveram a CL₅₀ e CL₉₀ para Qu-B912 sendo de 1x10^{4,4} e 1x10^{7,6} conídios.mL⁻¹ e para Qu-M558 foi de 1x10^{5,4} e 1x10^{9,1} conídios.mL⁻¹, respectivamente. Mafla et al. (2004), avaliaram a atividade biocontroladora de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeiodes* (Coleoptera: Scarabaeidae) usando concentrações de 1x10⁵ até 1x10¹⁰ conídios.mL⁻¹, a mortalidade acumulada foi de 100% para o isolado Bb como, Mt1 e Mt2 na concentração 1x10¹⁰ conídios.mL⁻¹ e 90% para Bb4 e Bb10 na concentração 1x10⁹ conídios.mL⁻¹, apresentando CL₉₀ de 1,1x10¹⁰, 7,3x10⁹, 2,2x10¹⁰, 3,9x10¹⁰ e 4,3x10¹⁰ conídios.mL⁻¹, respectivamente.

Tabela 10. Valores de CL₉₀ e TL₉₀ das cepas de *B. bassiana* e *M. anisopliae* contra *G. mellonella* e *T. molitor*.

| Cepa/Inseto | CL ₉₀ | Intervalo de confiança a 95% | TL ₉₀ (dias) | Intervalo de confiança a 95% |
|----------------------|-----------------------|--|-------------------------|------------------------------|
| Bb11MI | | | | |
| <i>G. mellonella</i> | 8,31x10 ¹¹ | 1,44x10 ¹⁰ -4,79x10 ¹² | 10,23 | 9,42-10,52 |
| <i>T. molitor</i> | 8,46x10 ¹¹ | 1,49x10 ¹¹ -4,82x10 ¹² | 10,04 | 9,98-10,14 |
| Bb53MI | | | | |
| <i>G. mellonella</i> | 2,15x10 ¹⁰ | 2,15x10 ¹⁰ -6,84x10 ¹¹ | 9,38 | 9,10-9,67 |
| <i>T. molitor</i> | 3,16x10 ¹⁰ | 3,29x10 ⁹ -2,11x10 ¹¹ | 9,48 | 9,23-9,68 |
| Bb79MI | | | | |
| <i>G. mellonella</i> | 6,31x10 ⁹ | 1,67x10 ⁸ -2,39x10 ¹⁰ | 8,03 | 7,85-8,16 |
| <i>T. molitor</i> | 1,00x10 ¹⁰ | 1,45x10 ⁹ -6,88x10 ¹⁰ | 9,42 | 9,23-9,57 |
| Bb27MI | | | | |
| <i>G. mellonella</i> | 1,00x10 ¹⁰ | 6,95x10 ⁹ -1,44x10 ¹¹ | 9,19 | 9,00-9,31 |
| <i>T. molitor</i> | 8,34x10 ¹⁰ | 6,95x10 ¹⁰ -1,44x10 ¹¹ | 9,68 | 9,46-9,78 |
| Ma58MI | | | | |
| <i>G. mellonella</i> | 1,00x10 ⁹ | 6,60x10 ⁸ -1,51x10 ¹⁰ | 8,29 | 8,06-8,47 |
| <i>T. molitor</i> | 9,90x10 ⁸ | 8,48x10 ⁸ -1,18x10 ⁹ | 7,18 | 7,02-7,38 |
| Ma10MI | | | | |
| <i>G. mellonella</i> | 9,98x10 ⁹ | 2,88x10 ⁹ -3,48x10 ¹⁰ | 8,51 | 8,29-8,88 |
| <i>T. molitor</i> | 9,98x10 ⁸ | 8,48x10 ⁸ -1,18x10 ⁹ | 7,80 | 7,32-8,12 |
| Ma12MI | | | | |
| <i>G. mellonella</i> | 4,38x10 ¹⁰ | 3,84x10 ⁹ -1,21x10 ¹¹ | 9,20 | 9,11-9,37 |
| <i>T. molitor</i> | 3,56x10 ⁹ | 1,47x10 ⁹ -1,08x10 ¹⁰ | 8,41 | 8,26-8,69 |
| Ma11MI | | | | |
| <i>G. mellonella</i> | 2,88x10 ¹¹ | 1,82x10 ¹⁰ -4,55x10 ¹¹ | 10,47 | 10,19-10,59 |
| <i>T. molitor</i> | 1,26x10 ¹² | 1,06x10 ¹² -1,20x10 ¹³ | 11,26 | 11,09-11,46 |

A Figura 25 A mostra a mortalidade da cepa Bb11MI de *B. bassiana* sobre larvas de *G. mellonella* com diferentes concentrações de conídios (1x10⁶, 1x10⁷, 1x10⁸ e 1x10⁹ conídios.mL⁻¹). Observou-se que a maior mortalidade de larvas de *G. mellonella* ocorreu usando a concentração 1x10⁹ conídios.mL⁻¹ alcançando 100% após 8 dias de inoculação. A curva de mortalidade através do tempo originada em esta concentração foi diferente a produzida a concentrações 1x10⁶, 1x10⁷ e 1x10⁸, com as que foram alcançadas 70%, 83,33% e 93,33% de mortalidade respectivamente. A maior mortalidade de larvas de *T. molitor* foi apresentada usando a concentração 1x10⁹ conídios.mL⁻¹ alcançando o 100% após 8 dias de inoculação. Mortalidades de 100% também foram obtidas com as concentrações 1x10⁸ e 1x10⁷ conídios.mL⁻¹ após 9 dias de inoculação. A mortalidade máxima para as larvas de *T. molitor* com a concentração de 1x10⁶ conídios.mL⁻¹ foi de 83,33% após 10 dias de inoculação (Figura 25 B).

A cepa Bb53MI de *B. bassiana* mostrou a maior mortalidade (100%) contra *G. mellonella* o dia 7 após inoculação, com a concentração de 1x10⁹ conídios.mL⁻¹, esta mortalidade foi diferente a produzida nas concentrações de 1x10⁶, 1x10⁷ e 1x10⁸ conídios.mL⁻¹ onde foi obtida uma mortalidade de 100% após 10, 9 e 8 dias de inoculação respectivamente

(Figura 25 C). Com as concentrações 1×10^6 e 1×10^7 conídios.mL⁻¹ foram obtidas mortalidades para larvas de *T. molitor* após 8 dias de inoculação de 80% e 93,33%, respectivamente. Com a concentração 1×10^8 e 1×10^9 conídios.mL⁻¹ a mortalidade alcançou o 100% após 8 dias de inoculação (Figura 25 D).

A cepa Bb79MI de *B. bassiana* na concentração 1×10^9 conídios.mL⁻¹ apresentou uma mortalidade de 100% após 6 dias de inoculação nas larvas de *G. mellonella*. Nas concentrações 1×10^6 , 1×10^7 e 1×10^8 conídios.mL⁻¹ após de 7 dias de inoculação nas larvas foram obtidas mortalidades de 70%, 90% e 100% respectivamente (Figura 25 E). Para as larvas de *T. molitor* foi alcançada uma mortalidade de 100% com as concentrações de 1×10^8 e 1×10^9 conídios.mL⁻¹ após 7 dias de inoculação. Nas concentrações 1×10^6 e 1×10^7 conídios.mL⁻¹ foi obtida uma mortalidade de 80% e 100% após 8 dias de inoculação (Figura 25 F).

A cepa Bb27MI de *B. bassiana* na concentração 1×10^9 conídios.mL⁻¹ apresentou uma mortalidade de 100% após 7 dias de inoculação nas larvas de *G. mellonella*. Nas concentrações 1×10^6 , 1×10^7 e 1×10^8 conídios.mL⁻¹ após de 7 dias de inoculação nas larvas foram obtidas mortalidades inferiores de 60%, 90% e 90% respectivamente (Figura 25 G). Nas larvas de *T. molitor* foi alcançada uma mortalidade de 100% com as concentrações de 1×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9 conídios.mL⁻¹ após 8 dias de inoculação. Na concentração 1×10^6 conídios.mL⁻¹ foi obtida uma mortalidade de 70% depois de 8 dias de inoculação (Figura 25 H). Quintana (2000) e Gerding et al. (2002), encontraram resultados semelhantes com os isolados de *B. bassiana* para o controle de larvas de *Rhyasonia buoliana* (Lepidóptera: Tortricidae), onde se alcançou 100% de mortalidade com concentração de 1×10^8 conídios.mL⁻¹.

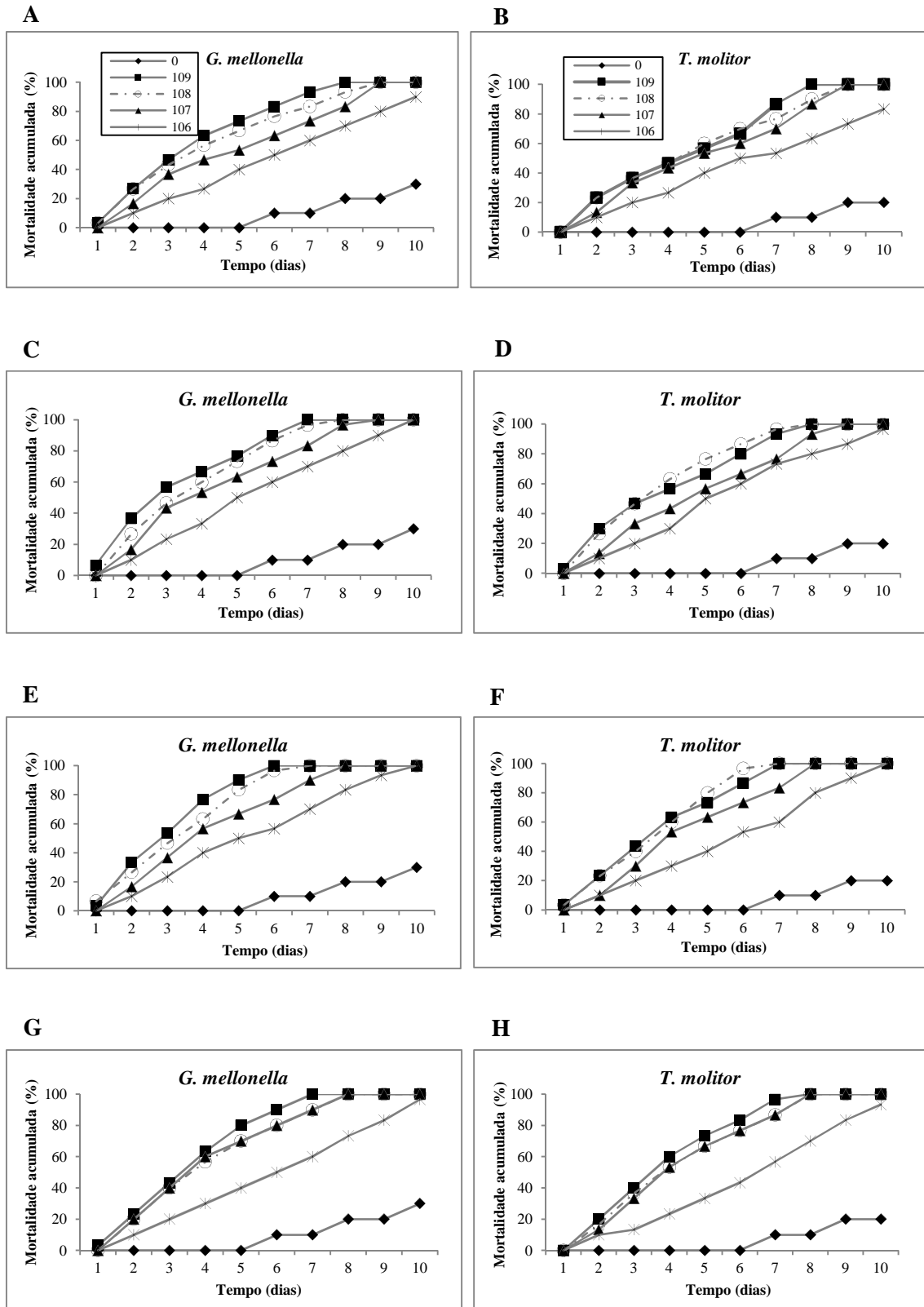


Figura 25. Mortalidade acumulada de larvas de *G. mellonella* e *T. molitor*, inoculadas com diferentes concentrações e cepas de *B. bassiana*. A-B. Ceba Bb11MI, C-D. Ceba Bb53MI, E-F. Ceba Bb79MI e G-H. Ceba Bb27MI.

A figura 26 A mostra a mortalidade da cepa Ma58MI de *B. bassiana* sobre larvas de *G. mellonella* com diferentes concentrações de conídios (1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9 conídios.mL⁻¹

¹). Observou-se que a maior mortalidade de larvas de *G. mellonella* ocorreu usando a concentração 1×10^9 conídios.mL⁻¹ alcançando 100% após 6 dias de inoculação. Nas concentrações 1×10^7 e 1×10^8 conídios.mL⁻¹ ocorreu mortalidade após 7 dias de inoculação de 96,66% e 100%, respectivamente, e na concentração 1×10^6 conídios.mL⁻¹ a mortalidade máxima (100%) foi alcançada depois de 9 dias de inoculação. Nas larvas de *T. molitor* foi obtida uma mortalidade de 100% após 6 dias de inoculação com as concentrações de 1×10^8 e 1×10^9 conídios.mL⁻¹, nas concentrações de 1×10^6 e 1×10^7 conídios.mL⁻¹ a mortalidade máxima (100%) foi alcançada após 7 dias de inoculação (Figura 26 B).

A cepa Ma10MI de *M. anisopliae* apresentou uma mortalidade de 100% para as larvas de *G. mellonella* após 7 dias de inoculação com a concentração 1×10^8 e 1×10^9 conídios.mL⁻¹. Nas concentrações 1×10^6 e 1×10^7 conídios.mL⁻¹ a mortalidade máxima após 8 dias de inoculação nos insetos foi de 86,66% e 100%, respectivamente (Figura 26 C). Em *T. molitor* observou-se um aumento na mortalidade sendo de 100% após 6 dias de inoculação quando usada a concentração de 1×10^9 conídios.mL⁻¹. Nos tratamentos 1×10^6 , 1×10^7 e 1×10^8 conídios.mL⁻¹ a mortalidade obtida foi de 86,66%, 96,66% e 100% após 7 dias de inoculação (Figura 26 D).

Com a cepa Ma12MI de *M. anisopliae* foi obtida uma mortalidade de 100% após 8 dias de inoculação nas larvas de *G. mellonella* com a concentração 1×10^9 conídios.mL⁻¹. Nas concentrações 1×10^6 , 1×10^7 e 1×10^8 conídios.mL⁻¹ a mortalidade depois de 7 dias de inoculação foi de 60%, 60% e 83,33% respectivamente (Figura 26 E). Em *T. molitor* observou-se um aumento na mortalidade; com o tratamento 1×10^9 conídios.mL⁻¹ foi alcançada uma mortalidade de 100% após 6 dias de inoculação e nos tratamentos 1×10^6 , 1×10^7 e 1×10^8 conídios.mL⁻¹ a mortalidade foi de 76,66%, 73,33% e 100% após 7 dias de inoculação (Figura 26 F).

Finalmente com a cepa Ma11MI foi obtida uma mortalidade de 100% após 8 dias de inoculação em *G. mellonella* quando usada a concentração 1×10^9 conídios.mL⁻¹. Nos tratamentos 1×10^6 , 1×10^7 e 1×10^8 conídios.mL⁻¹ a mortalidade máxima obtida após 10 dias de inoculação nos insetos foi de 86,66%, 93,33% e 100%, respectivamente (Figura 26 G). Com larvas de *T. molitor* observou-se um aumento na mortalidade em todos os tratamentos. No tratamento 1×10^9 conídios.mL⁻¹ a mortalidade foi de 100% após 7 dias de inoculação, nos tratamentos 1×10^8 e 1×10^7 conídios.mL⁻¹ a mortalidade máxima (100%) foi obtida após 9 e 10 dias de inoculação respectivamente. Por último na concentração 1×10^6 conídios.mL⁻¹ a mortalidade máxima foi de 96,66% após 10 dias de inoculação (Figura 26 H).

A mortalidade de *G. mellonella* e *T. molitor* foi ascendente no tempo e maior que na testemunha. A partir desses resultados as cepas de *B. bassiana* com maior desempenho para *G. mellonella* foram Bb53MI e Bb79MI com valores de CL₅₀ de $3,98 \times 10^7$ e $1,04 \times 10^7$ conídios.mL⁻¹, para *T. molitor* foi a cepa Bb79MI com CL₅₀ de $1,03 \times 10^7$ conídios.mL⁻¹. As cepas de *M. anisopliae* com melhor desempenho foram Ma58MI e Ma10MI tanto para *T. molitor* como para *G. mellonella*.

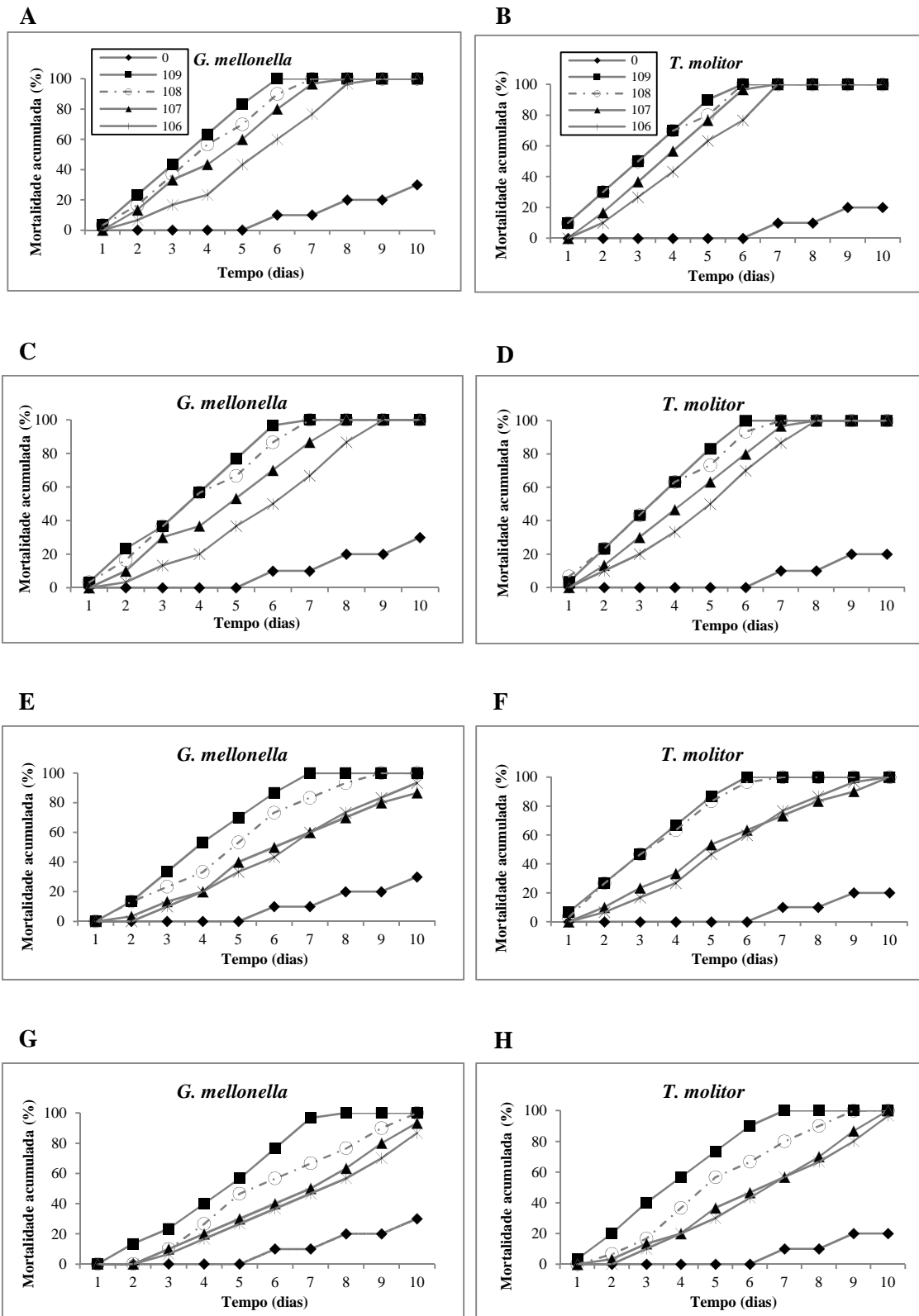


Figura 26. Mortalidade acumulada de larvas de *G. mellonella* e *T. molitor*, inoculadas com diferentes concentrações e cepas de *M. anisopliae*. A-B. Cepa Ma58MI, C-D. Cepa Ma10MI, E-F. Cepa Ma12MI e G-H. Cepa Ma11MI.

As CL_{50} de *M. anisopliae* variaram de $1,00 \times 10^6$ a $1,00 \times 10^7$ e $6,31 \times 10^7$ a $1,10 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹ para larvas de *T. molitor* e *G. mellonella* respectivamente. Confirmou-se que as cepas mais virulentas foram Bb79MI e Ma58MI. *Galleria mellonella* e *T. molitor* são

conhecidos por serem susceptíveis a essas duas espécies de fungos entomopatogênicos, de modo que eles ainda são usados como iscas para o isolamento de fungos entomopatogênicos a partir do solo (ZIMMERMAN, 1986; BIDOCHKA et al., 2002; MONTESINOS et al., 2011; TARASCO et al., 2011) ou, recentemente, como sonda para patogenicidade de outras espécies de insetos (BHARADWAJ et al., 2011). A mortalidade e as concentrações foram consideradas parâmetros no estudo do comportamento dos melhores isolados uma vez que indicam a capacidade de colonização do patógeno, superando todos os agentes competidores presentes no inseto (NEVES, 1998).

Uma interação significativa também foi observada entre a concentração conidial e o tempo. Foi constatado que as concentrações mais altas de conídios requerem menor tempo para causar mortalidade de 100% dos insetos. A quantidade de conídios utilizada deve atingir para uma determinada concentração e assim obter uma penetração eficaz do fungo na cutícula do inseto e causar a morte do hospedeiro (ZHIOUA et al., 1997). Todas as cepas foram capazes de causar infecção e mortalidade contra *G. mellonella* e *T. molitor* via contato. Nas larvas de *T. molitor* o menor tempo para causar a máxima mortalidade foi de 6 dias na concentração 1×10^9 conídios.mL⁻¹ com as linhagens Ma12MI, Ma10MI e Ma58MI de *M. anisopliae* enquanto que para a linhagem Bb79MI de *B. bassiana* o tempo foi de 7 dias, em *G. mellonella* o menor tempo para causar a mortalidade de 100% foi de 6 dias com as cepas Bb79MI de *B. bassiana* e Ma58MI de *M. anisopliae*; na concentração 1×10^9 conídios.mL⁻¹ não se conseguiu uma mortalidade de 100% para as larvas de *T. molitor* com as cepas Bb11MI, Bb53MI, Bb72MI de *B. bassiana* e Ma11MI de *M. anisopliae*, nem para as larvas de *G. mellonella* com as cepas Bb11MI e Bb27MI de *B. bassiana* e Ma12MI e Ma11MI de *M. anisopliae*. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Khalid et al. (2012), ao avaliar a virulência de 90 isolados de *B. bassiana* e 15 isolados de *M. anisopliae* sobre larvas de *G. mellonella* usando suspensões de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 conídios.mL⁻¹. Os isolados BbaAUMC3076, BbaAUMC3263 e ManAUMC3085 causaram mortalidade de 100% em concentrações de $5,5 \times 10^6$, $5,86 \times 10^5$ e $4,8 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹. Os valores de CL₅₀ foram $1,43 \times 10^3$, $1,04 \times 10^5$ e $5,06 \times 10^4$ conídios.mL⁻¹ para Bba3263AUMC, Bba3076AUMC e Man3085AUMC, respectivamente.

Filho et al. (2002), também avaliaram a patogenicidade dos isolados de fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, para lagartas do curuquerê-do-algodoeiro *Alabama argilacea* usando as concentrações de 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios.mL⁻¹ e obtiveram porcentagens de mortalidade confirmada das lagartas de *A. argillacea* ocasionadas pelos isolados de *M. anisopliae* que variaram de 4,5 a 91,2%, nas diferentes concentrações, sendo que o isolado 1189 de *M. anisopliae*, na concentração 10^9 conídios.mL⁻¹, proporcionou a maior mortalidade. O isolado 645 de *B. bassiana*, também proporcionou a mais elevada mortalidade na concentração 10^9 conídios mL⁻¹, seguido dos isolados 634, IPA 198 e 604.

Khosravi et al. (2014), avaliaram a patogenicidade de isolados de *B. bassiana* contra larvas de *Arge rosae*. O bioensaio foi realizado pelo método de imersão com concentrações 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 , 2×10^7 e 2×10^8 conídios.mL⁻¹; o isolado IRAN403C causou a maior mortalidade sendo de 70% usando a concentração 2×10^7 conídios.mL⁻¹, o CL₅₀ e o TL₅₀ obtido foi de $5,54 \times 10^5$ conidia.mL⁻¹ e 3,92 dias para a concentração 2×10^8 conídios.mL⁻¹ respectivamente. No entanto, os resultados encontrados nestas pesquisas demonstraram relação diretamente proporcional entre a quantidade de conídios aplicada nos insetos e a mortalidade

do mesmo, portanto nas suspensões mais diluídas a virulência e a patogenicidade foram menos acentuadas, provocando menor mortalidade em tempo mais prolongado que o observado nas concentrações mais elevadas. Esse fato também foi constatado por outros autores estudando isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em diferentes espécies de insetos (ALVES et al., 1985; SILVA et al., 2003; CUNHA et al., 2008). Segundo Fernandes & Alves (1992), quanto mais conídios penetram, mais toxinas ou enzimas são liberadas, aumentando a mortalidade do inseto. Todavia, a velocidade de ação do fungo depende, além da dosagem, das espécies hospedeiras envolvidas (SOSA-GÓMEZ & MOSCARDI, 1992). Segundo St. Leger (1991), a variação de virulência de isolados de fungos entomopatogênicos está relacionada com a composição química da cutícula e os processos bioquímicos envolvidos para a formação do tubo germinativo e colonização do hospedeiro. Além disso, Oliveira et al. (2004), destacaram que a capacidade do fungo em causar mortalidade se deve à habilidade de seus conídios em reconhecer e produzir enzimas para degradar a cutícula do hospedeiro.

Segundo Pacola-Meirelles & Azevedo (1990), Kleespies & Zimmermann (1994), a variabilidade da patogenicidade entre isolados é resultado das diferenças na produção de enzimas (amilase, protease, lipase) e toxinas, na velocidade de germinação dos conídios, na atividade mecânica de penetração na cutícula e na capacidade de colonização dos isolados. O período que os fungos entomopatogênicos levam para provocar a morte de uma determinada espécie (tempo médio de incubação) varia em função de diversos fatores, dentre eles a espécie do hospedeiro e estágio de desenvolvimento. Resultados semelhantes aos relatados aqui foram encontrados por Moino Jr. et al. (1998), ao avaliar a patogenicidade de 72 isolados dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* para três espécies de insetos-praga de grãos armazenados. Os autores observaram grande variação nas mortalidades obtidas, isolados que foram totalmente ineficientes e outros que provocaram mortalidade confirmada de 100%. Almeida (1994), avaliou a patogenicidade de mais de 100 isolados dos mesmos fungos no cupim *Heterotermes tenuis*, selecionando o isolado 634 de *B. bassiana* que causou alta mortalidade confirmada ao inseto e apresentou boa produção de conídios em diversos meios de cultura. Bharadwaj & Stafford (2011), avaliaram a patogenicidade de *Metarhizium brunneum* em *T. molitor* e *Ixodes scapularis* usando concentrações de 1×10^1 até $8,4 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹. As larvas de *T. molitor* eram menos sensíveis ao *M. brunneum* do que adultos *I. scapularis* (LC₅₀ de $4,4 \times 10^7$ e $1,7 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹, respectivamente, 4 semanas pós-tratamento).

4.7 Identificação molecular

4.7.1 Extração de DNA e Amplificação da região ITS do rDNA através de PCR

Para a extração de DNA foram utilizados os micélios dos fungos crescidos no meio BDA à 25 °C por 7 dias. A extração do DNA genômico de todos os isolados foi efetuada com base no protocolo (DOYLE & DOYLE, 1987), e o mesmo foi considerado eficiente tendo-se obtido quantidades de DNAs suficiente para o desenvolvimento de todo o trabalho.

Os perfis de amplificação das regiões ITS das linhagens utilizadas dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, resultaram em apenas uma banda de aproximadamente 500 pb (Figura 19). Carneiro-leão (2006), obteve bandas de 600 pb quando

amplificou ITS do fungo *M. anisopliae* var. *acridium* com os primers ITS4 e ITS5. Soares et al. (2006), caracterizaram dois fungos entomopatogênicos, antes e pós-infecção, pela amplificação por PCR dos marcadores ITS, (GTG)5 e (GACA)4. Os perfis de amplificação obtidos para *M. anisopliae* var. *anisopliae* resultaram em: (GACA)4 - 8 bandas; (GTG)5 - 10 bandas; ITS- 1 banda de aproximadamente 600 pb. Para *B. bassiana*, os perfis obtidos foram: (GACA)4 - 10 bandas; (GTG)5 - 12 bandas; ITS- 1 banda de aproximadamente 600 pb. Déstefano et al. (2004), fizeram um análise da região ITS1 – 5.8 – ITS2 para diferenciar três espécies do gênero *Metarhizium*. A amplificação com os iniciadores universais ITS1 e ITS4 resultou em um fragmento de aproximadamente 540 pb para as linhagens brasileiras de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, 600 pb para uma linhagem de *M. anisopliae* var. *anisopliae* originaria da Austrália, 650 pb para as linhagens de *M. álbum* e 600 pb para a linhagem de *M. flavoviride*. Brasileiro et al. (2004), utilizaram os iniciadores ITS4 e ITS5 obtendo fragmentos de 620 pb para dezoito isolados de *Fusarium solani*.

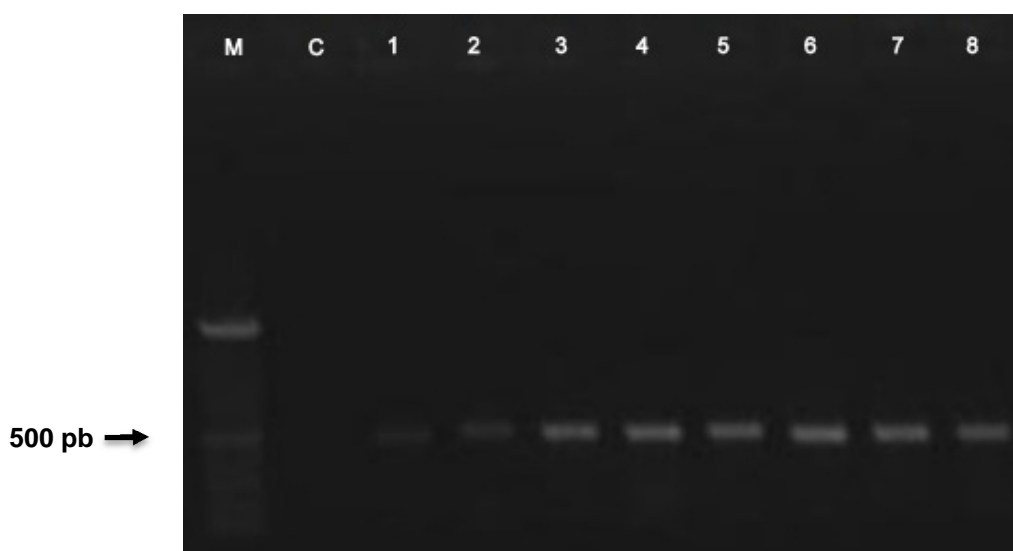


Figura 27. Produtos da amplificação de DNA dos isolados entomopatogênicos com iniciadores ITS1 e ITS4. M = Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). C = Controle negativo. 1, 2, 3, 4 = Isolados de *B. bassiana*. 5, 6, 7, 8 = Isolados de *M. anisopliae*.

4.7.2 Sequenciamento dos fragmentos amplificados

As sequências correspondentes à região ITS1 – 5.8 – ITS4 do DNAr das linhagens do presente estudo foram comparadas com sequências de *M. anisopliae* (n. HM055427.1) e *B. bassiana* (n. KC121560.1), depositadas na base de dados GenBank. O alinhamento e análise filogenética destas sequências revelaram agrupamentos que confirmaram a identidade taxonômica das linhagens usadas neste trabalho. As linhagens de *M. anisopliae* Ma10MI, Ma12MI, Ma58MI e Ma11MI agruparam com a sequência de uma linhagem da mesma espécie recuperada do banco de dados, apresentando similaridade de 100%. Com relação a espécie *B. bassiana*, foi observado que as linhagens Bb11MI, Bb79MI, Bb53MI e Bb27MI formaram um agrupamento com a linhagem de *B. bassiana* recuperada do GenBank, com 100% de similaridade (Figura 20). Segundo Carneiro et al. (2004), um fragmento amplificado de 600 pb de isolados de *B. bassiana* foi sequenciado e revelou uma homologia de mais de 97% com

sequências do rDNA de *B. bassiana* depositadas no GenBank. Carneiro et al. (2008), caracterizaram espécies de *Beauveria* por meio do sequenciamento da região ITS do rDNA e de marcadores RAPD. Os isolados foram caracterizados como *B. bassiana* ou *B. brongniartii* com elevado grau de identidade. A amplificação de genes ribossomais e regiões espaçadoras ITS e IGS têm sido amplamente utilizadas em estudos de taxonomia (DRIVER et al., 2000), de filogenia (RAKOTONIRAINY et al., 1994), de diversidade genética (ANDERSON et al., 2001; UETAKE et al., 2002) e na identificação e diferenciação de espécies (FOULY et al., 1997).

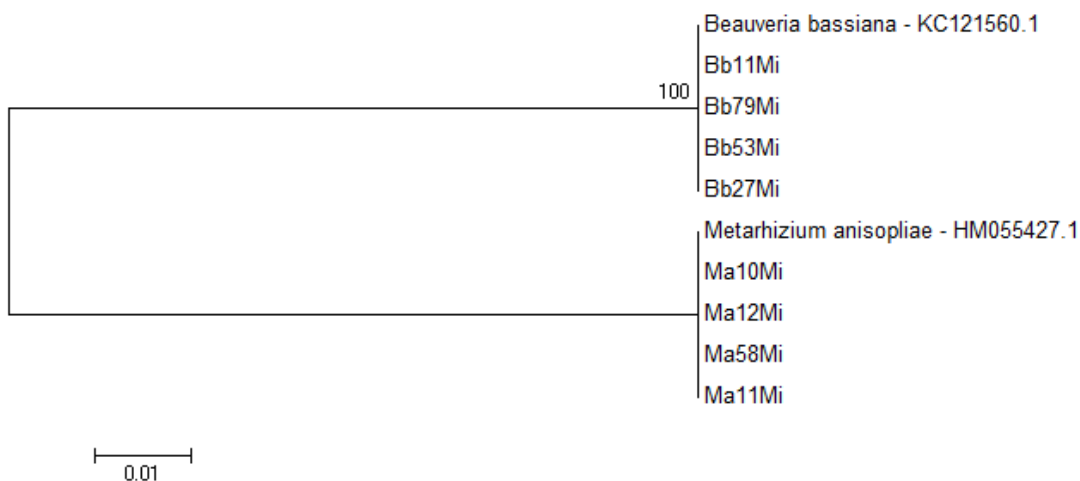


Figura 28. Árvore filogenética construída pelo método de ML, Jukes-Cantor, mostrando a relação entre os isolados dos fungos entomopatogênicos obtidos do Parque Natural Municipal do Curió, Paracambi, RJ - Brasil, e outras espécies relacionadas depositadas no GenBank-NCBI. As sequências utilizadas são das regiões rDNA ITS1.

A combinação filogenética ITS e TEF do gênero *Beauveria* (REHNER & BUCKLEY, 2005) corroborou seu monofiletismo e delineou sete linhagens terminais bem suportados correspondentes para *B. amorfa*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. caledonica* e *B. vermiconia* e duas novas linhagens, clado C, o que é filogeneticamente distinto, mas morfológicamente semelhantes a *B. bassiana*, e clado E, um táxon associado a um *Cordyceps* teleomorfo (REHNER et al., 2011). Mergulhão et al. (2014), utilizaram também a região ITS do DNAr e avaliaram a variabilidade genética e a filogenia de cinco isolados de *Beauveria bassiana*: IPA 145, IPA 148, IPA 223, IPA 225 e IPA 226. A região ITS foi amplificada usando os primers ITS1 e ITS4, em que foi observado um amplicon com tamanho médio de 800 pb, o qual foi sequenciado. Os resultados mostram que todos os isolados, com exceção do IPA145, apresentaram-se como grupo monofilético. O IPA145 apresentou uma identidade genética com *Cordyceps bassiana* e *B. bassiana* de 99%. O IPA148 foi o mais distante geneticamente com relação aos demais, com menos de 40% de similaridade. Poëaim et al. (2014), detectaram a diversidade genética de 29 isolados de *Beauveria*, usando técnicas de sequenciamento, PCR-FLP da região ITS1-5,8-ITS2 e uma pequena porção de 18S e 28S rDNA e RAPD. Os primers ITS1/ITS4 e PN3/PN16 detectaram um único fragmento de aproximadamente 600 a 900 pb, respectivamente. Conforme aos dados de sequenciamento todas as amostras dos isolados são *Beauveria* foram agrupados em dois grupos principais: *B. bassiana* e *B. brongniartii*. Além disso, *B. bassiana* foi subdividida em dois grupos: Bb011, Bb015, Bb016 e Bb025, cujas sequências foram diferentes da outra *B. bassiana* (dados não mostrados). Com base nos padrões de RFLP, os isolados eram divididos em dois grupos distintos como observado usando Alui e

HhaI (AspLEI). A técnica PCR-RFLP distinguiu com êxito 25 isolados de *B. bassiana* e 4 isolados de *B. brongniartii*. A técnica RAPD foi utilizada para estudar a relação genética entre os 14 isolados.

Marcadores RAPD e análises de sequências ITS-rDNA tem sido aplicadas para determinar a diversidade genética de *M. anisopliae* e *B. bassiana* (DRIVER et al., 2000; MURO et al., 2005; ENTZ et al., 2005; BECERRA et al., 2007; FREED et al., 2011).

Dessa forma Bautista-Galvez et al. (2012), fizeram a caracterização genética de isolados de *M. anisopliae*, onde obtiveram fragmentos de 600 a 800 pb da amplificação da PCR das regiões ITS1-ITS4 do rDNA. O tamanho dos fragmentos de DNA dos isolados de *M. anisopliae* coletados nas culturas de cana de açúcar foram similares as reportadas para a cepa de referência *M. anisopliae* (L0909). A comparação das ITS rDNA obtidas dos fungos isolados com respeito a base de dados do GenBank (NCBI) indicou que os isolados MM0801, AD0702, AD0803, CD0804, FC0805, FC0706, AS0807, GB0808, L0909, BC0710, SF0811, M370 e M374 correspondem a *M. anisopliae* e os isolados AR0814 e JC0816 foram para *B. bassiana*. Driver et al. (2000), reavaliaram a taxonomia de *Metarhizium* spp. baseando-se em análises de sequências da região ITS e moldes de RAPD. Estes autores encontraram, um alto nível de diversidade genética entre os isolados e revelaram novas variedades dentro de *Metarhizium* spp.. Desta forma, 10 grupos distintos são atualmente reconhecidos: *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *majus*, *M. anisopliae* var. *lepidiotum* e *M. anisopliae* var. *acridium* (as duas últimas são consideradas novas variedades de *M. anisopliae*), *M. álbum*, *M. flavoviride* var. *flavoviridae*, *M. flavoviride* var. *minus*, *M. flavoviride* var. *novazealandicum*, *M. flavoviride* var. *pemphigum* e *M. flavoviride* Type E (sendo que as três últimas representam novas variedades de *M. flavoviride*).

A região ITS é constituída por 500-800 pb, de acordo com Pantou et al. (2003), o rDNA de *M. anisopliae* contém 8118 pb, incluindo os genes de rRNA de 18S, 5.8S e 28S. O sequenciamento da região ITS permite uma comparação com sequências de outras linhagens de *Metarhizium* spp. já conhecidas e o alinhamento e as análises filogenéticas confirmaram a identidade taxonômica dos isolados analisados. Os isolados Ma10MI, Ma12MI, Ma58MI e Ma11MI foram identificados como sendo pertencente a espécie *M. anisopliae*. A similaridade encontrada entre as sequências da região do rDNA destes isolados com *M. anisopliae* foi de 100%. Tigano-Milani et al. (1995), observaram que o genótipo de um isolado parece estar mais relacionado com o hospedeiro do que com o local de origem geográfica. Esses autores relataram que o solo apresenta muitos isolados de *M. anisopliae* com grande variabilidade genética em uma área específica. Até à data, apenas um número limitado de estudos tem definitivamente identificado cepas brasileiras de *Metarhizium* usando métodos contemporâneos baseados em sequência. Oito espécies *Metarhizium* foram documentadas para ocorrer no Brasil utilizando a 1-alfa (50-TEF) como a identificação de espécies de diagnóstico (Bischoff et al. 2009), incluindo *M. anisopliae* s. s., *M. pemphigi* (Driver & R.J. Milner) Kepler, S. A. Rehner & Humber, comb. et stat. nov. (= *M. flavoviride* var. *pemphigi*), *M. lepidiotae* (Driver & Milner) J.F. Bisch, Rehner & Humber, *M. pingshaense* Q. T. Chen & H. L. Guo e *Metarhizium robertsii* J. F. Bisch., Rehner & Humber, *M. acridum* (Driver & Milner) J. F. Bisch., Rehner & Humber, *M. brunneum* Petch, *M. majus* (J. Johnston) J. F. Bisch., Rehner & Humber (LOPES et al. 2013a, b, 2014; ROCHA et al. 2013).

5 CONCLUSÕES

- ✓ O método de larvas isca é o mais eficiente (88%) para o isolamento de fungos entomopatogênicos.
- ✓ Foram isolados 216 fungos entomopatogênicos, 106 foram identificados como sendo *Beauveria bassiana*, e 85 como sendo *Metarhizium anisopliae*, através da caracterização morfológica.
- ✓ O isolamento de fungos entomopatogênicos usando meio seletivo proporciona uma menor taxa de detecção geral (12,0%), a maior quantidade de fungos entomopatogênicos ocorreu no período chuvoso, pois neste período foram encontradas temperaturas mais elevadas bem como maior umidade do solo, propiciando boas condições para os fungos entomopatogênicos.
- ✓ A maior ocorrência de *B. bassiana* e *M. anisopliae* é apresentada usando o meio BDA+TI.
- ✓ A espécie mais predominante é *B. bassiana* isolada com *G. mellonella* (36,0% e 36,0%) no período seco e chuvoso.
- ✓ *Metarhizium anisopliae* foi mais isolado em larvas de *T. molitor* no período seco e chuvoso (33,3% e 32,0% respectivamente).
- ✓ O método isca com larvas de *G. mellonella* e *T. molitor* é um método sensível para o isolamento de fungos entomopatogênicos em solo.
- ✓ A ocorrência de *M. anisopliae* e *B. bassiana* não é afetada pelas propriedades do solo.
- ✓ Os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* mostraram diferentes capacidades de produzir a morte nos insetos, tendo as cepas Bb53MI e Bb79MI de *B. bassiana* com maior virulência (79,33 e 80,66% respectivamente) para *G. mellonella*; a cepa Bb79MI de *B. bassiana* foi a mais virulenta (78%) para *T. molitor*. As cepas de *M. anisopliae* com a mais alta virulência foram Ma58MI e Ma10MI para *G. mellonella* (83,33 e 81,33% respectivamente) e para *T. molitor* (82 e 82% respectivamente).
- ✓ O sequenciamento da região ITS permitiu uma comparação com sequências de outras linhagens de *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp., já conhecidas e o alinhamento e as análises filogenéticas confirmaram a identidade taxonômica dos isolados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, P.A., MILLER, S.A., MEULIA, T., HOITINK, H.A., KIM, J. Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes using molecular markers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5421-5426, 1999.
- AIGN, V.; SCHULTE, U.; HOHEISEL, J. D. Hybridization-Based Mapping of *Neurospora crassa* Linkage Groups II and V. **Genetics**, v. 157, p. 1015-1020, 2001.
- AIME, M. C.; MATHENY, P. B.; HENK, D. A.; FRIEDERS, E. M.; NILSSON, R. H.; PIEPENBRING, M., MCLAUGHLIN, D. J.; SZABO, L. J.; BEGEROW, D.; SAMPAIO, J. P.; BAUER, R.; WEIB, M.; OBERWINKLER, F.; HIBBETT, D. An overview of the higher level classification of Pucciniomycotina based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. **Mycologia**, v. 98, p. 896-905, 2006.
- ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. A. A indústria do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. In: Simpósio de controle biológico, 10, Brasília, DF. **Resumos...** Brasília, 2007, 66p.
- ALVES, S. B. 1998. (2 ed.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163 p.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.), **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, n. 4, p. 289-381.
- ALVES, S. B.; LECUONA, R. E. Epizootia aplicada ao controle microbiano. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap. 5, p. 97-169.
- ANDERSCH, W., HARTWIG, J., REINECKE, P., STENZEL, K. Production of mycelial granules of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for biological control of soil pests. Proc. and abstracts of Vth Intern. **Invertebrate Pathology and Microbial Control**, p. 2-5, 1990.
- ANDERSON, J. B.; STASOVSKI, E. Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. **Mycologia**, v. 84, n. 4, p. 505-516, 1992.
- ANN, J.; DERICK, P.; HOPE, C. N.; GENEVIEVE, J.; MADAMBA, R.; RIVERO, H. Virulence of Local *Metarhizium* spp. Isolates Against *Tenebrio Molitor* (Linn): An Initial Comparison with Non-Native and Commercially Available Strains. **International Journal of the Computer, the Internet and Management**, v. 21, p. 48-52, 2013.
- ASAFF, T. A.; REYES, V. Y.; LOPEZ, L. V. E.; DE LA TORRE, M. M. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. **Avance y Perspectiva**, v. 21, p. 291-295, 2002.

- AUNG, O. M.; SOYTONG, K.; HYDE, K.D. Diversity of entomopathogenic fungi in rainforests of Chiang Mai Province, Thailand. **Fungal Diversity**, v. 30, p. 15-22, 2008.
- AZEVEDO, A. C.; FURLANETO, M. C.; SOSA-GOMEZ, D. R.; FUNGARO, M. H. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 4, p. 729-732, 2000.
- BADII, M. H.; ABREU, J. L. Control biológico una forma sustentable de control de plagas. **International Journal of Good Conscience**, v. 1, p. 82-89, 2006.
- BALAZY S. Flora of Poland. Fungi (Mycota). Entomophthorales. Krakow, Poland: **Polish Academy of Sciences**, v. 24, 1993, 356 p.
- BARBEE, M. L.; TAYLOR, J. W. Dating the molecular clock in fungi: How close are we?. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, p. 1-16, 2010.
- BATEMAN, R. P.; CAREY, M.; BATT, D.; PRIOR, C.; ABRAHAM, Y.; MOORE, D.; JENKINS, N. E.; FENLON, Y. Screening for virulent isolates of entomopathogenic fungi against the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål). **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, p. 549-560, 1996.
- BATISTA, F. A. Controle biológico e o manejo integrado de pragas. **Biológico**, v. 55, p. 36-39, 1989.
- BAUTISTA-GALVEZ, A.; BARRERA, J. F.; PAYRÓ DE LA CRUZ, E.; SALGADO-GARCÍA, S.; GÓMEZ-RUIZ, J.; GOMEZ LEYVA, J. F. Genetic characterisation of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin isolates from sugarcane fields and their pathogenicity against *Aeneolamia postica* (Walker) (Hemiptera: Cercopidae). **Universidad y Ciencia**, v. 28, n. 3, p. 217-229, 2012.
- BECERRA, V.; PAREDES, M.; ROJO, C.; FRANCE A. RAPD e ITS Detectan Variación Molecular en Poblaciones Chilenas de *Beauveria bassiana*. **Agricultura Técnica**, v. 67, p. 115-125, 2007.
- BEILHARZ, V. C.; BEILHARZ, D. G.; PARBERY, D. G.; SWART, H. J. 'Dodine: A Selective Agent for Certain Soil Fungi'. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 79, p. 507-511, 1982.
- BELLO, V. A.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Localization of Auxotrophic and Benomyl Resistance Markers through the Parasexual Cycle in the *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill Entomopathogen. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 119-125, 1998.

- BENNY, G. L. 2009. Overview of the Zygomycetes. Disponível em: <http://www.zygomycetes.org>.
- BERRETA, M. F.; LECUONA, R. E.; ZANDOMENI, R. O.; GRAU, O. Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent labels. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, p. 145-50, 1998.
- BEYS DA SILVA, W.; SANTI, L.; SCHRANK A.; VAINSTEIN. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* infection. **Fungal Biology**, v. 114, p. 10-15, 2010.
- BHARADWAJ, A. K.; JASROTIA, P.; HAMILTONA, S. K.; ROBERTSONA, G. P. Ecological management of intensively cropped agro-ecosystems improves soil quality with sustained productivity. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 140, p. 419-429, 2011.
- BIDOCHKA, M.; KHACHATOURIANS, G. The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 106-117, 1991.
- BIDOCHKA, M.; KHACHATOURIANS, G. Growth of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* on Cuticular Components from the Migratory Grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 59, p. 165-173, 1992.
- BIDOCHKA, M. J.; KASPERSKI, J. E.; WILD, G. A. M. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, p. 1198-1204, 1998.
- BIDOCHKA, M. J.; ST. LEGER, R. J.; STUART, A.; GOWANLOCK, K. Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* and its relationship to insect and plant virulence, extracellular proteases and carbohydrases. **Microbiology**, v. 145, p. 955-963, 1999.
- BIDOCHKA, M. J.; KAMP, A. M.; LAVENDER, T. M.; DEKONING, J.; DE CROOS, J. N. A. Habitat Association in Two Genetic Groups of the Insect-Pathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering Cryptic Species?. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1335-1342, 2001.
- BIDOCHKA, M. J.; MCDONALD, M. A.; ST LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Current genetics**, v. 25, p. 107-13, 1994.
- BLACKWELL, M. Fungal evolution and taxonomy. **BioControl**, v. 55, p. 7-16, 2010.

- BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, p. 512-530, 2009.
- BOOMSMA, J.; JENSEN, A.; MEYLING, N.; EILENBERG, J. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. Ver. **Entomology**, v. 59, p. 467-485, 2014.
- BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C.; LATGE, J. P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1795-1805, 1988.
- BOUCIAS, D.; STOKES, C.; SUAZO, A.; FUNDERBURK, J. AFLP analysis of the entomopathogen *Nomuraea rileyi*. **Mycologia**, v. 92, n. 4, p. 638-648, 2000.
- BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N.; FLINT, S. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, p. 418-422, 2006.
- BRIDGE, P. D.; WORLAND, M. R. First report of an entomophthoralean fungus on an arthropod host in Antarctica. **Polar Biology**, v. 27, p. 190-192, 2004.
- BRUCK, D.J. Natural occurrence of entomopathogens in Pacific Northwest nursery soils and their virulence to the black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus* (F.) (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, v. 33, p.1335-1343, 2004.
- BRUGÉRE, J.F.; CORNILLOT, F.; MÉTÉNIER, G.; VIVARÉS, C.P. In-gel DNA radiolabelling and two-dimensional pulsed field gel electrophoresis procedure suitable for fingerprinting and mapping small eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 48, 2000.
- BRUNS, T. D.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 22, p. 525-564, 1991.
- BUSCOT, F.; WIPF, D.; DI BATTISTA, C.; MUNCH, J. C.; BOTTON, B.; MARTIN, F. DNA polymorphism in morels: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed-PCR. **Mycological Research**, v. 100, p. 63-71, 1996.
- BUSTILLO, A. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. In: seminario Uso de entomopatógenos en Colombia. **Sociedad Colombiana de Entomología**. Bogotá, 2004. p. 30-53.

- BUTT, T. M.; WANG, C.; SHAH F. A.; HALL, R. Degeneration of entomogenous fungi. In J. Eilenberg & H. M. T. Hockkanen (Eds.), **Na Ecological and societal approach to Biological Control**, 2006, p. 213-226.
- CAETANO-ANOLLES, G. MAAP: a versatile and universal tool for genome analysis. **Plant Molecular Biology**, v. 25, p. 1011-1026, 1994.
- CAÑEDO, V.; AMES, T. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 2004, 62 p.
- CARDER, J.H.; BARBARA, D.J. 1991. Molecular variation and restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) within and between six species of *Verticillium*. **Mycological Research**, v. 95, p. 935-942, 1991.
- CARNEIRO, A.; GOMES, E.; GUIMARÃES, C.; FERNANDES, F.; CARNEIRO, N.; CRUZ, I. Molecular characterization and pathogenicity of isolates of *Beauveria* spp. to fall armyworm. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, p. 513-520, 2008.
- CARRUTHERS, R.I; SOPER, R.S. Fungal diseases. In: Fuxa, J.R.; Tanada, Y. (eds.) **Epizootiology of Insect Diseases**. New York: John Wiley & Sons. 1978, p. 357-416.
- CASTRILLO, L. A.; BROOKS, W. M. Identification of *Beauveria bassiana* isolates from the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD analyses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 190-194, 1998.
- CASTRILLO, L. A.; WIEGMANN, B. M.; BROOKS, W.M. Genetic variation in *Beauveria bassiana* populations associated with the darkling beetle, *lphitobius diaperinus*, in poultry houses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, p. 269-275, 1999.
- CHAGAS, H. A; ROSA, D. D.; BASSETO, M. A.; ZANOTTO, M. D.; FURTADO, E. L. Avaliação da esporulação de *Bionectria ochroleuca* em diferentes meios de culturas. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 3, 2010.
- CHANDLER, D.; HAY, D.; REID, A. P. Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. **Applied Soil Ecology**, v. 5, p. 133-141, 1997.
- CHAMPLIN, F. R., GRULA, E. A. Noninvolvement of beauvericin in the entomopathogenicity of *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 1122-1125, 1979.
- CHARNLEY, A. K. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. **Advances in Botanical Research**, v. 40, p. 241-321, 2003.

- CHARNLEY, A.K. Mechanism of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. In: Lomer, C.J., C. Prior (eds.), **Biological control of locusts and grasshoppers**. Melkshan, UK: CAB International, 1992, 191 p.
- CHASE, A. R.; OSBORNE, L. S.; FERGUSON, V. M. 'Selective Isolation of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an Artificial Potting Medium'. **Florida Entomologist**, v. 69, p. 285-292, 1986.
- COATES, B.; HELLMICH, R.; LEWIS, L. *Beauveria bassiana* haplotype determination based on nuclear rDNA internal transcribed spacer PCR-RFLP. **Mycological Research**, v. 106, p. 40-50, 2002a.
- CODDINGTON, A.; MATTHEWS, P.M.; CULLIS, C.; SMITH, K. H. Restriction digest patterns of total DNA from different races of *Fusarium oxysporum* f.sp. pisi- an improved method for race classification. **Journal of Phytopathology**, v. 118, p. 9-20, 1987.
- COOK, D.; BARLOW, E.; SEQUEIRA, L. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 2, p. 113-121, 1989.
- COLE, S.; CHARNLEY, K.; COOPER R. Purification and partial characterisation of a novel trypsin-like cysteine protease from *Metarhizium anisopliae*, **FEMS Microbiology Letters**, v. 113, p. 189-196, 1993.
- COLE, G.T.; HOCH, H.C, EDS. **The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals**. New York: Plenum, 1991.
- CUNNINGHAM, K. G.; MANSON, W.; SPRING, F. S.; HUTCHINSON, S. A. Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. **Nature**, v. 166, p. 949-952, 1950.
- DE CROOS, J. N. A.; BIDOCHKA, M. J. Effects of low temperature on growth parameters in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 1055-1061, 1999.
- DE FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biociência**, v. 22, p. 18-21, 2001.
- DE FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, p. 237-256, 2007.

- DELALIBERA, I.; HAJEK, A. E.; HUMBER, R. A. *Neozygites tanajoae* sp. nov, a pathogen of the cassava green mite. **Mycologia**, v. 96, p. 1002-1009, 2004.
- DE OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M. C., GOMES, E. A., LANNA, U. G. P., AS, N. M. H.; MARRIEL, I. E. Otimização da metodologia de extração e amplificação do DNA de fungos do solo. 2005. Circular Técnica (69) (INFOTECA-E). Sete Lagoas Embrapa Milho e Sorgo, 2005. p. 1-6. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 1 ed. Disponível em: www.infoteca.cnptia.embrapa.br/doc/489283.
- DEVOTTO, L. M.; GERDING, A.; FRANCE, A. Hongos entomopatógenos: una alternativa para la obtencion de Biopesticidas. **Bioleche**, v. 23, p. 30-33, 2000.
- DESTÉFANO, R. H.; LANZA, S. A.; MESSIAS, C. L. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 245-252, 2004.
- DILLON, R. J.; CHARNLEY, A. K. A technique for accelerating and synchronising germination of conidia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Microbiology**, v. 142, p. 204-206, 1985.
- DOBERSKI, J. W. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 37, p. 195-200, 1981.
- DOBERSKI, J.; TRIBE, H. Isolation of entomogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Trans. Br. Archives of Microbiology*, v. 74, p. 95-100, 1980.
- DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J.W.H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, v. 104, p. 134-150, 2000.
- EDWARDS, K. J. Polimerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLPs). **In Molecular tools for screening biodiversity**. A. Karp, PG Isaac y DS Ingram (eds.) Chapman and Hall, v. 8, p. 132-134, 1998.
- EKESI, S.; MANIANIA, N. K. AMPONG- KYARKO, K.; ONU, I. Effect of intercropping cowpea with maize on the performance of *Metarhizium anisopliae* against *Megalurothrips*

- sjostedti (Thysanoptera: Thripidae) and predators. **Environmental Entomology**, v. 28, p. 1154-1161, 1999.
- EKESI, S.; MANIANIA, N. K.; LUX, S. A. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 83, p. 157-167, 2003.
- EILENBERG, J. Biology of fungi from the order Entomophthorales with emphasis on the genera Entomophthora, Strongwellsea and Eryniopsis: a contribution to insect pathology and biological control. 2002. 407p. DSc thesis. Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark.
- EILENBERG, J.; BRESCIANI, J.; LATGE, JP. Ultrastructural studies of primary spore formation and discharge in the genus *Entomophthora*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 48, p. 318-24, 1986.
- EILENBERG, J; MICHELSEN, V. Natural host range and prevalence of the genus *Strongwellsea* (Zygomycota: Entomophthorales) in Denmark. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, p. 189-98, 1999.
- EMBRAPA, 1997. Manual de métodos de análise de solo. 2 ed. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 1997, 212p.
- ENKERLI, J.; KOLLIKER, R.; KELLER, S.; WIDMER, F. Isolation and characterization of microsatellite markers from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 384-386, 2005.
- ENKERLI, J.; WIDMER, F. Molecular ecology of fungal entomopathogens: molecular genetic tools and their applications in population and fate studies. **BioControl**, v. 55, p. 17-37, 2010.
- ENKERLI, J.; MOOSBAUER, P.; WIDMER, F.; DORN, S.; KELLER, S. Isolation of *Beauveria brongniartii* from soil: are the available isolation tools neutral? **IOBC/wprsBulletin**, v. 28, p. 25-29, 2005.
- ENKERLI, J.; WIDMER, F.; GESSLER, C.; KELLER, S. Strain-specific microsatellites markers in the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. **Mycological Research**, v. 105, p. 1079-1087, 2001.
- ENTZ, S. C.; JOHNSON, D. L.; KAWCHUK, L. M. 2005. Development of a PCR-based diagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Mycological Research**, v. 109, p. 1302-1312, 2005.

- ELOSEGUI, C. O. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos antagonistas. La Habana-Cuba: Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), 2006, p. 6-8.
- ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URURUBU, F.; QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of 5.8 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 329-337, 1999.
- EYAL, J.; MABUD, M. D. A.; FISCHBEIN, K. L.; WALTER, J. F.; OSBORNE, L. S.; LANDA, Z. Assessment of *Beauveria bassiana* Nov. EO-1 strain, which produces a red pigment for microbial control. **Applied and Biochemical and Biotechnology**, v. 44, p. 65-80. 1994.
- FAN, Y.; FANG, W.; GUO, S.; PEI, X.; ZHANG, Y.; XIAO, Y.; LI, D.; JIN, K.; BIDOCHKA, M. J.; PEI, Y. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 295-302, 2007.
- FANG, W.; FENG, J.; FAN, Y.; ZHANG, Y.; BIDOCHKA, M.J.; LEGER, R.J.; PEI, Y. Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.102, p. 155-159, 2009.
- FANG, W.; LENG, B.; XIAO, Y.; JIN, K.; MA, J.; FAN, Y.; FENG, J.; YANG, X.; ZHANG, Y.; PEI, Y. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. **Applied and Environmental. Microbiology**, v. 71, p. 363-370, 2005.
- FARGUES, J.; GOETTEL, M. S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; ROUGIER, M. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. **Mycologia**, v. 89, p. 383-392, 1997.
- FARGUES, J.; MANIANIA, N. K.; DELMAS, J. C.; SMITS, N. Influence de la temperture sur la croissance in vitro d'Hyphomycetes entomopathogenes. **Agronomie**, v. 12, p. 557- 564, 1992.
- FARGUES, J.; ROBERT, P. H. Persistence of conidia of four entomopathogenic Hypomycetes in soil, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. *Nomurea rileyi* (F.) Samson and *Paecilomyces fumosoroseus* Wize, in controlled conditions. **Agronomie**, v. 5, p. 73-80, 1985.

- FEGAN, M.; MANNERS, J. M.; MACLEAN, D. J.; IRWIN, J. A. G.; SAMUELS, K. D. Z.; HOLDON, D. G. Random amplified polymorphic markers reveal high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal General and Applied Microbiology**, v. 13, p. 2075-2081, 1993.
- FERNANDES, É. K. K.; KEYSER, C. A.; RANGEL, D. E. N.; FOSTER, R. N.; ROBERTS, D. W. CTC médium: a novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridium*, from soil. **Biological Control**, v. 54, p. 197- 205, 2010.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220p.
- FERRON, P. Biological control of insects pest by entomogenous fungi. **Entomology**, v. 23, p. 409-442, 1978.
- FERRON, P. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* [Fungi Imperfecti, Moniliales] in imagines of *Acanthoscelides obtectus* [Col.: Bruchidae]. **Entomophaga**, v. 22, p. 393-396, 1977.
- FERRON, P. Fungal control. In “Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology”, Vol. 4. (G. A. Kerkut, and L. I. Gilbert, Eds.), pp. 314-346, 1985.
- FRAGA, M. E.; BRAZ, D. M.; ROCHA, J. F.; PEREIRA, M. G.; FIGUEIREDO, D. V. Interação microrganismo, solo e flora como condutores de biodiversidade na Mata Atlântica. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, p. 857-865, 2012.
- FRANCO, K.; RODRÍGUEZ, S.; CERVANTES, J.; BARRANCO, J. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. **Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente**, v. 11, p.22, 2011.
- FREIMOSER, F.M., GRUNDSCHOBBER A., TUOR U., AEBI, M. Regulation of hyphal growth and sporulation of the insect pathogenic fungus *Entomophthora thripidum* in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, v. 222, p. 281-287, 2003.
- FREIRE, L. L. C.; COSTA, A. B. L.; GÓES, L.B.; OLIVEIRA, N. T. DNA Polymorphism and Total Proteins in mutants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin strain Eg. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 32, p. 93-97, 2001.
- FREIMOSER, F. M.; HU, G.; ST LEGER, R. J. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. **Microbiology**, v. 151, p. 361-371, 2005.

- FREIMOSER, F. M.; SCREEN, S.; BAGGA, S.; HU, G.; ST LEGER, R. J. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. **Microbiology**, v. 149, p. 239-247, 2003.
- FILHO, E.; MARQUES, E.; BARROS, R. Selection of *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) and *Beauveria bassiana* (BALS.) isolates to control *Alabama argillacea* (HUEBNER) caterpillars. **Scientia Agricola**, v. 59, 2002.
- FOTH H. D. Fundamentals of Soil Science. 8 ed. John Wiley & Sons, London, 1984, 215 p.
- FOULY, H.; WILKINSON, H.T.; CHEN, W. Restriction analysis of internal transcribed spacers and the small subunit gene of ribosomal DNA among four Gaeumannomyces species. **Mycologia**, v. 89, p. 590-597, 1997.
- FUGUET, R.; THÉRAUD, M.; VEY, A. Production *in vitro* of toxic macromolecules by strains of *Beauveria bassiana*, and purification of a chitosanase-like protein secreted by a melanizing isolate. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 138, p. 149-161, 2004.
- FUGUET, R.; VEY A. Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria* spp. *in vivo* studies. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 152-167, 2004.
- GAITAN, A.; VALDERRAMA, A.; SALDARRIAGA, G.; VELEZ, P.; BUSTILLO, A. Genetic variability of *Beauveria bassiana* associated with the coffee Berry borer (*Hypothenemus hampei*) and other insects. **Mycological Research**, v. 11, p. 1307-1314, 2002.
- GARCIA, C.; GONZALEZ, M.; BAUTISTA, M. Patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 37, 2011.
- GARCIA GUTIÉRREZ, C.; GONZÁLEZ MALDONADO, M. B. Uso de bioinsecticidas para el control de plagas de hortalizas en comunidades rurales. **Ra Ximhai**, v. 6, n. 1, p. 17-22, 2010.
- GEISER, D. M.; GUEIDAN, C.; MIADLIKOWSKA, J.; LUTZONI, F.; KAUFF, F.; HOFSTETTER, V.; FRAKER, E.; SCHOCH, C. L.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W. A.; APTROOT, A. Eurotiomycetes: Eurotiomycetidae and Chaetothyriomycetidae. **Mycologia**, v. 98, p. 1053-1064, 2006.

- GERDING G.; GERDING, M. M.; FRANCE, P. A. 2002. Evaluación de aislamientos de *Metarhizium* y *Beauveria* en diferentes concentraciones sobre *Rhyacionia buoliana* Denis & Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae). p. 55. XXIV Congreso Nacional de Entomología, 12-14 de noviembre. Servicio Agrícola y Ganadero y Sociedad Chilena de Entomología, Santiago, Chile.
- GHANBARY, M. A. T.; ASGHARZADEH, A.; HADIZADEH, A. R.; SHARIF, M. M. A quick method for *Metarhizium anisopliae* isolation from cultural soils. **American Journal of Agriculture and Biological Science**, v. 4, p. 152–155, 2009.
- GILLINGS, M.; HOLLEY, M. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive Intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. **Letter Applied Microbiology**, v. 25, p. 17-21, 1997.
- GILLESPIE, A.T.; CLAYDON, N. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. **Pesticide Science**, v. 27, p. 203-215, 1989.
- GIRALDO, J. Uso de hongos entomopatógenos en el control de ectoparásitos. Universidad del Tolima. Artículo de divulgación, **Revista Ganadero**. Tolima, Colombia, 2009.
- GLARE, T. R.; CHILVERS, G. A.; MILNER, R. J. Capilliconidia as infective spores in *Zoophthora phalloides* (Entomophthorales). **Transactions of the British Mycological Society**, v. 85, p. 463-470, 1985.
- GOETTEL, M.S.; INGLIS, D. Fungi: Hyphomycetes. In: LACEY, L. (Ed.) **Manual of techniques in insect pathology**. San Diego: Academic Press, 1997, cap. V-3, p. 213-249.
- GOETTEL, M. S.; INGLIS, G. D.; WRAIGHT, S. P. Fungi. In: **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. Cap 4. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000, p. 255-282.
- GONZÁLEZ-CASTILLO, M.; AGUILAR, C.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R. Control de insectos-plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. **Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila**, v. 4, p. 8, 2012.
- GÓMEZ, E.; ALVAREZ, R.M.; FRAGA, R.; REYES, I.; HERNÁNDEZ, J.; LEMES, T. Metabolitos producidos por el hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii*. **Biotecnología Aplicada**, v. 21, p. 92-96, 2004.
- GOTTWALD, T. R.; TEDDERS, W. L. Colonization, transmission, and longevity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina, Hypomycetes) on pecan weevil

- larvae (Coleoptera, Curculionidae) in the soil. **Environmental Entomology**, v. 13, p. 557-560, 1984.
- HAJEK, A. E. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. **Advances in Microbial Ecology**, v. 15, p. 193-249, 1997.
- HAJEK, A. E.; DELALIBERA, I. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. **BioControl**, v. 55, p. 147-158, 2010.
- HAJEK, A.E.; SHIMAZU, M. Types of spores produced by *Entomophaga maimaiga* infecting the gypsy moth *Lymantria dispar*. **Canadian Journal of Botany**, v. 74, p. 708-715, 1996.
- HAJEK, A.E.; ST. LEGER, R.J. Interactions between fungal pathogens and insect host. **Annual Review of Entomology**, v. 39, p. 293-322, 1994.
- HAMILL, R. L.; HIGGENS, C. E.; BOAZ, H. E.; GORMAN, M. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. **Tetrahedron Letter**, v. 49, p. 4255-4258, 1969.
- HANNUSCH, D. J.; BOLAND, G. J. Interactions of air temperature, relative humidity and biological control agents on grey mold of bean. **European journal of plant pathology**, v. 102, p. 133-142, 1996.
- HARTUNG, J.S.; CIVEROLO, E. L. Genomic fingerprints of *Xanthomonas campestris* var. *citri* strains from Asia, South America and Florida. **Phytopathology**, v.77, p. 282-285, 1987.
- HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Identification and differentiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using Polymerase Chain Reaction and singlestrain conformation polymorphism analysis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, p. 289-299, 1996.
- HEGEDUS, D. D.; KHACHATOURIANS, G. G. Identification of molecular variants in mitochondrial DNAs of members of the genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Metarhizium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 4283-4288, 1993.
- HENK, D. A.; VILGALYS, R. Molecular phylogeny suggests a single origin of insect symbiosis in the Pucciniomyces with support for some relationships within the genus *Septobasidium*. **American Journal of Botany**, v. 94, p. 1515-1526, 2007.
- HESKETH, H.; ROY, H. E.; EILENBERG, J.; PELL, J. K.; HAILS, R.S. Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. **BioControl**, v. 55, p. 55-73, 2010.

- HIBBETT, D.S.; BINDER, M., BISCHOFF, J.F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.F. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, p. 509-47, 2007.
- HIBBETT, D. S.; OHMAN, A.; GLOTZER, D.; NUHN, M.; KIRK, P.; NILSSON, R. H. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. **Fungal Biology Review**, v. 25, p. 38-47, 2011.
- HODGE, K. T. Clavicipitaceous anamorphs. In J. F. White, Jr., C. W. Bacon, N. L. Hywel-Jones & J. W. Spatafora (Eds.), **Clavicipitalean Fungi: Evolutionary Biology, Chemistry, Biocontrol, and Cultural Impacts**, New York: Marcel Dekker, 2003, p. 75-123.
- HOLDER, D. J.; KEYHANI, N. O. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5260-5266, 2005.
- HU, G.; ST. LEGER, J. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 6383-6387, 2002.
- HUGHES, W.O.H.; BOOMSMA, J.J. Let your enemy do the work: within-host interactions between two fungal parasites of leaf-cutting ants. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 271, p. 104, 2004.
- HUGHES, W. O. H.; THOMSEN, L.; EILENBERG, J.; BOOMSMA J. J. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 46-53, 2004.
- HULBERT, S.H.; MICHELMORE, R.W. 1998. DNA restriction fragment length polymorphisms and somatic variation in the lettuce downy mildew fungus, *Bremia lactucae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 1, p. 17-24, 1998.
- HUMBER, R. A. Evolution of entomopathogenicity in fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 262-266, 2008.
- HUMBER, R. A. Identification of entomopathogenic fungi, In: Lacey, L. A. (Ed.), **Manual of techniques in insect pathology**, second ed. Academic Press, Inc., California, USA, p. 151-187, 2012.

- IGNOFFO, C. M. Effects of entomopathogens on vertebrates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 217, p. 141-172, 1973.
- IGNOFFO, C. M.; GARCIA, C. Influence of conidial color on inactivation of several entomogenous fungi (Hyphomycetes) by simulated sunlight. **Environmental Entomology**, v. 21, p. 913-917, 1992.
- IMOULAN, A.; ALAOUI, A.; EL MEZIANE, A. Occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in Moroccan endemic forests of *Argania spinosa*. **IOBC/wprs Bulletin**, v. 45, p. 316-319, 2009.
- INGLIS, D.G.; DUKE, G.M.; GOETTEL, M.S.; KABALUK, T.J. Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia. ScienceDirect. **Journal of Invertebrate Pathology**, p. 101-113, 2008.
- INGLIS, G. D.; ENKERLI, J.; GOETTEL, M.S. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. In: Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, ed. LL Lacey, Amsterdam: Academic, 2012, p.189-253.
- INGLIS, G. D.; GOETTEL, M. S.; BUTT, T. M.; STRASSER, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: T. M. Butt, C. Jackson & N. Magan (Eds.), **Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential**, Wallingford: CABI, 2001, p. 23-69.
- ISAKA, M.; TANTICHAOREN, M.; THEBTARANONTH, Y. Cordyanhydrides A and B. Two unique anhydrides from the insect pathogenic fungus *Cordyceps pseudomilitaris* BCC 1620. **Tetrahedron Letters**, v. 41, p. 1657-1660, 2000.
- ISSALY, N.; CHAUVEAU, H.; AGLEVOR, F. Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1425-1431, 2005.
- JAMES, T.Y.; KAUFF, F.; SCHOCH, C.L.; MATHENY, P.B.; HOFSTETTER V. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, v. 443, p. 818-822, 2006.
- JAMES, R. R.; CROFT, B. A.; SHAFFER, B. T.; LIGHTHART, B. Impact of temperature and humidity on host-pathogen interactions between *B. bassiana* and a coccinellid. **Environmental entomology**, v. 27, p. 1506- 1513, 1998.
- JANSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER, M.; VOS, P.; ZABEAU, M.; KERSTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as anew tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, v. 142, p. 1881- 1893, 1996.

- JARONSKI, S. T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. **BioControl**, v. 55, p. 159-185, 2010.
- JEGOROV, A.; SEDMERA, P.; MATHA, V.; SIMEK, P.; ZARADNIČKOVA, H.; LANDA, Z.; EYAL, J. Beauverolides L and La from *Beauveria tenella* and *Paecilomyces fumosoroseus*. **Phytochemistry**, v. 37, p. 1301-1303, 1994.
- JENKINS, N. E.; GRZYWACZ, D. Quality control of fungal and viral biocontrol agents: assurance of product performance. **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, p. 753-777, 2000.
- JENSEN, A. B.; EILENBERG, J. Genetic variation within the insect-pathogenic genus *Entomophthora*, focusing on the *E. muscae* complex, using PCR-RFLP of the ITS II and the LUS rDNA. **Mycological Research**, v. 105, p. 307-312, 2001.
- JENSEN, A. B.; GARGAS, A.; EILENBERG, J.; ROSENDAHL, S. Relationships of the insect-pathogenic order Entomophthorales (Zygomycota, Fungi) based on phylogenetic analyses of nuclear small subunit ribosomal DNA sequences (SSU rDNA). **Fungal Genetic Biology**, v. 24, p. 325-334, 1998.
- JOHNSON, D.; SUNG, G.H.; HYWELL-JONES, N. L.; LUANGSA-ARD, J. J.; BISCHOFF, J. F.; KEPLER, R. M.; SPATAFORA, J. W. Systematics and evolution of the genus *Torriubiella* (Hypocreales, Ascomycota). **Mycological Research**, v. 113, p. 279-289, 2009.
- JOUSSIER, D.; CATROUX, G. Mise au point d'un milieu de culture pour le dénombrement de *Beauveria tenella* dans le sol. **Entomophaga**, v. 21, p. 223-225, 1976.
- KAGAMIZONO, T.; NISHINO, E.; MATSUMOTO, K.; KAWASHIMA, A.; KISHIMOTO, M.; SAKAI, N.; HE, B.-M.; CHEN, Z.-X.; ADACHI, T.; MORIMOTO, S.; HANADA, K. Bassiatin, a new platelet aggregation inhibitor produced by *Beauveria bassiana* K-717. **Journal of Antibiotics**, v. 48, p. 1407-1412, 1995.
- KAO, S.-S.; TSAI, Y.-S.; YANG, P.-S.; HUNG, T.-H. Use of Random Amplified Polymorphic DNA to Characterize Entomopathogenic Fungi, *Nomuraea* spp., *Beauveria* spp., and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, from Taiwan and China. **Formosan Entomology**, v. 22, p. 125-134, 2002.
- KARTHIKEYAN, A.; SHANTHI, V.; NAGASATHYA, A. Effect of different media and pH on the growth of *Beauveria bassiana* and its parasitism on leaf eating caterpillars. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 4, p. 117-119, 2008.

- KAYA, H.K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, v. 38, p. 181-206, 1993.
- KELLER, S. Arthropod-Pathogenic Entomophthorales: Biology, Ecology, Identification. Cost Action 842. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2007, 155 p.
- KELLER, L.; BIDOCHKA, M. J. Habitat and temporal differences among soil microfungal assemblages in Ontario. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 76, p. 1798-1805, 1998.
- KELLER, S.; ZIMMERMANN, G. Mycopathogens of soil insects. In: Wilding, N., Collins, N.M., Hammond, P.M., Webber, J.F. eds. **Insect-Fungus Interactions**. Academic Press, London, p. 239-270, 1989.
- KELLER, N.; TURNER, G.; BENNETT, J. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 937-47, 2005.
- KELLER, S.; KESSLER, P.; SCHWEIZER, C. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol**, v. 48, p. 307-319, 2003.
- KESSLER, P.; ENKERLI, J.; SCHWEIZER, C.; KELLER S. Survival of *Beauveria brongniartii* in the soil after application as a biocontrol agent against the European cockchafer *Melolontha melolontha*. **Biocontrol**, v. 49, p. 563-581, 2004.
- KESSLER, P.; MATZKE, H.; KELLER, S. The effect of application time and soil factors on the occurrence of *Beauveria brongniartii* applied as a biological control agent in soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 84, p. 15-23, 2003.
- KHACHATOURIANS, G. G. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. In: Arora DK, Ajello L, Mukerji KG (Eds.) Handbook of Applied Mycology Vol. 2: Humans, animals and insects. Dekker. Nueva York, EEUU, 1991, p. 613-661.
- KHALID, A. H.; MOHAMED, A. A. A.; AHMED, Y. A., SAAD, S. E. Jin HJ. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Galleria mellonella*. **Phytoparasitica**, v. 40, p. 117-126, 2012.
- KHAN, A.; WILLIAMS, K.; MOLLOY, M. P.; NEVALAINEN, H. Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. **Protein Expression and Purification**, v. 32, p. 210-220, 2003.

- KIKUCHI, H.; MIYAGAWA, Y.; NAKAMURA, K.; SAHASHI, Y.; INATOMI, S.; OSHIMA, Y. A novel carbon skeletal trichothecane, tenuipesine A, isolated from an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes*. **Organic Letters**, v. 6, p. 4531-4533, 2004.
- KLINGEN, I.; MEADOW, R.; AANDAL, T. Mortality of *Delia floralis*, *Galleria mellonella* and *Mamestra brassicae* treated with Norwegian isolates of insect pathogenic fungi. **Journal Applied Entomology**, v. 126, p. 231-237, 2002.
- KLINGEN, I.; EILENBERG, J.; MEADOW, R. Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v. 91, p. 191-198, 2002.
- KLOWDEN, M. J. *Physiological Systems in Insects* (2 ed.). San Diego: Academic Press, 2007, 160 p.
- KODAIRA, Y. Toxic substances to insects, produced by *Aspergillus ochraceus* and *Oospora destructor*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 25, p. 261-262, 1961.
- KODAIRA, Y. Studies on the new toxic substances to insects, destruxin A and B, produced by *Oospora destructor*. Part I. Isolation and purification of destruxin A and B. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 26, p. 36-42, 1962.
- KODSUEB, R.; JEEWON, R.; VIJAYKRISHNA, D.; MCKENZIE, E.H.C.; LUMYONG, P. Systematic revision of Tubeufiaceae based on morphological and molecular data. **Fungal Diversity**, v. 21, p. 105-130, 2006.
- KOSZUL, R.; CABURET, S.; DUJON, B.; FISCHER, G. Eucaryotic genome evolution through the spontaneous duplication of large chromosomal segments. **The European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal**, v. 23, p. 234-243, 2004.
- KRASNOFF, S. B., GUPTA, S. Identification of the antibiotic phomalactone from the entomopathogenic fungus *Hirsutella thompsonii* var. *synnematos*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, p. 293-302, 1994.
- KRASNOFF, S. B., GIBSON, D. M., BELOFSKY, G. N., GLOER, K. B., GLOER, J. B. New destruxins from the entomopathogenic fungus *Aschersonia* sp. **Journal Natural Products**, v. 59, p. 485-489, 1996.
- KRETZNER, A. M.; MOLINA, R.; SPATAFORA, J. W. Microsatellite markers for the ectomycorrhizal basidiomycete *Rhizopogon vinicolor*. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1190-1191, 2000.

- KRUEGER, S. R.; ROBERTS, D. W. Soil treatment with entomopathogenic fungi for corn rootworm (*Diabrotica* spp.) larval control. **Biological Control**, Orlando, v. 9, p. 67-74, 1997.
- KWON, H. C.; BANG, E. J.; CHOI, S. U.; LEE, W. C.; CHO, S. Y.; JUNG, I. Y.; KIM, S. Y.; LEE, K. R. Cytotoxic cyclodepsipeptides of *Bombycis corpus* 101A. **Yakhak Hoechi**, v. 44, p. 115-118, 2000.
- KOUVELIS, V. N.; ZARE, R.; BRIDGE, P. D.; TYPAS, M. A. 1999. Differentiation of mitochondrial subgroups in the *Verticillium lecanii* species complex. **Letters Applied Microbiology**, v. 28, p. 263–268, 1999.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study** (5th ed.) Amsterdam: Elsevier, 2011.
- LANDA, Z.; HORNÁK, P.; CHARVÁTOVÁ, H.; OSBORNE, L. S. Distribution, Occurrence and Potential Use of Entomopathogenic Fungi in Arable Soils in Czech Republic. ISTRO-Conference, Brno, Session II, p. 195-201, 2002.
- LANZA, L. M.; MONTEIRO, A. C.; MALHEIROS, E. A. População de *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos e graus de compactação do solo. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1757- 1762, 2004.
- LARENA, I.; SALAZAR, O.; GONZALEZ, V.; JULIAN, M. C.; RUBIO, V. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 187-194, 1999.
- LECOMTE, P.; PEROS, J.-P.; BLANCARD, D.; BASTIEN, N. DELYE, C. PCR-assays that identify the grapevine dieback fungus *Eutypa lata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4475-4480, 2000.
- LECUONA, R.; CLEMENT, J.; RIBA, G.; JOULLE, C.; JUAREZ, P. Spore Germination and Hyphal Growth of *Beauveria* sp. on Insect Lipids. **Biological and Microbial Control**, v. 90, 1997.
- LI, D. P.; HOLDOM, D. G. Effect of soil matric potential on sporulation and conidial survival of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 62, p. 273-277, 1993.
- LING, J. Y.; SUN, Y. J.; ZHANG, H.; LV, P.; ZHANG, C. K. Measurement of cordycepin and adenosine in stroma of *Cordyceps* sp. by capillary zone electrophoresis (CZE). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 371-374, 2002.

- LINGG, A. J.; DONALDSON, M. D. Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 38, p. 191-200, 1981.
- LIU, B. L.; CHEN, J. W.; TZENG, Y. M. Production of cyclodepsipeptides destruxin A and B from *Metarhizium anisopliae*. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 993-999, 2000.
- LIU, Z. Y.; MILNER, R. J.; MCRAE, C. F.; LUTTON, G. G. The use of Dodine in selective media for the isolation of *Metarhizium* spp. From soil. **Journal of invertebrate Pathology**, v. 62, p. 248-251, 1993.
- LICHTWARDT, R. W.; CAFARO, M. J.; WHITE, M. M. 2001. The Trichomycetes: Fungal Associates of Arthropods. Available online: <http://www.nhm.ku.edu/~fungi/Monograph/Text/Mono.htm>.
- LOCKE, M. The Wigglesworth Lecture: Insects for studying fundamental problems in biology. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p. 495-507, 2001.
- LOZANO, M.; RODRIGUES, M.; VASQUEZ, N.; GUTIERREZ, G. Efecto de *Metarhizium anisopliae* sobre pragas rizofagas da arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) em Colombia. **Manejo integrado de plagas**, Costa Rica, v. 56, p. 58-64, 2000.
- LUANGSA-ARD, J. J.; BERKAEW, P.; RIDKAEW, R.; HYWEL-JONES, N. L.; ISAKA, M. A beauvericin hot spot in the genus *Isaria*. **Mycological Research**, v. 13, p. 1389-1395, 2009.
- LUCKING, R.; HUHDORF, S.; PFISTER, D.H.; PLATA E.R.; LUMBSCH, H.T. Fungi evolved right on track. **Mycologia**, v. 101, p. 810-822, 2009.
- LUZ, C., NETTO, M. C. B.; ROCHA, L. F. N. In vitro susceptibility to fungicides by invertebrate-pathogenic and saprobic fungi. **Mycopathologia**, v. 164, p. 39-47, 2007.
- MACEDO, D. Seleção e caracterização de *Metarhizium anisopliae* visando ao controle de Mahanarva fimbriolata (Hemiptera: Cercopidae) em cana de açúcar. Piracicaba, São Paulo, Brasil, 2005.
- MACHADO, L.A. Criação de insetos em laboratório para utilização em pesquisas de controle biológico. In: B.B. Cruz (Ed.). *Pragas das Culturas e Controle Biológico*, Campinas, Fundação Cargil, p. 8-35, 1988.
- MADELIN, M. F. Fungal parasites of insects. **Annual Review Entomology**, v. 11, p. 423-448, 1966.

- MAFLA, M.; VILLAMIL, L.; IBARRA, T. Evaluacion de la actividad biocontroladora de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeiodes* (Coleoptera_Scarabaeidae). **Revista Corpoica**, v. 5, p. 43-47, 2004.
- MAHANEY, W. C., DOHM, J. M., BAKER, V. R., NEWSOM, H. E., MALLOCH, D., HANCOCK, R. G. V., CAMPBELL, I., SHEPPARD, D., MILNER, M. W. Morphogenesis of Antarctic paleosols: Martian analogue. *Icarus*, v. 154, p. 113-130, 2001.
- MAIMALA, S.; TARTAR, A.; BOUCIAS, D.; CHANDRAPATYAB, A. Detection of the toxin Hirsutellin A from *Hirsutella thompsonii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 80, p. 112–126, 2002.
- MANICOM, B.Q.; BAR-JOSEPH, M.; ROSNER, A.; VIGODSKY-HAAS, H.; KOTZE, J.M. Potential applications of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of the fusaria. **Phytopathology**, v. 77, p. 669-672, 1987.
- MARQUES, E.K.; IKUTA, N.; LUNGE, V.R.; FONSECA, A.S.K.; Diagnóstico Molecular e Biotecnologia. In: SERAFINI, A.M.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). Biotecnologia: Avanços na agricultura e na agropecuária. Caixias do Sul: EDUCS, p. 101-130, 2002.
- MAURER, P.; COUTEAUDIER, Y.; GIRARD, P.A; BRIDGE, P. D.; RIBA, G. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. **Mycological Research**, v. 1001, p. 159-164, 1997.
- MAVRIDOU, A.; TYPAS, M. A. Intraspecific polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* revealed by analysis of rRNA gene complex and mtDNA RFLPs. **Mycological Research**, v. 102, p. 1233-1241, 1998.
- MAZET, I.; VEY, A. HIRSUTELLIN A. A toxic protein produced in vitro by *Hirsutella thompsonii*. **Microbiology**, v. 141, p. 1343-1348, 1995.
- MCCOY, C.W. Entomogenous fungi as microbial pesticide; Alternatives for suppressing agricultural pest a diseases In: Baker R. y Dunn P. ed. New directions in biological control: Alan R. Liss, Inc. p. 139 -159, 1990.
- MCCOY, C. W.; SAMSON, R. A.; BOUCIAS, D.G. Entomogenous fungi. In Handbook of Natural Pesticides, Boca, Raton, Fla: Mr ic Press. Vol. 5, Microbial Insecticides, Part A, Entomogenous Protozoa and Fungi, C. M. Ignoffo and N. B. Mandava, eds, 1988.
- MEDO, J.; CAGAN, L. Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. **Biological Control**, v. 59, p. 200-208, 2011.

- MEHTA, Y.R.; MEHTA, A.; ROSSATO, Y.B. ERIC and REP-PCR Banding Patterns and Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer of rDNA of *Stemphylium solani* Isolates from Cotton. **Current Microbiology**, v. 44, p. 323-328, 2002a.
- MEHTA, A.; MEHTA, Y.R.; ROSSATO, Y.B. ERIC and REP-PCR amplify non-repetitive fragments from the genome of *Drechslera avenae* and *Stemphylium solani*. **FEMS Microbiology Letters**, p. 51-55, 2002b.
- MERGULHÃO, A. C.; BASTOS DA SILVA, M.; CAVALCANTI, V.; CATANHO, M. Caracterização filogenética de isolados de *Beauveria bassiana* originados de diferentes insetos hospedeiros. **Pesquisa agropecuária Pernambuco**. Recife, v. 19, n. 1, p. 53-57, 2014.
- MEYLING N.; EILENBERG J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. **Biological Control**, v. 43, p. 45-155, 2007.
- MEYLING, N.; EILENBERG, J. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 113, p. 336-341, 2006.
- MEYLING, N.V.; THORUP-KRISTENSEN, K.; EILENBERG, J. Below- and aboveground abundance and distribution of fungal entomopathogens in experimental conventional and organic cropping systems. **Biological Control**, v.59, p.180–186, 2011.
- MICHEREFF, M.; FILHO, M.; FARIA, S.P.; WRAIGHT, K.F.; SILVA A. Micoínseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas?. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 769-779, 2009.
- MIETKIEWSKI, R.; ZUREK, M.; TKACZUK, C.; BALAZY, S. Occurrence of entomopathogenic fungi in arable soil, forest soil and litter. **Roczniki Nauk Rolniczych Seria E**, v. 21, p. 61-68, 1991.
- MILANES, I., GONZALEZ, O.; OLIVA, E. 1998. Variabilidad isoenzimática en clones de boniato (*Ipomoea batatas* (L). Lam) regeneradas a partir de callos. Univ. de Granma, Granma, Cuba. III Encuentro latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO 98.
- MOCHIZUKI, K.; OHMORI, K.; TAMURA, H.; SHIZURI, Y.; NISHIYAMA, S.; MIYOSHI, W.; YAMAMURA, S. The structures of bioactive cyclodepsipeptides, beauveriolides I and II, metabolites of entomopathogenic fungi *Beauveria* sp. **Bulletin of Chemical Society of Japan**, v. 66, p. 3041-3046, 1993.

- MOLLIER, P., LAGNEL, J.; FOURNET, B.; AÏOUN, A.; RIBA, G. A. Glycoprotein highly toxic for *Galleria mellonella* larvae secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria sulfurescens*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, p. 200-207, 1994.
- MONOD, M.; CAPOCCIA, S.; LE \bar{C} CHENNE, B.; ZAUGG C.; HOLDOM M.; JOUSSON O. Secreted proteases from pathogenic fungi. **Internacional Journal of Medical Microbiology**, v. 292, p. 405-419, 2002.
- MONZÓN, A. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos em Nicaragua. Avances en el fomento de productos fitosanitarios no-sintéticos. **Manejo Integrado de Plagas**, v. 63, p. 95-103, 2001.
- MOORE, D.; CAUDWELL, R.W. Formulation of entomopathogens for the control of grasshoppers and locusts. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v. 171, p. 49-67, 1997.
- MONTESINOS, M. R.; VINIEGRA GONZALEZ, G.; ALATORRE ROSAS, R.; LOERA, O. Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-D-glucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 2095-2102, 2011.
- MOZES-KOCH, R.; EDELBAUM, O.; LINERH, A.; STEJNBERG, A.; UZIEL, A.; GERSON, U.; SELA, I. Identification of *Hirsutella* species isolates within a species and intraespecific heterokaryons by Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD). **Journal of Plant Disease Protection**, v. 102, p. 284-290, 1995.
- MURAD, A. M.; LAUMANN, R. A.; LIMA, T. DE A.; SARMENTO, R. B.; NORONHA, E. F.; ROCHA, T. L.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FRANCO, O. L. Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculates*) exoskeleton. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.142, p. 365-370, 2006.
- MURO, M., LUCHI, M. R. Preservação de microrganismos. Fundação tropical de pesquisas e Tecnologia “Andre Tosello”. Campinas, 1989, 92 p.
- MURO, M.; ELLIOTT, S.; MOORE, D.; PARKER, B.; SKINNER, M.; REID, W.; BOUHSSINI, M. Molecular characterisation of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of Sunn Pests (*Eurygaster* and *Aelia* species). **Mycological Research**, v. 109, p. 294–306, 2005.
- NATVIG, D.O.; JACKSON, D.A.; TAYLOR, J.W. Random fragment hybridization analysis of evolution in the genus *Neurospora* the status of four-spored strains. **Evolution**, v. 41, p. 1003-1021, 1987.

- NEUPANE, B. P. Evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on honeybee (*Apis mellifera* L.) and its pest greater wax moth (*Galleria mellonella* L.) [tesis maestria]. Chitwan, Nepal: Tribhuvan University; 2005.
- NEVES, P. M. J. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae). 1998, 113p. Tese de doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba.
- NORONHA, E. F.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; ULHOA, C. J. Regulation of 36-kDa beta-1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*, **FEMS Microbiology Letters**, v. 188, p. 19-22, 2000.
- NGOKA, L. C. M.; GROSS, M. L.; TOOGOOD, P. L. Sodium-directed selective cleavage of lactones: a method for structure determination of cyclodepsipeptides. **International Journal of Mass Spectrometry**, 182/183, p. 289-298, 1999.
- OLIVEIRA, J. B. de. Pedologia aplicada. Jaboticabal: FUNEP, 2001. p. 414.
- OMOTO, C.; MCCOY, C. W. Toxicity of purified fungal toxin hirsutellin A to the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora* (Ash.). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 319-322, 1998.
- ORESTE, M.; BUBICI, G.; TARASCO, E. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Bals.- Criv.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (metschn.) sorokin against *Galleria mellonella* L. and *Tenebrio molitor* L. in laboratory assays. **Journal of zoology**, v. XCV, p. 43-48, 2012.
- ORMOND, E.L.; THOMAS, A.P.M.; PUGH, P.J.A.; PELL, J.K.; ROY, H.E. A fungal pathogen in time and space. The population dynamics of *Beauveria bassiana* in a conifer forest. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 74, p. 146-154, 2010.
- OUELLET, T.; SEIFERT, K. A. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. **Phitopathology**, v. 83, n. 9, p. 1003-1007, 1993.
- PADMAVATHI, J.; Devi, K. U.; Rao, C. U. M. The optimum and tolerance pH range is correlated to colonial morphology in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, a potential biopesticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 19, p. 469-477, 2003.

- PAL, S.; ST LEGER, R.J.; WU, L.P. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*, **Journal Biology Chemical**, v. 282, p. 8969-8977, 2007.
- PANSU, M.; GAUTHEYROU, J. Handbook of Soil Analysis, Mineralogical, Organic and Inorganic Methods. Springer Berlin Heidelberg New York, 2006.
- PANTOU, M. P.; MAVRIDOU, A.; TYPAS, M. A. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. **Fungal Genetic Biology**, v. 38, p. 159-174, 2003.
- PAPIEROK, B.; HAJEK, A. E. Fungi: Entomophthorales. In L. A. Lacey (Ed.), Manual of Techniques in Insect Pathology, London: Academic Press, 1997, p. 187-212.
- PAVA-RIPOLL, M.; ANGELINI, C.; FANG, W.; WANG, S.; POSADA, F. J.; ST. LEGER, R. The rhizosphere-competent entomopathogen *Metarhizium anisopliae* expresses a specific subset of genes in plant root exudate. **Microbiology**, v. 157, p. 47-55, 2011.
- PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Koppen-Geiger climate classification. Hydrol. **Earth Systems Science**, v. 11, p. 1633–1644, 2007.
- PEREZ, V.; GUZMAN, A.; ALATORRE, R.; HERNANDEZ, J.; HERNANDEZ, A.; CARRILLO, M.; BAVERSTOCK, J. Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 119, p. 54-61, 2014.
- PETEIRA, B.; LEON, O.; DIAZ, M. Marcadores moleculares. Referncia especial a isoenzimas, RFLP y MAAP. Rev. **Proteccion Vegetal**, v. 12, n. 3, p. 137-144, 1997.
- POEAIM, S.; HANGTRAKUL, S.; SOYTONG, K. Genetic diversity of *Beauveria* sp. isolated in Thailand. **Journal of Agricultural Technology**, v. 10, p. 607-616, 2014.
- POINAR, G.O.; THOMAS, G. M. Fossil entomogenous fungus from Dominican amber. **Experientia**, v. 40, p. 578-579, 1984.
- PORFIRIO, B.; CHIARELLI, I.; VERNESI, C.; LINEO, L. The development of multiple arbitrary amplicon profiling (MAAP) techniques. Human Evolution, v. 10, p. 69-80, 1995.

- PUCHETA DIAZ, M.; FLORES MACIAS, A.; RODRIGUEZ NAVARRO, S.; DE LA TORRE, M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. **Incial**, v. 31, p. 856-860, 2006.
- QUESADA-MORAGA, E.; CARRASCO, A.; ALVAREZ, S. Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Applied and Entomology**, v. 130, p. 442-452, 2006.
- QUESADA-MORAGA, E.; NAVAS-CORTE´S, J. A.; MARANHAO, E. A. A.; ORTIZ-URQUIZA, A.; SANTIAGO-ALVAREZ, C. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. **Mycological Research**, v. 111, p. 947-966, 2007.
- QUESADA-MORAGA, E.; VEY, A. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, v. 108, p. 441-452, 2004.
- QUINTANA, D. *Beauveria* spp. nativas para control de *Rhyacionia buoliana* Denis & Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae). 2000. 30 p. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Chillán, Chile.
- RAKOTONIRAINY, M. S.; CARIOU, M. L.; BRYGOO, Y.; RIBA, G. Phylogenetic relationships within the genus *Metarhizium* based on 28S rDNA sequences and isoenzyme comparison. **Mycological Research**, v. 98, p. 225-230, 1994.
- RAMOS, E.; ALVES, S.; MANZINI, M.; LOPEZ, R. Susceptibilidad de *Bemisia tabaci* a *Beauveria bassiana* em condiciones de laboratório. **Manejo integrado de plagas**, Costa Rica, v. 56, p. 65-69, 2000.
- RANGEL, D. E. N., DETTENMAIER, S. J., FERNANDES, É. K. K., ROBERTS, D. W. Susceptibility of *Metarhizium* spp. and other Entomopathogenic fungi to dodine- based selective media. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, p. 375-389, 2010.
- RATH, A. C., KOEN, T. B. & YIP, H. Y. The influence of abiotic factors on the distribution and abundance of *Metarhizium anisopliae* in Tasmanian pasture soils. **Mycological Research**, v. 96, p. 378-384, 1992.
- RAYMOND, J.; ST LEGER, J.; COOPER, M.; CHARNLEY, A. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes, **Journal Genetic Microbiology**, v. 132, p. 1509-1517, 1986.

- REHNER, A., MINNIS, A., SUNG, G. LUANGSA-ARD, J., DEVOTTO, L. HUMBER, A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v. 103, p. 1055–1073, 2011.
- RHODES, D. J.; SMITH, J. D.: «Techniques for Quantifying the Ecological and Pathological Characteristics of Entomopathogenic Fungal Strains». Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference Pests and Diseases, p. 351-356, 1992.
- RIBA, G.; BOUVIER-FOURCADE.; CAUDAL, A. Isoenzymes polymorphism in *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) entomogenous fungi. **Mycopathologia**, v. 96, p. 161-169, 1986.
- RIBA, G.; Bouvier-fourcade, i.; caudal, a. Isoenzymes polymorphism in *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) entomogenous fungi. **Mycopathologia**, v. 96, p. 161-169, 1986.
- RIBA, G.; SOARES, G.G JR.; SAMSON, R.A.; ONILLON CAUDAL, A. 1986. Isoenzyme analysis of isolates of the entomogenous fungi *Tolypocladium cylindrosporum* and *Tolypocladium extingues* (Deuteromycotina; Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 48, p. 362-367, 1986.
- RISTAINO, J.B.; MADRITCH, M.; TROUT, C.L.; PARRA, G. PCR amplification of ribosomal DNA species identification in the plant pathogen genus Phytophthora. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, n.3, p. 948-954, 1998.
- RIVERA, A.; BUSTILLO, A.E.; BRIDGE, P.D. Caracterización bioquímica y molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana* procedentes de la broca del café, *Hypothenemus hampei*. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 23, p. 51-57, 1997.
- ROCHA, L. F. N.; INGLIS, P. W.; HUMBER, R. A. KIPNIS, A.; LUZ, C. Occurrence of *Metarhizium* spp. in Central Brazilian soils. **Journal Basic Microbiology**, v. 53, p. 251-259, 2013.
- RODDAM, L. F., RATH, A. C. Isolation and characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* from subantarctic Macquarie Island. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 69, p. 285-288, 1997.
- RODRÍGUEZ, M.; GERDING, M.; FRANCE, A.; CEBALLOS, R. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* Qu-M845 isolate to control *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in laboratory and field trials. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 69, p. 541-547, 2009.

- RODRÍGUEZ, M.; ARENCIBIA, A. Principales tipos de marcadores del polimorfismo de los ácidos nucleicos. Técnicas analíticas. En « Marcadores moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas» (ed. Cornide. M. T.) Editorial Felix Varela. p. 11-30, 2003.
- ROSSMAN, A. Y. *Podonectria*, a genus in the Pleosporales on scale insects. **Mycotaxon**, v. 7, p. 163-182, 1978.
- ROSENDAHL, S.; TAYLOR, J. W. Development of multiple genetic markers for the studie of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 821-829, 1997.
- ROY, H. E.; STEINKRAUS, D.; EILENBERG, J.; HAJEK, A. E.; PELL, J. K. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. **Annual Review Entomology**, v. 51, p. 331-357, 2006.
- RUIZ-SANCHEZ, E.; ORCHARD, I.; LANGE, A. B. Effects of the cyclopeptide mycotoxin destruxin A on the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus* (Stål). **Toxicon**, v. 55, p. 1162-1170, 2010.
- SAFAVI, S. Isolation, identification and pathogenicity assessment of a new isolate of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* in Iran. Journal of plant protection research, v. 50, 158-163, 2010.
- SAKSIRIRAT, W.; HOPPE, H.H. Secretion of Extracellular Enzymes by *Verticillium psalliotae* Treschow and *Verticillium lecanii* (Zeium) viegas during growth on uredospores of the Soybean Rust Fungus (*Phakopsora pachirhizi* syb.) in liquid cultures. **Nematropica**, v. 131, p. 161-173, 1991.
- SAMSON, R. A.; EVANS, H. C.; LATGÉ, J. P. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1988.
- SAMUELS, R. I., REYNOLDS, S. E., CHARNLEY, A. K. Calcium channel activation of insect muscle by destruxins, insecticidal compounds produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 90, p. 403-412, 1988a.
- SAMUELS, R. I.; CHARNLEY, A. K.; REYNOLDS, S. E. The role of destruxins in the pathogenicity of 3 strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Mycopathologia**, v. 104, p. 51-58, 1988b.
- SAVELKOUL, P. H. M., AARTS, H. J. M.; HAAS, J.; DIJKSHOORN, L.; DUIM., B.; OTSEN, M.; RADEMARKER, J. L. W.; SCHOOLS, L.; LENSTRA, J. A. Amplified-

fragment length polymorphism analysis: the State of an Art. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3083-3091, 1999.

SCHABEL, H. G. Green muscardine disease of *Hylobius pales* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae). **Entomology**, v. 81, p. 413-421, 1976.

SCHEEPMAKERA, J. W. A.; BUTT, T. M. Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and in accordance with EU regulations. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, 503-552, 2010.

SCHILLING, A. G.; MOLLER, E. M.; GEIGER, H. H. Polymerase chain reaction based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. **Phytopathology**, v. 86, p. 515-522, 1996.

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

SCHOLTE, E. J.; KNOLS, B.G.J.; SAMSON, R. A.; TAKKEN, W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. **Journal of Insect Science**, v. 4, p. 19-24, 2004.

SCHOCH, C. L.; SUNG, G.-H.; LOPEZ-GIRA'LDEZ, F. The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. **Systems Biology**, v. 58, p. 224-239, 2009.

SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 413-423, 2003.

SHIMAZU, M.; SATO, H.; MAEHARA, N. Density of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in forest aie and soil. **Applied Entomology and Zoology**. v. 37, p. 19-26, 2002b.

SHIMAZU, M.; SATO, H. Media for selective isolation of an entomogenous fungus, *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Applied Entomology and Zoology**. v. 31, p. 291- 298, 1996.

SHIMIZU, S.; TSUCHITANI, Y.; MATSUMOTO, T. Production of an extracellular protease by *B. bassiana* in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx Mori*. **Letters in Applied Microbiology**, v.16, p.291-294, 1993.

- SHIMIZU, S.; HIGASHIYAMA, R.; MATSUMOTO, T. Chromosome length polymorphisms in *Beauveria bassiana*. **Journal Seric Science Japan**, v. 62, p. 45–49, 1993b.
- SHIMIZU, S.; TSUMICHITANI, Y.; MATSUMOTO, T. Electrophoretic kariotype of *M. anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 60, p. 185-186, 1992.
- SHIMIZU, S.; TSUMICHITANI, Y.; MATSUMOTO, T. Electrophoretic kariotyping of the entomogenous fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Letters Applied Microbiology**, v. 16, p. 183-186, 1993a.
- SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Review**, v. 22, p. 36-42, 2008.
- SPATAFORA, J. W., SUNG, G.-H., SUNG, J.-M., HYWEL-JONES, N., WHITE, J. F., JR. Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1701-1711, 2007.
- SOSA-GOMEZ, D.R.; LASTRA, C.C.L; HUMBER, R.A. An overview of arthropod-associated fungi from Argentina and Brazil. **Mycopathologia**, v. 170, p. 61-76, 2010.
- SOSA-GOMEZ, D.R.; TIGANO, M. S.; ARANTES, O. M. N. Caracterização de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. 2. Ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, p. 731-764.
- SRIVASTARA N., MAURYA P., SHARMA P., MOHAN L. 2009, Prospective role of insecticides of fungal origin: Review, **Entomology Research**, v. 39, p. 341-355, 2009.
- STEENBERG, T. Natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with focus on infectivity to Sitona species and other insects in lucerne. Ph.D. thesis. Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark, 1995.
- STENZEL, K. Natural occurrence and population density of *Metarhizium anisopliae* in cultivated and non-cultivated soil in North-Rhine-Westfalia, FRG. In: Abstracts of the XXV Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology, Heidelberg, Germany 16-21 August, 1992, 251 p.
- STEINHAUS, E. A. Enfermedades microbianas de los Insectos. In: DEBACH, P. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas, México, DF: Continental, 1968, p. 380-416.

- STEINWENDER, B.M.; ENKERLI, J.; WIDMER, F.; EILENBERG, J.; MEYLING, N.V. Molecular diversity of the *Metarhizium anisopliae* lineage in an agricultural field. **IOBC/WPRS Bulletin**, v. 66, p. 113-115, 2011.
- STERN, M.J.; AMES, G.F.; SMITH, N.H.; ROBINSON, E.C.; HIGGINS, C.F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell** **37**, p. 1015-1026, 1984.
- ST. LEGER, R. J. Notification of intent to release a transgenic strain of *Metarhizium anisopliae* (document submitted to FIRA) www.epa.gov/pesticides/biopesticides/otherdocs/release_notification.htm.
- ST. LEGER, R. J. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. **Journal of invertebrate Pathology**, v. 98, p. 271-276, 2008.
- ST. LEGER, R. J.; WANG, C. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve efficacy against insect pests. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 901-907, 2010.
- ST. LEGER, R.J.; ALLEE, L.L.; MAY, B.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria bassiana* spp. **Mycological Research**, v. 96, p. 1007-1015, 1992.
- ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.; ROBERTS, D. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the EEUU**, v. 93, p. 6349-6354, 1996.
- ST. LEGER, R. J. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects, **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 1119-1125, 1995.
- ST. LEGER, R. J.; COOPER R. M.; CHARNLEY, A. K. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. **Journal Genetic Microbiology**, v. 132, p. 1509-1517, 1986.
- STOREY, G. K.; MCCOY, C. W.; STENZEL, K.; ANDERSCH, W. Conidiation kinetics of the mycelial granules of *Metarhizium anisopliae* (BIO 1020) and its biological activity against different soil insects. Proc. and abstracts of Vth Intern. **Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control**, p.320–325, 1990.
- STOREY, G. K.; VANDER, R. K.; BOUCIAS D. G.; MCCOY, C. W. Effect of fire ant (*Solenopsis invicta*) venom alkaloids on the in vitro germination and development of selected entomogenous fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 88–95, 1991.

- STOREY, G. K.; GARDNER, W. A. Vertical movement of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia through four Georgia soil types. **Environmental Entomology**, v. 16, p. 178-181, 1987.
- STUDDERT, J. P.; KAYA, H. K. Water potential, temperature, and clay-coating of *Beauveria bassiana* conidia: Effect on Spodoptera exigua pupal mortality in two soil types. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 56, n.3, p. 327-336, 1990.
- STUDDERT, J. P.; KAYA, H. K.; DUNIWAY, J. M. Effect of water potential, temperature, and clay-coating on survival of *Beauveria bassiana* conidia in a loam and peat soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 55, p. 417-427, 1990.
- SOWJANYA, K.; PADMAJA, V. Oxidative stress induced by destruxin from *Metarhizium anisopliae* (Metch) involves changes in glutathione and ascorbate metabolism and instigates ultrastructural changes in the salivary glands of Spodoptera litura (Fab.) larvae. **Toxicon**, v. 51, p. 1140-1150, 2008.
- SUGIMOTO, M., KOIKE, M.; NAGAO, H. Ribotyping of entomopathogenic *Verticillium lecanii* in Japan. **Phytoparasitica**, v. 29, p. 413– 420, 2001.
- SUGIMOTO, M.; KOIKE, M.; HIYAMA, N.; NAGAO, H. Genetic, morphological, and virulence characterization of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, p. 176-187, 2003.
- SUH, S.-O.; NODA, H.; BLACKWELL, M. Insect symbiosis: derivation of yeast-like endosymbionts within an entomopathogenic lineage. **Molecular and Biological Evolution**, v. 18, p. 995-1000, 2001.
- SUN, B.; LIU, X. Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. **Applied Soil Ecology**. v. 39, p. 100-108, 2008.
- SUN, B.; HAN-YING, Y.; AMANDA, J.; LIU, X. Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards. **Crop Protection**. v. 27, p. 1421-1426, 2008.
- SUNG G.H, POINAR G.O, SPATAFORA J.W. The oldest fossil evidence of animal parasitism by fungi supports a Cretaceous diversification of fungal-arthropod symbioses. **Molecular and Phylogenetic Evolution**, v. 49, p. 495-502, 2008.
- SUNG, G.-H.; HYWEL-JONES, N. L.; SUNG, J.-M.; LUANGSA-ARD, J. J.; SRESTHA, B.; SPATAFORA, J. W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**, v. 7, p. 55-59, 2007.

- SUZUKI, A.; KANAOKA, M.; ISOGAI, A.; MURAKOSHI, S.; ICHINOE, M.; TAMURA, S. Bassionalide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. **Tetrahedron Letters**, v. 25, p. 2167-2170, 1977.
- SWEENEY, A. W. An undescribed species of Smittium (Trichomycetes) pathogenic to mosquito larvae in Australia. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 77, p. 55-60, 1981.
- TAKAHASHI, S.; KARINUMA, N.; UCHIDA, K.; HASHIMOTO, R.; YANAGISAWA, T.; NAKAGAWA, A. Pyridovericin and pyridomacrolidin: novel metabolites from entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*. **Journal of Antibiotics**, v. 51, p. 596-598, 1998.
- TANADA, Y., KAYA, H. K. Insect Pathology. San Diego: Academic Press, 1993.
- TANZINI, M.; ALVES, S.; SETTEN, A.; AUGUSTO N. Compatibilidad de agentes tensoactivos com *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. **Manejo Integrado de Plagas**, v. 59, p. 15-18, 2001.
- TARTAR, A.; BOUCIAS, D. G. A pilot-scale expressed sequence tag analysis of *Beauveria bassiana* gene expression reveals a tripeptidyl peptidase that is differentially expressed in vivo. **Mycopathologia**, v. 158, p. 201-209, 2004.
- TÉLLEZ-JURADO, A.; CRUZ, R. M. G.; FLORES, M. Y.; ASAFF, T. A.; ARANA CUENCA, A. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. **Revista Mexicana de Micología**, v. 30, p. 73-80, 2009.
- TEVINI, M. Molecular biological effects of ultraviolet radiation. In: M. Tevini (Ed.), UV-B Radiation and Ozone Depletion: Effects on Humans, Animals, Plants, Microorganisms, and Materials. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993, p.1-15.
- TIAGO, P.V.; FUNGARO, M.H.P.; FURLANETO, M.C. Cuticle-degrading proteases from the entomopathogen *Metarhizium flavoviride* and their distribution in secreted and intracellular fractions. **Letters Applied Microbiology**, v. 34, p. 91-94, 2002.
- TIGANO, M.S.; RIBA, G. Estudio de sistemas isoenzimáticos polimórficos para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.An. **Sociedade Entomologica Brasil**, v. 19, p. 487-491, 1990.
- TIGANO-MILANI, M.; HONEYCUTT, R. J.; LACEY, L. A.; ASSIS, R.; MCCLELLAND, M.; SOBRAL, B. W. S. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 65, p. 274-282, 1995.

- TINSLEY, M. C.; BLANFORD, S.; JIGGINS, F. M. Genetic variation in *Drosophila melanogaster* pathogen susceptibility. **Parasitology**, v. 132, p. 767-773, 2006.
- TKACZUK, C., MIETKIEWSKI, R. Occurrence of entomopathogenic fungi in different kinds of soil. *Rocz. Nauk Roln. Ser. A* 25, p. 41-46, 1996.
- TKACZUK, C.; MIETKIEWSKI, R.; BAŁAZY, S. Temperature as a selective factor for isolation of entomopathogenic fungi from soil by means of the insect bait method. **IOBC/WPRS Bulletin**, v. 23, p. 197-202, 2000.
- TORRES DE LA CRUZ, M.; CORTEZ MADRIGAL, H.; ORTIZ GARCÍA, C. F.; CAPPELLO GARCÍA, S.; PÉREZ DE LA CRUZ, M. Monosporic strains of *Metarhizium anisopliae* and its pathogenicity to *Galleria mellonella* in Tabasco, Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, v. 5, p. 171-180, 2014.
- TOSI, S.; CARETTA, G.; HUMBER, R. A. *Conidiobolus antarcticus*, a new species from continental Antarctica. **Mycotaxon**, v. 90, p. 343-347, 2004.
- TRALAMAZZA, S. M. Validação da técnica de espectroscopia no infravermelho na taxonomia e sistemática do gênero *Aspergillus*. 2011. 87 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transactions of the British Mycological society**, v. 66, p. 407-411, 1976.
- TYPAS, M. A.; MAVRIDOU, A.; KOUVELIS, V. N. Mitochondrial DNA differences provide maximum intraspecific polymorphism in the entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae*, and allow isolate detection/identification. En: Bridge, P., Couteaudier, Y., Clarkson, J. (Eds.), *Molecular Variability of Fungal Pathogens*. CAB int, Wallingford, UK, p. 227-237, 1998.
- VAN DER PUTTEN, W. H., VET, L. E. M., HARVEY, J. A., WICKERS, F. L. Linking above- and belowground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens, and their antagonists. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, p. 547-554, 2001.
- VAN DER LEE, T.; WITTE, I.; DRENTH, A.; ALFONSO, C.; GOVERS F. AFLP linkage map of the oomycete *Phytophthora infestans*. **Fungal Genetic Biology**. v. 21, p. 278-291, 1997.
- VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E.; SIMOONS-SMITH, A. M.; SVELKOU, P. H. M. DNA fingerprinting of *Candida* spp. By AFLP, abstr. C- 238, p.162. In Abstracts of

the 97th General Meeting of the American Society of Microbiology. 1997. **American Society for Microbiology**, Washington, D. C.

VANNINEN, I. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in soil. **J. Applied Entomology**, v. 2, p. 213–215, 1996.

VANNINEN I. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. **Mycological Research**, v. 100, p. 93-101, 1995.

VANNINEN, I.; HUSBERG, G. B.; HOKKANEN, H. M. T. Occurrence of entomopathogenic fungi and entomoparasitic nematodes in cultivated soils in Finland. **Entomological Review**, v. 53, p. 65–71, 1989.

VANNINEN, I.; TYNI-JUSLIN, J.; HOKKANEN, H. Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Finnish agricultural soils. **Biocontrol**, v. 45, p. 201-222, 2000.

VALLE, M.; SOLIS, M.; MORALES, J.; JOHANSEN, R. Efectividad biologica de productos no convencionales contra trips em el cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill. CV. Hass) em nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacan, Mexico. In: consejo superior de investigaciones cientificas. Malaga, Espana. V congreso mundial del aguacate. Granada, Malaga, Espana, 2003, p.735-740.

VEEN, K. H. Recherches sur la maladie, due a` *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pe`lerin. Mededel. **Landbouwhogeschool Wageningen**, v. 68, p. 1-77, 1968.

VEEN, K. H.; FERRON, P. A. selective medium for the isolation of *Beauveria tenella* and of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 8, p. 268-269, 1966.

VEGA, F. E.; DOWD, P. F. The role of yeasts as insect endosymbionts. In F. E. Vega & M. Blackwell (Eds.), *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*, New York: Oxford University Press, 2005, p. 211-243.

VEGA, F. E.; MEYLING, N.; LUANGSA-ARD, J.; BLACKWELL, M. Fungal Entomopathogens. **Insect Pathology**, p.171-220, 2012.

VEGA, F. E.; POSADA, F.; AIME, M. C.; PAVA-RIPOLL, M.; INFANTE, F.; REHNER, S. A. Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control**, v. 46, p. 72-82, 2008.

VEY, A.; HOAGLAND, R. E.; BUTT, T. M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents”, en Butt M. *et al.* (eds.), *Fungi as biocontrol agents progress, problems and potential*, CABI Publishing, Wallingford, Reino Unido, 2001, p. 311-346.

- VEY, A.; MATHA, V.; DUMAS, C. Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction, **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 80, p. 177-187, 2002.
- VIAUD, M.; COUTEAUDIER, Y.; LEVIS, C.; RIBA, G. 1996. Genome organization in *Beauveria bassiana*: Electrophoretic karyotype, gene mapping, and telomeric fingerprint. **Fungal Genetic Biology**, v. 20, p. 175-183, 1996.
- VIDAL, C.; FARGUES, J.; LACEY, L. A. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: effect of temperature on vegetative growth. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 70, p. 18-26, 1997.
- VINCENT, F.; WEGST, G. 2004. Design and mechanical properties of insect cuticle. **Arthropod Structure**, v. 33, p. 187-199, 2004.
- VINING, L. C.; KELLEHER, W. J.; SCHWARTING, A. E. Oosporein production by a strain of *Beauveria bassiana* originally identified as *Amanita muscaria*. **Canadian Journal Microbiology**, v. 8, p. 931-933, 1962.
- VINSON, S. B. Suppression of the insect immune system by parasitic Hymenoptera. In: Pathak, J.P.N. (Ed.), *Insect Immunity*. Dordrecht, Boston and London: Kluwer Academic Publishers, 1991, p. 171-187.
- VLADIMIR, E. T.; LUIS, V.; LOPEZ-LLORCA, J.; JANSSON, H. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. **Fungal Genetic Biology**, v. 35, p. 67-78, 2002.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.
- WAGENAAR, M. W.; GIBSON, D. M.; CLARDY, J. Akanthomycin, a new antibiotic pyridone from the entomopathogenic fungus *Akanthomyces gracilis*. **Organic Letters**, v. 4, p. 671-673, 2002.
- WALSTAD, J. D., ANDERSON, R. F., STAMBAUGH, W. J. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.16, p.221–226, 1970.
- WANG, H. Destruxin production of *Metarhizium anisopliae* under carbon and nitrogen exhaustion". **Journal Basic Microbiology**, v. 49, p. 404-411, 2009.

- WAT, C.-H.; MCINNES, A. G.; SMITH, D. G.; WRIGHT, J. L. C.; VINING, L. C. The yellow pigments of *Beauveria* species. Structures of tenellin and bassianin. **Canadian Journal Chemical**, v. 55, p. 4090-4098, 1977.
- WEI-ZHEN, L.; D.G. BOUCIAS, C.W. MCCOY. Extraction and characterization of the insecticidal toxin Hirsutellin A produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii*. **Experimental Mycology**, v. 19, p. 254-262, 1995.
- WEIR, A.; BLACKWELL, M. Fungal biotrophic parasites of insects and other arthropods. In F. E. Vega & M. Blackwell (Eds.), *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*, New York: Oxford University Press, 2005, p. 119-145.
- WESSELS, J.G.H. Fungi in their own right. **Fungal Genetic Biology**, v.27, p.134-145, 1999.
- WILLIS, J. H.; ICONOMIDOU, V. A.; SMITH, R. F.; HAMODRAKAS, S. J. Cuticular proteins. In L. I. Gilbert, K. Iatrou & S. S. Gill (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Oxford: Elsevier, 2005, p. 79-109.
- WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WHITE, M.M.; JAMES, T.Y.; O'DONNELL, K.; CAFARO, M.J.; TANABE, Y.; SUGIYAMA, J. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. **Mycologia**, v. 98, p. 872-84, 2006.
- WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. 1988. *Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: A handbook of Biology and Techniques*. Arkansas Agricultural experiment station, Fayetteville, Arkansas.
- XU, Y.; OROZCO, R.; WIJERATNE, E. M. K.; ESPINOSA-ARTILES, P.; GUNATILAKA, A. A. L.; STOCK, S. P.; MOLNAR, I. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide bassianolide, an insecticidal virulence factor of *Beauveria bassiana*. **Fungal Genetic Biology**, v. 46, p. 353-364, 2009.
- YIP, H. Y.; RATH, A. C.; KOEN, T. B. Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolated from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabaeidae: *Adoryphorus couloni*). **Mycological Research**, v. 96, p. 92-96, 1992.
- ZACHARUK, R. Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). III. Penetration of the host integument. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 15, p. 372-396, 1970.

- ZABEAU, M.; VOS, P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. Publication 0 534 858 A1, bulletin 93/13. European Patent Office, Munich, Germany.
- ZAMBRANO, K. B.; DÁVILA, M.; CASTILLO; M. A. Detección de fragmentos de ADN de hongos y su posible relación con la síntesis de proteínas de actividad entomopatógena. **Faculty of Agronomy Journal**, v. 19, p. 185-193, 2002.
- ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinose* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Science Technology**, v. 18, p. 865-901, 2008.
- ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 553–596, 2007.
- ZIMMERMANN, G. Weitere versuche mit *Metarhizium anisopliae* (Fungi imperfecti, Moniliales) zur Bekämpfung des Gefurchten Dickmaulrusslers. *Otiorhynchus sulcatus* F., an Topfplanzen im Gewachshaus. Nachrichtenbl. Dtsch. **Pflanzenschutzdienst**, v. 36, p. 55-59, 1984.
- ZIMMERMANN G. The ‘*Galleria* bait method’ for detection of entomopathogenic fungi in soil. **Journal Applied Entomology**, v. 102, p. 213–215, 1986.
- ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. **Pesticide Science Great Britain**, v. 37, p. 375-379, 1993.

ANEXOS

ANEXO A

| Batata Dextrose Ágar + Tegumento de Inseto (<i>Tenebrio molitor</i>): | |
|---|---------------|
| Dextrose | 20 g |
| Ágar | 20 g |
| Cloranfenicol | 0,05 g |
| Tegumento de <i>T. molitor</i> | 5 g |
| Água destilada | 1000 mL, pH 7 |
| OBS: Os insetos foram desinfetados com hipoclorito de sódio a 1%, foram maceradas em uma solução tampão fosfato pH 7,0 e esterilizado em autoclave a 120 °C durante 20 minutos. | |
| Meio Martin | |
| Glicose | 10 g |
| Peptona | 5 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,5 g |
| Rose de Bengal | 30 mg |
| Ágar | 20 g |
| Cloranfenicol | 100 mg |
| Água destilada | 1000 mL |

ANEXO B

Extrato de Malte Agar (MEA) (KLICH & PITT, 1988):

| | |
|------------------------|---------------|
| Extrato de Malte | 20 g |
| Peptona Bacteriologica | 1 g |
| Glicose | 20 g |
| Ágar | 20 g |
| Água destilada | 1000 mL, pH 7 |

Ágar Arroz (CHAGAS et al., 2010):

| | |
|---|---------------|
| Extrato de Arroz parboilizado Triturado | 15 g |
| Ágar | 20 g |
| Peptona | 20 g |
| Água destilada | 1000 mL, pH 7 |

Batata Dextrose Ágar (BDA) (GATTI et al., 2003):

| | |
|----------------|---------------|
| Dextrose | 20 g |
| NaCl | 60 g |
| Cloranfenicol | 0,05 g |
| Ágar | 15 g |
| Água destilada | 1000 mL, pH 7 |

OBS: Adicionar 200 g de batata picada em 1L de água destilada, deixar por 1h na fervura em seguida filtrar e adicionar ao filtrado os outros ingredientes.

Ágar Água (AA) (GONZALEZ et al., 2001):

| | |
|----------------|---------------|
| Ágar | 20 g |
| Água destilada | 1000 mL, pH 7 |

ANEXO C

Dieta de larvas (*Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor*)

***Galleria mellonella* (Machado, 1988):**

| | |
|-----------------------|--------|
| Cera de abelha | 472 g |
| Leite em pó desnatado | 96 g |
| Levedura de cerveja | 188 g |
| Fubá de milho | 385 g |
| Soja | 160 g |
| Glicerina | 416 g |
| Água destilada | 300 mL |

Preparo da dieta

- a) A soja será cozida por 30 a 45 minutos, após o que será batida em liquidificador usando a própria água do cozimento.
- b) Os ingredientes secos serão misturados de forma bem homogênea.
- c) Em uma panela será derretida a cera de abelha.
- d) A glicerina, soja do liquidificador e os ingredientes secos, devidamente misturados, serão adicionados junto à cera de abelha derretida.
- e) A mistura ficará em cozimento por 15 a 20 minutos e, em seguida, será armazenada em recipiente de vidro para ser conservada em geladeira.

Tenebrio molitor:

| | |
|--|---------|
| Gérmem de trigo estéril e pedaços de Torrada | 50 g/ C |
|--|---------|

ANEXO D

Tampão de extração CTAB - Método CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987):

Tampão A:

| | |
|--------------------------|--------|
| Sorbitol | 6,38 g |
| Tris-HCL | 1,21 g |
| EDTA | 0,19 g |
| Agua MiliQ | 100 mL |
| Ajustar pH = 8,0 com HCL | |

Tampão B:

| | |
|--------------|---------|
| NaCl | 11,69 g |
| CTAB | 2,0 g |
| Tris-HCl | 2,42 g |
| EDTA | 1,86 g |
| Agua MilliiQ | 100 mL |

Preparo do Tampão de extração CTAB:

| | |
|------------------------------------|-------------|
| Tampão A | 40 mL |
| Tampão B | 40 mL |
| SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio) | 8 mL |
| Bissulfito de Sódio 1% | 0,96 g |
| Carvão ativado 0,1% | 0,096 g |
| PVP 2% | 1,92 g |
| β -mercaptoetanol | 192 μ L |
