

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
DOUTORADO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

UBIRANY LOPES FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E ENZIMÁTICA DE
METARHIZIUM SPP POR ELETROFORESE, ANÁLISE EM MEIOS
ESPECÍFICOS E A ATIVIDADE QUITINOLÍTICA A PARTIR DA
DEGRADAÇÃO DA CUTÍCULA DE *BOOPHILUS MICROPLUS***

**RECIFE – BRASIL
2004**

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
DOUTORADO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E ENZIMÁTICA DE
METARHIZIUM SPP POR ELETROFORESE, ANÁLISE EM
MEIOS ESPECÍFICOS E A ATIVIDADE QUITINOLÍTICA A
PARTIR DA DEGRADAÇÃO DA CUTÍCULA DE *BOOPHILUS*
*MICROPLUS***

**Autora: Ubirany Lopes Ferreira
Orientadora: Profa. Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima
Co-Orientadora: Profa. Dra. Ana Célia Rodrigues Athayde**

**RECIFE – BRASIL
2004**

UBIRANY LOPES FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E ENZIMÁTICA DE
METARHIZIUM SPP POR ELETROFORESE, ANÁLISE EM
MEIOS ESPECÍFICOS E A ATIVIDADE QUITINOLÍTICA A
PARTIR DA DEGRADAÇÃO DA CUTÍCULA DE *BOOPHILUS*
*MICROPLUS***

**Tese apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Biologia de Fungos da
Universidade Federal de Pernambuco, como
parte dos requisitos para obtenção do Grau
de Doutor em Biologia de Fungos**

ORIENTADORA:

**Profa. Dra. Elza Áurea de Luna
Alves Lima**

CO-ORIENTADORA:

**Profa. Dra. Ana Célia Rodrigues
Athayde**

**Recife – Brasil
2004**

Ferreira, Ubirany Lopes

Caracterização fisiológica e enzimática de *Metarhizium* spp. por eletroforese, análise em meios específicos e a atividade quitinolítica a partir da degradação da cutícula de *Boophilus microplus* I
Ubirany Lopes Ferreira. – Recife : O Autor, 2004.

112 folhas : il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia de Fungos, 2004.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Fungos imperfeitos (*Metarhizium* spp.) – Caracterização fisiológica e enzimática. 2. Atividade quitinolítica (*Metarhizium* e carrapato bovino) – Análise semi-quantitativa. 3. Carrapato bovino (*Boophilus microplus*) – Cutícula – Degradação. 4. Eletroforese – Gel de poliacrilamida – Detecção de enzimas. I. Título.

**582.288.4
579.55**

**CDU (2.ed.)
CDD (21.ed.)**

**UFPE
BC2004-449**

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E ENZIMÁTICA DE
METARHIZIUM SPP POR ELETROFORESE, ANÁLISE EM
MEIOS ESPECÍFICOS E A ATIVIDADE QUITINOLÍTICA A
PARTIR DA DEGRADAÇÃO DA CUTÍCULA DE *BOOPHILUS*
*MICROPLUS***

UBIRANY LOPES FERREIRA

Comissão Examinadora
Titulares:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo (Depto. de Genética – USP-ESALQ)

Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira (Depto. de Micologia – UFPE)

Prof^a Dra. Luzinete Aciole de Queiroz (Depto de Micologia- UFPE)

Prof. Dr. José Ferreira dos Santos (Depto. de Genética – UFPE)

Profa. Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima (Depto. de Micologia – UFPE)

Suplentes:

Profa. Dra. Maria Menezes (Depto. de Agronomia – UFRPE)

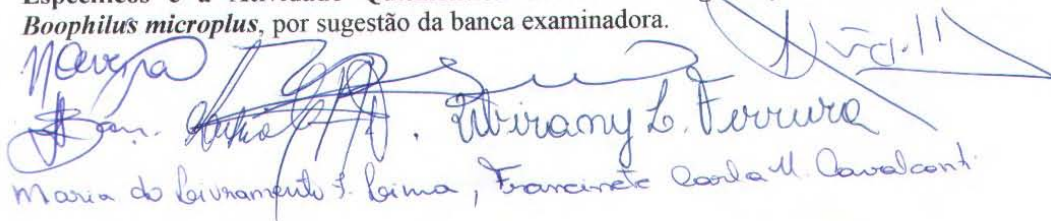
Prof^a Dra. Janete Magaly de Araújo (Depto de Antibióticos – UFPE)

Prof^a. Dra. ELZA ÁUREA DE LUNA ALVES LIMA –
Orientadora

Ata de Reunião de Prova Pública de Defesa de Tese da aluna UBIRANY LOPES FERREIRA da área de concentração em Micologia Aplicada, do Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos – nível Doutorado, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco

Às quatorze horas do dia vinte e sete de fevereiro de dois mil e quatro, na Sala de Aula da Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco realizou-se a prova pública de defesa de tese apresentada pela doutoranda Ubirany Lopes Ferreira sob a orientação da Profa. Elza Áurea de Luna Alves Lima, intitulada **Crescimento, Características Enzimáticas, Eletroforéticas em *Metarhizium* spp. e a Atividade Quitinolítica a partir da Degradação da Cutícula de *Boophilus microplus***. Presentes professores, alunos e convidados. A Banca Examinadora aprovada pela Diretora de Pós-Graduação da PROPESQ, Dra. Maria de Fátima Militão de Albuquerque em cinco de fevereiro de 2004, foi composta pelos seguintes membros titulares: Profa. Elza Áurea de Luna Alves Lima, da Universidade Federal de Pernambuco, Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Profa. Neiva Tinti de Oliveira, da Universidade Federal de Pernambuco, Doutora em Genética de Microorganismos pela Universidade Estadual de Campinas, Profa. Maria Menezes, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Doutora em Fitopatologia pela Universidade de São Paulo, Prof. João Lúcio de Azevedo, da Universidade de Mogi das Cruzes-SP, Doutor em Genética pela Universidade de Sheffield-Inglaterre, Prof. José Ferreira dos Santos, da Universidade Federal de Pernambuco, Doutor em Ciências pela Universidade Federal do Paraná, e como membros suplentes os Professores: Lusinete Aciole de Queiroz, da Universidade Federal de Pernambuco, Doutora em Ciências, na área de Microbiologia e Imunologia pela USP e Janete Magali de Araújo, da Universidade Federal de Pernambuco, Doutora em Genética pela ESALQ/SP. A Profa. Maria Menezes foi substituída pela Profa. Lusinete Aciole de Queiroz, por impossibilidade de comparecimento. A Profa. Leonor Costa Maia iniciou a sessão apresentando os membros da Banca Examinadora, agradecendo a colaboração e a presença de todos. Em seguida, passou a palavra à orientadora, Profa. Elza Áurea de Luna Alves Lima, que convidou a Doutoranda para apresentar a sua tese. A seguir, os membros da Banca Examinadora discutiram alguns pontos e fizeram sugestões sobre o trabalho. Procedida a avaliação, a Banca atribuiu à Doutoranda a Menção: aprovada. Nada mais havendo a tratar, eu, Luis Carlos Monteiro, lavrei, datei e assinei a presente ata, que também assinam os demais presentes. Recife, 27 de fevereiro de 2004.

Em tempo: o título original da tese foi modificado para: **Caracterização Fisiológica e Enzimática de Linhagens de *Metarhizium* spp. por Eletroforese, Análise em Meios Específicos e a Atividade Quitinolítica durante a Degradação da Cutícula de *Boophilus microplus***, por sugestão da banca examinadora.


Maria do Livramento F. Lima, Francinete Carla M. Cavalcanti,
Ubirany L. Ferreira

Ao **Deus**, pelo sopro de vida, por sua infinita bondade e por ter me permitido concluir mais uma etapa de minha vida.

Ofereço

À minha mãe Waldecy Monteiro Souza e família, pelo amor, compreensão, dedicação e ensinamentos.

À minha família especial, Maria do Livramento, Bereneuza Tavares e Ana Célia Athayde por todo apoio, determinação, solidariedade e carinho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Deus que em seu infinito amor e bondade concedeu-me a saúde e a oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

À minha mãe, Waldecy Monteiro Souza, ao meu marido, Ademir Claudino da Silva e minha família, pelo estímulo, lição de vida e dedicação, sem os quais não existiria o perfil de figura humana que hora possuo.

A Universidade Federal de Pernambuco por seu empenho na formação de profissionais de qualidade, propiciando as condições para ampliar meus conhecimentos ao nível de pós-graduação.

Aos profissionais que compõem o Curso de Pós-graduação em Biologia de Fungos pelos conhecimentos compartilhados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por me conceder uma bolsa de estudos.

Ao Prof^o Dr. Marcos Correa da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) por suas valiosas informações que tanto enriqueceram os meus conhecimentos, além de sua especial atenção e dedicação para o desenvolvimento da técnica eletroforética.

Ao Roberto Luis Xavier Silva (Bob), do Departamento de Agronomia do Laboratório de Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela amizade e análise estatística.

Aos colegas de laboratório: Fabiana M^a de Sena, Welber Eustáquio de Vasconcelos, José Cezário de Almeida, Amélia M^a Tavares Guimarães, Bereneuza Tavares Ramos Valente Brasileiro, Ângela Coimbra dos Santos e

Auristela Correia de Albuquerque pelo convívio agradável, espírito de luta e companheirismo.

Aos colegas e amigos de luta: Marlon Feijó, Maria do Livramento e Bereneuza Tavares Ramos, por todo apoio, determinação e amizade, que enche de orgulho todas as pessoas que compartilham de vossas convivências.

À Karla Cristina A. Pereira e Auristela Correia de Albuquerque por sua contribuição na grafia do Abstract.

À amiga, irmã e colega de curso, Maria do Livramento Ferreira Lima, por sua amizade, respeito, apoio e sua especial colaboração na realização da parte experimental da pesquisa, sem a qual, muitas das dificuldades enfrentadas impossibilitariam a conclusão de algumas etapas desta pesquisa.

À Profa. Dra. Ana Célia Rodrigues Athayde, por seu espírito solidário, pelo incentivo, estímulo e colaboração na elaboração do projeto de Tese.

À Profa. Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima, pela oportunidade de compartilhar de seus conhecimentos durante minha formação ao nível de pós-graduação e pelas orientações que tanto enriqueceram minha vida profissional e pessoal.

Por fim, meu carinho e atenção eterna a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para elevar os meus conhecimentos científicos, tornando-me um profissional melhor.

“ Que a humildade, a caridade e o amor ao próximo não se tornem palavras soltas ao vento, mas sim, um princípio de vida. E que este princípio nos auxiliem na busca constante de elevarmos nossos espíritos e pensamentos, frente ao Pai Eterno.”

Ubirany Ferreira

RESUMO

Foi verificado neste trabalho a atividade quitinolítica de *Metarhizium* spp. a partir da degradação da cutícula de *Boophilus microplus*, além das atividades lipolítica, amilolítica e proteolítica em meios basais, como também estudos do crescimento fúngico em três diferentes meios de cultura e isoenzimáticos. Foram observados maiores valores de atividade enzimática na linhagem CG291_C (*Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride* reisolada de *B. microplus*) em meio contendo cutícula de *B. microplus* para atividade quitinolítica, CG434_C (*M. anisopliae* var. *acridum* reisolada de *B. microplus*) e CG434 (*M. anisopliae* var. *acridum*) lipolítica, CG442_C (*M. anisopliae* var. *acridum* reisolada de *B. microplus*) proteolítica e CG442 (*M. anisopliae* var. *acridum*) para amilolítica. O meio BDA induziu o maior crescimento e esporulação, e entre os meios líquidos, Czapeck e Massa de arroz propiciaram maior peso da matéria seca. A análise eletroforética em gel de poliacrilamida demonstrou variações no número e posições das bandas, em cada um dos sistemas estudados. Foi observada maior variação nos perfis das bandas com relação às proteínas totais, em todas as linhagens, variando de uma a oito bandas com mobilidade relativa diferenciada. No sistema esterase as linhagens CG291 (*Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride*) e CG291_C (*Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride* reisolada de *B. microplus*) apresentaram o mesmo perfil e mobilidade relativa o que diferiu das demais linhagens estudadas, revelando polimorfismo. Na visualização do gel para fosfatase ácida, apenas as linhagens CG291 e CG291_C mostraram perfis idênticos com cinco bandas de mesma mobilidade relativa e revelando grande polimorfismo nas demais linhagens. No sistema superóxido dismutase as linhagens CG434, CG434_C, CG442 e CG442_C não apresentaram bandas. De modo geral, todas as linhagens mostraram padrões diferentes indicando uma variação fenotípica.

ABSTRACT

In this work, it was verified that the chitinolytic activity of *Metarhizium* spp. by the degradation of the *Boophilus microplus* cuticle, besides the lipolytic, chitinolytic and proteolytic activities in basal media, as well as growth studies in three different media culture and the isoenzymatic profiles. Greater values were observed in the CG291_C strain (*M. flavoviride* var. *flavoviride* reisolated of *B. microplus*) in an environment containing *B. microplus* cuticle for the chitinolytic activity, CG434_C (*M. anisopliae* var. *acridum* reisolated of *B. microplus*) and lipolytic CG434 (*M. anisopliae* var. *acridum*), proteolytic CG442_C (*M. anisopliae* var. *acridum* reisolated of *B. microplus*) and CG442 (*M. anisopliae* var. *acridum*) for the amylolytic. The BDA medium induced the best growth and sporulation, and among the liquid media, Czapeck and rice paste provided the greater weight of dry matter. The electrophoretic analysis in polyacrylamide gel demonstrated variations in the number and position of the bands, on each of the studied systems. A greater variation was observed in the profiles of the bands in relation to total proteins, in all strains, varying from one to eight bands with relative mobility different. In the esterase system, the CG291 (*M. flavoviride* var. *flavoviride*) and CG291_C (*M. flavoviride* var. *flavoviride* reisolated of *B. microplus*) strains presented the same profile and relative mobility which differed from the other strains studied, revealing variability. In the visualization of the gel for the acid phosphatase, only the CG291 and CG291_C strains showed identical profiles with five bands of the same relative mobility and revealing great polymorphism in the other strains. In the superoxide dismutase, the CG434, CG434_C, CG442 and CG442_C strains did not present bands. In general, all strains showed different patterns indicating a phenotypic variation.

SUMÁRIO

Páginas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. <i>Metarhizium</i> Sorokin: histórico e atualização taxonômica	3
2.2. <i>Metarhizium</i> no controle de pragas de interesse agropecuário	6
2.3. <i>Boophilus microplus</i> e o controle biológico	8
2.4. Atividade enzimática de fungos utilizados em controle de pragas	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Material biológico utilizado	16
3.2. Manutenção das linhagens de fungos	17
3.3. Degradação da cutícula de <i>Boophilus microplus</i>	17
3.3. 1. Obtenção da cutícula do carrapato	17
3.4. Obtenção da quitina	18
3.5. Atividade quitinolítica	18
3.6. Atividade lipolítica	18
3.7. Atividade proteolítica	19
3.8. Atividade amilolítica	19
3.9. Aspectos biológicos de <i>Metarhizium</i> spp	20
3.9.1. Crescimento radial do micélio	20
3.9.2. Produção de esporos	21
3.9.3. Peso seco	21
3.10. Caracterização isoenzimática de <i>Metarhizium</i> spp em gel de poliacrilamida	21
3.10.1. Preparação dos extratos	22

3.10.2. Determinação da concentração de proteína	22
3.10.3. Preparação do gel de poliacrilamida e separação eletroforética	23
3.10.4. Coloração para detecção de proteínas totais, esterase, fosfatase ácida e superóxido dismutase, secagem e interpretação dos zimogramas	23
3.10.4.1. Proteínas totais	23
3.10.4.2. Esterase	24
3.10.4.3. Fosfatase ácida	24
3.10.4.4. Superóxido dismutase	24
4. RESULTADOS	26
4.1. Atividade quitinolítica em <i>Metarhizium</i> spp. durante a degradação da cutícula de <i>Boophilus microplus</i>	26
4.2. Atividade lipolítica em <i>Metarhizium</i> spp.	27
4.3. Atividade proteolítica em <i>Metarhizium</i> spp.	28
4.4. Atividade amilolítica em <i>Metarhizium</i> spp	29
4.5. Aspectos biológicos de <i>Metarhizium</i> spp.	33
4.5.1. Crescimento radial	33
4.5.2. Produção de esporos	35
4.5.3. Peso seco	36
4.6. Caracterização protéica e isoenzimática de <i>Metarhizium</i> spp. em gel de poliacrilamida	38
4.6.1. Perfil protéico total	38
4.6.2. Atividade esterásica	41
4.6.3. Atividade de fosfatase ácida	42
4.6.4. Atividade de superóxido dismutase	44
5. DISCUSSÃO	46
5.1. Atividade quitinolítica	46
5.2. Atividade lipolítica	47
5.3. Atividade proteolítica	48
5.4. Atividade amilolítica	50

5.5. Aspectos biológicos de <i>Metarhizium</i> spp	51
5.5.1. Crescimento radial	51
5.5.2. Produção de esporos	52
5.5.3. Peso da matéria seca	54
5.6. Características isoenzimáticas de <i>Metarhizium</i> spp em gel de poliacrilamida	54
5.6.1. Padrão protéico	54
5.6.2. Esterase	56
5.6.3. Fosfatase ácida	58
5.6.4. Superóxido dismutase	59
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
8. ANEXOS	81

Lista de Figuras

Páginas

- Figura 1.** Halo de degradação (seta) do amido por *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (CG442c) reisolada de *Boophilus microplus* (a) aos cinco dias e (b) aos 10 dias de incubação em meio de cultura específico.. 31
- Figura 2.** Halo de degradação (seta) do amido por *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (CG442c) reisolada de *Boophilus microplus* aos 15 dias de incubação. 32
- Figura 3.** Eletroferograma de proteínas totais de oito linhagens de *Metarhizium* spp. em gel de poliacrilamida (12%). 39
- Figura 4.** Eletroferograma de esterase de oito linhagens de *Metarhizium* spp. em gel de poliacrilamida (12%). 41
- Figura 5.** Eletroferograma de fosfatase ácida de oito linhagens de *Metarhizium* spp. em gel de poliacrilamida (12%). 43
- Figura 6.** Eletroferograma de superóxido dismutase de oito linhagens de *Metarhizium* spp. em gel de poliacrilamida (12%). 45

Lista de Tabelas

	Páginas
Tabela 1.. Linhagens de <i>Metarhizium</i> spp utilizadas nos estudos fisiológicos, exoenzimáticos e isoenzimáticos	17
Tabela 2. Atividade quitinolítica de oito linhagens de <i>Metarhizium</i> spp aos 12 dias de incubação em meios específicos contendo exosqueleto de camarão ou cutícula de <i>IBoophilus microplus</i>	27
Tabela 3. Atividade lipolítica de oito linhagens de <i>Metarhizium</i> spp. aos 05, 10 e 15 dias de incubação em meio específico contendo tween 20.	28
Tabela 4. Atividade proteolítica de oito linhagens de <i>Metarhizium</i> spp. aos 05, 10 e 15 dias de incubação em meio específico.	29
Tabela 5. Atividade amilolítica de oito linhagens de <i>Metarhizium</i> spp. aos 05, 10 e 15 dias de incubação em meio específico.	30
Tabela 6. Diâmetro de colônia de oito linhagens de <i>Metarhizium</i> spp. em diferentes meios de cultura aos 12 dias de incubação.	34
Tabela 7. Velocidade média de crescimento de <i>Metarhizium</i> spp em diferentes meios de cultura entre o sexto e sétimo dia de incubação.	35
Tabela 8. Esporulação de oito linhagens de <i>Metarhizium</i> spp. em diferentes meios de cultura aos 12 dias de incubação.	36
Tabela 9. Peso seco de oito linhagens de <i>Metarhizium</i> spp. em diferentes meios de cultura aos 12 dias de incubação.	37

Tabela 10. Mobilidade relativa de proteínas totais em gel de poliacrilamida de oito linhagens de *Metarhizium* spp.. 40

Tabela 11. Mobilidade relativa de esterase em gel de poliacrilamida de oito linhagens de *Metarhizium* spp.. 42

Tabela 12. Mobilidade relativa de fosfatase ácida em gel de poliacrilamida de oito linhagens de *Metarhizium* spp.. 44

Tabela 13. Mobilidade relativa de superóxido dismutase em gel de poliacrilamida de oito linhagens de *Metarhizium* spp. 45

1. INTRODUÇÃO

Para que ocorra uma doença em artrópodes, o patógeno necessita vencer a barreira cuticular. A elaboração e combinação de enzimas são estritamente necessárias para que possa ocorrer a digestão da cutícula do inseto, existindo uma correlação positiva entre uma elevada produção de enzimas *in vitro* e uma elevada virulência do fungo, enfatizando a protease e quitinase como os mais importantes (EL-SAYED et al., 1989; KENDRICK, 1992)..

M. flavoviride vem sendo aplicado como bioinseticida em alguns países africanos, embora pouco se conheça a respeito de sua variabilidade genética, mecanismos de recombinação, patogenicidade entre outros (KUKLINSKY-SOBRAL, 1999). Algumas linhagens de *M. flavoviride* foram transferidas por Driver et al. (2000) para outra denominação *M. anisopliae* var. *acridum*. Vários estudos indicam este fungo como o de maior grau de infectividade e patogenicidade contra gafanhotos. Esses aspectos servem de referência para que se realize estudos bioquímicos, levando em consideração o papel essencial que exercem as enzimas para que possa ocorrer a degradação da cutícula do hospedeiro. Até o momento, não foi encontrado na literatura específica, dados sobre a patogenicidade, correlacionada com a produção enzimática, do *M. anisopliae* var. *acridum* no carrapato bovino *Boophilus microplus*.

Os carrapatos são importantes e eficientes vetores de doenças em bovinos, causando paralisia através de secreções tóxicas produzidas por suas glândulas salivares e transmitindo vírus, rickettsias, bactérias e protozoários. Como consequência das pragas de carrapatos bovinos, além da transmissão de doenças ao animal, pode ser citado a perda de peso, comprometimento do couro e os custos econômicos para o criador. Como medida de prevenção utiliza-se produtos químicos nos rebanhos, os quais desencadeiam para o criador um custo muito alto para manter seu rebanho livre de pragas (ATHAYDE, 2002).

Este trabalho teve por objetivo estudar o crescimento em diferentes meios de cultura e a atividade enzimática de linhagens de *Metarrhizium* spp. através de eletroforese, análise em meios específicos para as atividades lipolítica, proteolítica, amilolítica e a sua atividade quitinolítica a partir da degradação da cutícula de *Boophilus microplus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Metarrhizium* Sorokin: histórico e atualização taxonômica

Uma das primeiras espécies de fungos entomopatogênicos descritas foi *Cordyceps sinensis* por Réaumur em 1726, atacando um Lepidoptera. No entanto, o gênero *Metarrhizium* é um dos mais frequentemente utilizado nos dias atuais em controle biológico, onde a espécie *Metarrhizium anisopliae*, foi descrita pela primeira vez em 1879, em isolado de larvas do inseto *Anisopliae austriaca* Hbst, por Metschnikoff (VEEN, 1968; KENDRICK, 1971; ALVES, 1998; AZEVEDO; MESSIAS, 1985). Em estudos posteriores, Metschnikoff a descreveu com a denominação de *Isaria destructor*. Nos anos que se seguiram a este relato, esta espécie foi alvo de várias denominações, no entanto, em 1883, Sorokin denominou *M. anisopliae*, ao isolado de Metschnikoff e essa denominação passou a ser aceita e utilizada por toda a comunidade científica (LUNA-ALVES LIMA, 1989).

O gênero *Metarrhizium* está amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado facilmente no solo, no qual sobrevive por longo período. Tulloch (1976) em sua revisão sobre o gênero, admitiu para *M. anisopliae* duas variedades, as quais foram separadas pelo tamanho dos conídios, onde *M. anisopliae* (Mestch.) Sorokin var. *anisopliae* apresenta conídios que variam de 3,5 – 9,0 μm e *M. anisopliae* (Mestch.) Sorokin var. *major* (Johnston) apresenta conídios variando de 9,0-18,0 μm . Luna-Alves Lima (1985) demonstrou que as estruturas reprodutivas neste fungo, estão representadas por conidióforos simples e ramificados e conídios cilíndricos, uni e multinucleados. Os conidióforos são estruturas hialinas, simples ou ramificadas em meio de cultura, formadas por células conidiogênicas especializadas que dão origem as fiálides, também hialinas, onde ocorre a mitose. A formação dessas estruturas hialinas em *M. anisopliae* segue o modelo fialídico proposto por Hugues (1953), que culmina

com a produção de conídios de coloração esverdeada, de inserção basipetal (HAMMIL, 1972).

As espécies deste fungo, por serem encontradas provocando doenças em mais de 200 espécies de insetos, são amplamente estudadas no Brasil e outros Países. *Metarrhizium* é citado entre os mais importantes gêneros para o controle biológico de insetos, principalmente de Homoptera: Cercopidae (SOCCOL et al., 1997; ALVES, 1998).

M. flavoviride foi descrito pela primeira vez por Gams & Rozsypal (1973) quando o isolaram de larvas e pupas de curculionídeos, *Ceutorhynchus maculata-alba* e *C. albovittatus* e de solos cultivados na Europa. Evidenciaram em linhagens jovens, conídios tipicamente elipsóides, com 7-9 (-11) x 4,5-5,5 µm apresentando-se hialinos quando vistos isoladamente e massa conidial de coloração verde-amarelada. Foi estudado como patógeno específico dos gorgulhos *Otiorhynchus sulcatus* e *Delia antiqua* por Rombach et al. (1986) que descreveram uma nova variedade e denominaram *M. flavoviride* var. *flavoviride* reconhecida por Driver et al. (2000) que elaboraram a mais recente classificação para o gênero. Uma nova variedade *M. flavoviride* var. *minus*, que foi isolada de gafanhoto nas Ilhas de Galápagos foi proposta por Rombach et al. (1986). Os conídios desta variedade são menores (4,5-7 x 2-3 µm) e mais consistentemente elipsóides a ovóides do que os descritos para a variedade anteriormente identificada por Gams e Rozsypal (1973).

Entre os fungos utilizados no controle biológico de pragas ou com potencial para tanto, indubitavelmente *M. anisopliae* é o que mais tem merecido a atenção dos pesquisadores e por isso maior número de informações foi acumulada a seu respeito (MONTEIRO, 1988). O autor cita ainda que o fungo apresenta estrutura reprodutiva semelhante a um esporodóquio na descrição de outros autores. Contudo essa forma semelhante aos esporodóquios são conidióforos justapostos que se entrelaçam frouxamente, devido à grande

ramificação das estruturas hifais, mas os conidióforos continuam individualizados (LUNA-ALVES LIMA, 1985; XAVIER-SANTOS, 1995; KUKLINSKY-SOBRAL; LUNA-ALVES LIMA, 1998).

Através de bioensaios, as alterações comportamentais alimentares do gafanhoto *Schistocerca gregaria* (Forscal), infectado por *M. flavoviride* foram estudadas por Moore et al. (1992). Eles observaram que a infecção por esse fungo foi capaz de provocar uma diminuição diária no consumo de alimentos do gafanhoto, tendo início, nas dosagens mais altas, a partir das 24 horas.

Utilizando técnicas moleculares de sequenciamento das regiões ITS e 28S, rDNA D3 e RAPD, Driver et al. (2000) analisaram 123 isolados identificados anteriormente como *M. anisopliae*, *M. flavoviride* ou *M. album*. As análises confirmaram a predominância do *M. anisopliae*, no entanto foram reconhecidos quatro agrupamentos, dois compostos por *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *majus* e incluíram nos outros dois agrupamentos *M. anisopliae* var. *lepidiotum* e *M. anisopliae* var. *acridum*, com base nas sequências de ITS e na análise de RAPD, confrontadas com a morfologia dos conídios.

A identificação e caracterização de um isolado do Peru CG863 de *M. anisopliae* var. *acridum* foram feitas por comparação com dois outros isolados de *M. anisopliae* var. *acridum*, do Brasil (CG423) e da Austrália (FI985), e com um isolado de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, obtido de outro Orthoptera (FI 1029) (MAGALHÃES et al., 2002). Os parâmetros utilizados foram tamanho de conídios, crescimento a 25 e 37°C, padrões de RAPD, e virulência contra o gafanhoto do Mato Grosso, *Rhammatocerus schistocercoides* (TIGANO-MILANI et al., 1995; ALJANABI; MARTINEZ, 1997; MAGALHÃES et al. 1997). Os resultados demonstraram um padrão de crescimento similar em placas de ágar a 25 e 37°C e para os perfis de RAPD para os isolados CG 863, CG 423 e FI 985, com bioensaios preliminares indicando o isolado peruano como tão virulento contra *R. schistocercoides* quanto o isolado brasileiro. Magalhães

et al. (2002) concluíram que os isolados peruanos e brasileiros de *M. anisopliae* var. *acridum* são muito próximos em termos de biologia, morfologia (tamanho de conídios) e padrões de RAPD.

2.2 *Metarrhizium* no controle de pragas de interesse agropecuário

Sosa-Goméz e Alves (1983) estudaram diversos isolados de *M. anisopliae*, provenientes de algumas regiões do Brasil, selecionaram os isolados SPL-52T e PL-39 como sendo os mais apropriados para utilização no controle biológico de alguns insetos. Os principais caracteres considerados foram produção de conídios em meio artificial, virulência, resistência à radiação ultravioleta e produção de conídios sobre cadáveres de *Diatraea saccharalis*. Isolados de *M. anisopliae* foram selecionados para o controle de *Mahanarva posticata*, utilizando-se os caracteres biológicos e bioquímicos já mencionados. Em Pernambuco, *M. anisopliae* foi utilizado no controle da cigarrinha da cana-de-açúcar (*M. posticata*), como inseticida biológico e foi considerado eficaz no controle desta praga (VILAS BOAS, 1992). A autora relata ainda a atuação deste bioinseticida numa área da região Nordeste que se estende de Alagoas ao Rio Grande do Norte. No Brasil, *M. flavoviride* foi isolado do gafanhoto *Schistocerca pallens*, no Rio Grande do Norte. Este isolado foi considerado muito virulento para *Rammatocerus schistocercoides*, diferenciando-se dos demais isolados que vinham sendo testados como bioinseticida em outros países (MAGALHÃES et al., 1995; MOREIRA et al., 1996). Outros estudos foram efetuados com o mesmo fungo avaliando os efeitos da luz do sol natural e simulada, da luz ultravioleta (UV) sobre a germinação de conídios e interações com diferentes temperaturas. A luz natural causou maiores danos na germinação do que a luz artificial devido provavelmente à dose de UV ser maior na luz natural em relação à luz artificial (MOORE et al., 1992).

Os estudos realizados por Inglis et al. (1997) demonstraram que o aumento da temperatura corporal do gafanhoto *Melanoplus sanguinipes* pode inibir ou prevenir doenças causadas por *B. bassiana* e *M. flavoviride* (*M. anisopliae* var. *acridum*), sendo que as temperaturas baixas são mais inibitórias para esse fungo, enquanto que a inoculação de ambos mostrou altos níveis de mortalidade tanto em temperaturas altas quanto baixas.

M. anisopliae é um fungo controlador de insetos, utilizado no Brasil em cerca de 200.000 ha/ano no início da década de 70, principalmente no controle de cigarrinhas da cana-de-açúcar e das cigarrinhas-das-pastagens. O programa mais conhecido de controle biológico com fungos no Brasil e, possivelmente, em todo o mundo foi o do controle da cigarrinha-da-cana-de-açúcar no Nordeste brasileiro por *M. anisopliae* (BURGES, 1981; AZEVEDO; MELO, 1998). Também em cigarrinhas-das-pastagens o *M. anisopliae* é empregado com estimativas de controle variando de 10 a 60%, o que é considerado razoável, já que as cigarrinhas-das-pastagens como *Zulia entreciana* e *Deois flavopicta* causam grandes prejuízos. De fato, as cigarrinhas-das-pastagens podem causar até 50% de queda na produção de leite e de carne em rebanhos bovinos (FONTES, 1992).

O emprego experimental de *M. anisopliae* var. *acridum* vem sendo feito em condições de campo na África e em outros países, visando o controle de gafanhotos, em introduções inundativas com doses em torno de 10^{13} conídios/ha, para aplicações em áreas totais (ALVES, 1998). Portanto, são necessárias grandes quantidades de conídios para o tratamento das áreas infestadas, o que poderá inviabilizar o uso desse patógeno em grandes infestações da praga. Desta forma, é de grande importância que se propicie o estudo de novas estratégias para que este fungo venha a ser usado no controle de Orthoptera (*Schistocerca pallens* e *Stiphra pallens*), que ocorrem no Nordeste, e de *Ramatocerus schistocercoides*, praga importante da Região Centro-Oeste do Brasil.

2.3 *Boophilus microplus* e o controle biológico

O carrapato *Boophilus microplus* que tem considerável importância veterinária, pertence a Classe Aracnida Ordem Acarina, Subordem Metastigmata, Superfamília Ixodoidea e Família Ixodidae. A família Ixodidae é considerada a família mais importante, cujos membros são frequentemente denominados carrapatos duros, por causa da presença de um rígido escudo quitinoso que cobre toda a superfície dorsal do macho adulto. Na fêmea adulta, na larva e na ninfa, ele se estende apenas por uma pequena área, permitindo a dilatação do abdome depois da alimentação. São vetores importantes de doenças causadas por protozoários, bactérias, vírus e riquetsias. A especificidade ao hospedeiro também é utilizado como um parâmetro para a caracterização de uma quantidade expressiva de espécies, além das características morfológicas tradicionalmente usadas (HOOGSTRAAL, 1985; URQUHART et al., 1998).

B. microplus, carrapato bovino de um único hospedeiro, apresenta um ciclo de vida constituído de duas fases distintas: uma fase livre e uma fase parasitária, que são influenciadas pela umidade relativa acima de 70% e uma temperatura de 27°C. Esses dois ciclos são regulados na natureza pelas estações anuais, podendo *B. microplus* apresentar durante este período cerca de três a quatro gerações (WAHARTON; UTECH 1969). Os carrapatos são considerados os mais importantes ectoparasitas em áreas de exploração pecuária das regiões tropicais e subtropicais, são responsáveis por severas perdas econômicas, principalmente no que concerne à transmissão de patógenos e toxinas, como vetores potenciais. As enfermidades transmitidas por esses artrópodos situam-se entre os mais importantes problemas de saúde em todo o mundo. O controle químico tem se mostrado pouco eficientes nos dias atuais, propiciando riscos constantes e graves para a população humana e animal, consequentemente comprometendo o ecossistema (OMS, 1980; WAHARTON, 1983; ATHAYDE et al., 2001).

B. microplus, acarretou prejuízos globais na pecuária sul-americana na ordem de 1 bilhão de dólares. O animal infestado tem uma diminuição de seu ganho de peso que chega a atingir um quilograma/ano, e pelas lesões que ocasionam ao couro ocorre a inviabilidade de comercialização do mesmo em aproximadamente 90% (RAMIREZ, 1982; HORN, 1985). O controle desse e de outros carrapatos tem sido realizado com o uso de acaricidas que propiciam em gerações futuras o surgimento de populações resistentes, o que ocasiona o uso de substâncias químicas em quantidades elevadas, desencadeando um aumento no depósito de resíduos tóxicos no meio ambiente. Como uma medida alternativa e promissora tem-se testado o controle biológico, utilizando em pesquisas *in vitro* com *M. anisopliae* e outros fungos (BITTENCOURT et al., 1999; SAMISH ; REHACEK, 1999; BITTENCOURT, 2000; ATHAYDE et al., 2001).

O primeiro trabalho encontrado na literatura sobre fungos causando doenças em carrapatos foi o de Kolomiec em 1950 (LIPA, 1971), no qual o fungo *Aspergillus fumigatus* causava mortalidade em colônias de *Hyalomma scupense* e *Dermacentor marginatus*, crescidas em laboratórios. Foi verificado também que as fêmeas ingurgitadas morriam antes ou logo após o fim da postura. Posteriormente, Samsinakova (1957) observou em suas coletas uma fêmea de *Ixodes ricinus* trazida do campo para o laboratório, infectada pelo fungo *Beauveria bassiana*. A fêmea infectada, continuou o ciclo biológico, realizando postura e após a morte foram verificadas hifas emergindo da cavidade bucal.

Estudos histológicos realizados por Estrada-Penã et al. (1990) em *Rhipicephalus sanguineus* naturalmente infectados por *Aspergillus ochraceus*, registraram a colonização do fungo nos cecos intestinais, tubo de Malpighi e ânus do carrapato, o que impediu a ovoposição, ocasionando a morte destes e mumificação posterior.

A patogenicidade *in vitro* da espécie *M. anisopliae* inoculado com suspensão conidial em fêmeas ingurgitadas do carrapato de cão *R. sanguineus*,

coletadas diretamente do animal após a queda e mantidas à temperatura ambiente foi avaliada por Athayde et al. (1999a). O experimento constou da infecção de 10 fêmeas ($7,85 \times 10^5$ conídios/ml), e um grupo controle onde vários parâmetros biológicos foram testados, se destacando a redução do peso da massa de ovos (52,67T e 100,26C), a diminuição do índice de produção de ovos (39,68%T e 76,96%C) e diminuição do percentual de eclosão (39,80%T e 99,80%C). Os bons resultados alcançados sugeriram a possibilidade do uso de *M. anisopliae* para controle deste carrapato, ressaltando que este biocontrole favorecerá uma maior proteção ao animal e ao meio ambiente.

O efeito *in vitro* de 12 isolados de *M. anisopliae* sobre fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* foi analisado por Frazzon et al. (2000). Entre os isolados estudados, o E6S1, que foi coletado de carrapatos infectados, causou 100% de mortalidade, e foi o mais patogênico, quando testado na concentração de 10^7 conídios/mL. Esta mesma espécie foi avaliada por Bittencourt (2000) quanto à patogenicidade, em condições de campo e de laboratório, sobre *B. microplus* e foram observadas em condições de laboratório diferenças significativas em relação aos índices de eficiência reprodutiva e nutricional durante o período de eclosão e incubação das fêmeas ingurgitadas. Com o mesmo propósito, Kaaya e Hassan (2000) testaram espécies de fungos entomopatogênicos e concluíram que são promissores para utilização como agentes controladores dos carrapatos.

A eficiência de dois isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e de dois isolados de *M. flavoviride* var. *flavoviride* em larvas ingurgitadas de *B. microplus* foram avaliadas em experimento de laboratório e de campo, em que *M. flavoviride* var. *flavoviride* mostrou-se mais patogênico (ONOFRE et al. 2002)

2.4 Atividade enzimática de fungos utilizados em controle de pragas

A viabilidade depende da integridade dos componentes da parede celular, a qual funciona como barreira seletiva ante as pressões físico-químicas exercidas pelo meio ambiente em que o microrganismo sobrevive. Essa barreira funciona como ponto principal das interações envolvidas no processo de antagonismo entre fungos. As enzimas capazes de hidrolisar os componentes da parede celular desempenham papel fundamental no processo antagônico. Entre as hidrolases destacam-se as celulases, as β -glucanases, as quitinases e as proteases (CHET; BAKER, 1980; ELAD et al., 1983; BENHAMOU; CHET, 1993; HARAN et al., 1996). Por sua vez, as lipases são ainda pouco consideradas como participantes do antagonismo por micoparasitismo.

A análise de isoenzimas para se detectar a variabilidade genética tem sido empregada em vários fungos, como subsídio para se diferenciar espécies ou linhagens de uma mesma espécie (MOREIRA; ALFENAS, 1985; BONDE et al., 1989). As investigações sobre isoenzimas por eletroforese, vem sendo realizadas em várias áreas, principalmente na bioquímica, através da interação existente entre o patógeno e o hospedeiro, assim como para caracterização genética de população fúngica (LU; GROTH, 1987). Entre as vantagens apontadas para o uso das isoenzimas estão as suas características codominantes, de maneira a distinguir indivíduos homozigotos de heterozigotos, além de evidenciarem a variação na sequência de aminoácidos da molécula protéica que têm a mesma função catalítica, detectando assim, a variação entre a sequência de DNA que codifica as proteínas (McDONALD; McDERMOTT, 1993).

A elaboração e combinação das enzimas pelo fungo são estritamente necessárias para que possa ocorrer a digestão da cutícula do inseto segundo Kendrick (1992). Ressaltou-se ainda a correlação positiva entre uma elevada produção de enzimas *in vitro* e uma elevada virulência do fungo, enfatizando a protease e quitinase com as principais enzimas atuantes.

A quitina é um dos componentes funcionalmente mais importante da parede celular de fungos, sendo formada de moléculas de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas β -1,4, resultando em cadeias lineares (STIRLING et al., 1979; BALLOW, 1982; CABIB et al., 1982). É encontrada em organismos na forma de fibras associadas a proteínas, lipídios ou a outros açúcares ((STIRLING et al., 1979). Como um biopolímero linear e insolúvel em água, é abundantemente encontrado no exosqueleto dos invertebrados que vivem no mar como as lagostas e outros crustáceos, nos artrópodes e na parede celular de fungos e de algumas algas. A única diferença química entre a quitina e a celulose é a substituição da hidroxila do carbono 2 dos resíduos de glicose por um grupo aminoacetilado (LIMA et al., 2000). As β -1,3-glucanas e a quitina estão embebidas em uma matriz de material amorfo e envoltas por substâncias contendo grupos amino não-acetilados como, por exemplo, a quitosana (LIMA et al., 2000).

Lipídios são componentes fúngicos importantes em termos de estrutura e constituição de membrana. Muitos estudos têm demonstrado a importância dos lipídios para o desenvolvimento, esporulação, germinação e seu envolvimento em vários processos fisiológicos (WEETE et al., 1980; RATTRAY, 1975; VAN ETEN et al., 1965; WEETE, 1980, 1981). Muitos fungos contêm entre 5 e 32% de lipídios, dependendo das condições de cultura, estágio de desenvolvimento e espécies. O conteúdo de lipídios dos esporos de muitos fungos chegam a atingir entre 5 e 17% do peso seco, mas os esporos de algumas espécies como as ferrugens contêm até 35% de lipídios (SHAN, 1966). Os principais fatores que influenciam a extensão de produção de lipídios são a natureza da proporção de carbono e nitrogênio assim como as fontes de nutrientes no meio (CHESTERS; PEBERDY, 1965). Os componentes principais destes lipídios usualmente são triglicerídeos e glicerolfosfolipídios (fosfolipídios), que podem estar acompanhados por esteróis e seus ésteres, ácidos orgânicos e hidrocarbonetos. Os ácidos orgânicos alcançam do C12 ao C24 em comprimento nas cadeias (SHAN, 1966).

St. Leger et al. (1987a) observaram que o exosqueleto dos insetos consiste de fibrilas de quitina embebidas em uma matriz de proteína, que corresponde a uma dipolimerase fúngica, com uma função significativa dentro do parasitismo. Relataram ainda, que foram estabelecidos alguns isolados fúngicos virulentos comercialmente importantes, nos quais as endoproteases são produzidas rapidamente em grande quantidade quando comparadas com a quitinase, em meios de cultura que possuíam cutícula.

Investigando a distribuição de quimioelastase e tripsina em nove isolados de cinco espécies dos fungos entomopatogênicos (*B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Verticillium lecanii*, *Nomuraea rileyi* e *Aschersonia aleyrodis*). St. Leger et al. (1987b) observaram que em dois isolados de *M. anisopliae* foram detectados a quimioelastase e os demais isolados demonstraram uma baixa sensibilidade para inibição da tripsina. St. Leger et al. (1988) relacionaram a presença da quimioelastase extracelular produzida por *M. anisopliae* com o poder de infecção deste fungo.

A produção de enzimas extracelulares como amilase, lipase, DNAase, RNAase, pectinase, protease, urease e quitinase, em meios sólidos, foram avaliadas em sete fungos patogênicos à planta e seis sapróbios, assim como as amostras compostas de folhas. Antibióticos foram examinados por sua habilidade para superar o crescimento bacteriano no meio através de seus efeitos e pH sobre o crescimento fúngico, além da análise da produção de enzima extracelular. Os meios sólidos foram apontados como favoráveis para avaliação individual do fungo e para a análise rápida de variantes genéticas, para a presença ou ausência da produção de enzimas como também para estudos ecológicos e possíveis diferenciações quimiotaxonômicas (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

A produção de enzimas extracelulares em meio de cultura sólido através de substratos específicos para a produção de amilase, lipase, quitinase e protease foram testadas por Rosato et al. (1981) para determinarem a variabilidade entre

11 isolados de *M. anisopliae* de diferentes regiões do Brasil. Foram detectadas a atividade enzimática em isolados da mesma região e de regiões geograficamente distintas.

Vinte linhagens de *M. anisopliae* e quatro de *M. flavoviride*, foram analisadas por Bridge et al. (1993), verificando que as de *M. flavoviride* apresentaram variações nas mensurações dos conídios (5,2-9,1 x 1,6-3,9 μm). A espécie demonstrou não possuir atividade de α -fucosidase. A eletroforese de isoenzimas utilizando-se a catalase, a fosfatase ácida e o padrão de bandas em RFLP reforçaram a distinção dessa espécie no gênero *Metarrhizium*. *M. flavoviride* mostrou um padrão de bandas mais complexo de que *M. anisopliae*.

A variabilidade em esterases de *M. anisopliae* por eletroforese foi analisada por Martinez et al. (1997), em dez isolados de diversos grupos taxonômicos de insetos. A análise eletroforética em gel de poliácridamida a 8,5% apresentou diferenças e similaridades entre estes isolados, e foi possível distinguir seis padrões diferentes, demonstrando um grande polimorfismo para o sistema de esterase em *M. anisopliae*.

Gillespie et al. (1998) investigaram a produção de proteinase subtilisina (PR1) e a enzima tripsina (PR2) de 19 isolados de *Metarrhizium* sp. em culturas líquidas e observaram a produção de PR1 após 72 horas e PR2 em muitas linhagens após 48 horas. St. Leger et al. (1996a) citaram que depois da celulose, a quitina é o polímero mais abundante encontrado na natureza e que os experimentos *in vitro* demonstraram o acúmulo e localização de quitinase durante o início da penetração na cutícula de inseto por fungo.

Braga et al. (1999) avaliaram o crescimento e a autólise de duas linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* através de meio contendo caseína ou glicose como fonte de carbono, determinaram como parâmetro para cada linhagem o coeficiente econômico e grau de autólise. A produção de protease foi

determinada pelo crescimento e fases de autólise das culturas sobre meios que propiciam a indução de proteases (meios contendo caseína como única fonte de carbono e nitrogênio). O fungo demonstrou utilizar com mais eficiência caseína do que glicose como única fonte de carbono e energia. Relataram que o aumento da atividade proteolítica variou significativamente (apresentando o seu maior crescimento no 5º dia e o mínimo no 16º dia) durante as várias fases de crescimento e autólise, demonstrando claramente que ocorreram diferenças entre as curvas de crescimento e a produção cinética da enzima, podendo afetar decisivamente o processo de seleção de linhagem por produção de protease.

Estudos comparativos entre os efeitos de fermento, estimulação química do sistema imune e a infecção fúngica sobre a atividade da fosfatase ácida (AcP) na hemolinfa de *Schistocerca gregaria* constataram a ocorrência de um aumento de AcP na hemolinfa do inseto, no 3º dia, após a inoculação de *Metarrhizium anisopliae* var. *acridum*, o que coincidiu com uma redução marcada por manchas positivas de AcP nos plasmatócitos e coagulócitos do inseto (XIA et al., 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Controle Biológico do Depto de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Morfologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

3.1. Material biológico utilizado

As oito linhagens de *Metarrhizium* utilizadas neste estudo foram fornecidas pelo CENARGEN-EMBRAPA, sendo seis de *Metarrhizium anisopliae* var. *acridum* (CG288, CG288c, CG434, CG434c, CG442, CG442c) e duas de *Metarrhizium flavoviride* var. *flavoviride* (CG291, CG291c). As linhagens CG288c, CG291c, CG434c e CG442c foram reisoladas de *B. microplus* (Tabela 1).

Os carrapatos da espécie *Boophilus microplus* foram obtidos na região do Sertão da Paraíba e da região Agreste de Pernambuco, coletados segundo Gonzales (1974) de bovinos naturalmente infectados e, em seguida, encaminhados para o Laboratório de Controle Biológico (UFPE).

Tabela 1. Linhagens de *Metarrhizium* spp. utilizadas nos estudos biológicos, exoenzimáticos e isoenzimáticos.

<i>Espécies</i>	<i>Código da Linhagem</i>	<i>Hospedeiro</i>	Origem Geográfica
<i>Metarrhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i>	CG291	<i>Austracnis guttulosa</i>	Austrália
<i>Metarrhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i>	CG291c ¹	<i>Austracnis guttulosa</i>	Austrália
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	CG288	<i>Schistocerca pallens</i>	Brasil
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	CG288c ¹	<i>Schistocerca pallens</i>	Brasil
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	CG434	<i>Mahanarva posticata</i>	Brasil
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	CG434c ¹	<i>Mahanarva posticata</i>	Brasil
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	CG442	<i>Zonocerus elegans</i>	Brasil
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	CG442c ¹	<i>Zonocerus elegans</i>	Brasil

¹ Linhagens reisoladas de *Boophilus microplus*.

3.2. Manutenção das linhagens de fungos

As linhagens de fungos foram mantidas em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) à temperatura ambiente de $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ do Laboratório de controle Biológico (UFPE) durante 15 dias e em seguida estocadas a 4°C em geladeira até o momento do uso.

3.3. Degradação da cutícula de *Boophilus microplus*

3.3.1. Obtenção da cutícula do carrapato

Os carrapatos passaram por um processo de assepsia e em seguida foram dissecados com o uso de tesoura de procedimento cirúrgico e lavados sucessivamente em água destilada autoclavada. A preparação cuticular foi obtida após homogeneização de 100 cutículas de carrapato por litro de solução de tetraborato de potássio a 1% segundo Andersen (1980).

3.4. Obtenção da quitina

A quitina foi obtida a partir de exosqueleto de camarão. Inicialmente os conídios foram desidratados ao sol durante uma semana. Em seguida, foram moídos e peneirados. A fração de pó de diâmetro médio 0,42 mm foi utilizada no processo de extração. Para se isolar esse polissacarídeo, três etapas foram requeridas: desmineralização, desproteínização e despigmentação, segundo Canella e Garcia (2001).

3.5. Atividade quitinolítica

Para determinação da atividade quitinolítica de *Metarrhizium* spp. foi utilizado o meio específico contendo a quitina de exosqueleto de camarão e a cutícula do carrapato como substrato, modificado de Hankin e Anagnostakis (1975). A quitina obtida conforme escrito no item 3.4 foi adicionada ao meio. Discos de micélio do fungo com 5mm de diâmetro foram inoculados em cinco placas contendo 20 mL do meio basal e incubadas por 12 dias, à temperatura ambiente de $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, visualizando-se zonas claras no ágar opaco ao redor das colônias, indicando degradação da quitina. A avaliação foi efetuada através da mensuração do halo de degradação do substrato, com o auxílio de régua milimetrada, onde se subtraiu o valor do diâmetro das colônias do diâmetro do halo.

3.6. Atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi determinada conforme preconiza Hankin e Anagnostakis (1975) através da utilização do meio basal específico contendo Tween 20 como substrato. Foram utilizadas cinco placas contendo 20 mL do meio basal para cada linhagem. Após a solidificação do meio, discos de micélio

de *Metarhizium* spp. de cinco mm de diâmetro, foram transferidos para o centro das placas, efetuando-se a incubação por 05, 10 e 15 dias à temperatura ambiente ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$) sob luz contínua. A avaliação seguiu a metodologia descrita no item 3.5.

3.7. Atividade proteolítica

A atividade proteolítica das linhagens de *Metarhizium* foi testada através da hidrólise da caseína em meio ágar-leite (SARATH et al., 1989). As placas foram inoculadas com um disco de micélio com cinco mm de diâmetro, retirado de colônias jovens, com cinco repetições para cada linhagem, e em seguida, incubadas durante 05 a 15 dias sob luminosidade contínua à temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. A avaliação foi a mesma descrita no item 3.5.

3.8. Atividade amilolítica

Discos de micélio do fungo com cinco mm de diâmetro foram transferidos para placas com meio basal específico adicionado com amido solúvel como substrato, com cinco repetições, sendo incubadas posteriormente a uma temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ sob luminosidade contínua por 05, 10 e 15 dias e adicionadas em cada placa 20 mL da solução de lugol para que ocorresse a detecção do substrato degradado, onde foi visualizado um halo de degradação amarelo ao redor da colônia. A avaliação foi efetuada como descrito anteriormente no item 3.5 e a atividade amilolítica determinada conforme Hankin e Anagnostakis (1975).

3.9 Aspectos biológicos de *Metarhizium* spp.

As linhagens foram cultivadas em meios sólidos (BDA, Massa de Arroz, Czapeck) em quantidades suficientes para 1 L de água destilada com pH 6,8 para avaliação dos parâmetros de crescimento micelial e produção de esporos. Para o peso da matéria seca foram utilizados os mesmos meios sem o ágar. Para todos os substratos se utilizou um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, 8x6x4.

3.9.1. Crescimento radial do micélio

Para obtenção do crescimento radial, discos com cinco mm de diâmetro dos fungos foram transferidos para o centro das placas de Petri com os diferentes meios. Em seguida, as placas de Petri foram incubadas à temperatura ambiente ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) e 55% de umidade relativa, em regime de luminosidade contínua. A avaliação do crescimento micelial foi realizada através de mensurações diárias do diâmetro das colônias, em sentido diametralmente opostos, com o auxílio de uma régua milimetrada e estabelecendo-se a média para cada repetição. As leituras foram realizadas a cada 24 horas, durante doze dias. As médias obtidas foram utilizadas na construção de um gráfico para cada linhagem nos diferentes meios. Foi determinada a velocidade média de crescimento, utilizando-se os dados obtidos em dois intervalos de tempo de incubação, conforme a fórmula de Lilly e Barnett (1951): $V_{mc} = C_2 - C_1 / T_2 - T_1$; onde: V_{mc} = Velocidade média de crescimento; C_1 = Crescimento no tempo (T_1); C_2 = Crescimento no tempo 2 (T_2), sendo o resultado expresso em mm/h.

3.9.2. Produção de esporos

Utilizou-se as mesmas culturas do experimento do item 3.9.1, após doze dias de inoculação, adicionando-se às placas de Petri, 20 mL da água destilada autoclavada e efetuando-se a raspagem dos conídios da superfície das mesmas, com o auxílio de uma escova de cerdas macias. Logo após, o material removido foi filtrado em três camadas de gaze, autoclavado e os conídios quantificados em Câmara de Neübauer.

3.9.3. Peso seco

Discos de micélio do fungo com cinco mm de diâmetro, de cada linhagem separadamente, foram retirados de culturas jovens e transferidos para frascos de Erlenmeyer de 150 mL, sendo um disco por frasco de Erlenmeyer, contendo 50 mL dos meios de cultura líquidos: BD, Czapek e Massa de Arroz, sem o ágar. Em seguida, foram mantidos sob luz contínua, à temperatura ambiente de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por doze dias. Os frascos de Erlenmeyer foram agitados manualmente duas vezes ao dia, para propiciar melhor uniformização de oxigenação e crescimento micelial. Com doze dias de incubação coletou-se o micélio por filtração da cultura de cada frasco de Erlenmeyer usando meia de nylon esterilizada. A massa micelial obtida foi acondicionada em caixa de papel alumínio, previamente secada, pesada, e acondicionada em estufa, a 53°C por 24 horas. O peso seco do micélio foi obtido por subtração do peso da matéria seca do peso da caixa de alumínio. Em todos os substratos se utilizou um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, $8 \times 3 \times 4$.

3.10. Caracterização isoenzimática de *Metarhizium* spp. em gel de poliacrilamida

3.10.1. Preparação dos extratos

O micélio crescido em meio líquido BD foi filtrado com o auxílio de uma bomba a vácuo em filtro de porcelana com papel de filtro esterilizado. Em seguida homogeneizou-se uma mistura composta de micélio e areia lavada na proporção de 1:1(p/v) e o tampão de extração 1:1(p/v) em relação a mistura areia lavada micélio. A trituração procedeu-se com almofariz e pistilo em banho de gelo, e a mistura homogeneizada foi transferida para tubos de centrífuga a 13.000g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante constituiu o extrato protéico que foi utilizado para estabelecer o perfil eletroforético. Os extratos protéicos foram mantidos em freezer até o momento do uso (método modificado de ALFENAS, 1998).

3.10.2. Determinação da concentração de proteína

Para a quantificação das proteínas, foi utilizado o método de Bradford, que consiste em estimar a concentração de proteínas nos extratos através da comparação com uma curva-padrão. Esta foi realizada utilizando-se albumina bovina cristalizada nas concentrações 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 ug por mL em tampão Tris-HCl, pH 6,8. Em tubos de ensaio adicionou-se 5 mL do reagente de Bradford (Azul Brilhante de Coomassie G250) como corante e 0,1 mL das soluções-padrão de albumina, homogeneizou-se e se determinou a densidade óptica denominada absorbância no comprimento de onda de 595nm. Em seguida foi traçada a curva-padrão (ALFENAS et al., 1991).

3.10.3. Preparação do gel de poliacrilamida e separação eletroforética

Foi preparado gel de poliacrilamida a 7,5% e a 12%, com 6,0 cm. Em seguida este material foi colocado entre duas placas de vidro separadas por um espaçador com dois mm de espessura. Após a polimerização do gel, os espaçadores foram retirados junto à placa superior, e o conjunto acondicionado numa cuba vertical de eletroforese modelo Mini V8, imerso no tampão de corrida do eletrodo tris-glicina com pH 8.9. Foram aplicados 20 µL a 50 µL das amostras dos extratos fúngicos nos poços do gel individualmente e como controle da migração eletroforética utilizou-se o corante azul de bromofenol a 0,25%. Ao final da aplicação das amostras foi iniciada a corrida com o uso da fonte GIBCO Life Technologies modelo 250 Eletroforeses Power Suply que foi calibrada para 100V, 150 mA e quando as amostras atingiram o gel separador, elevou-se a voltagem para 160V ficando a corrida em torno de 200 mA (ALFENAS, 1998; ALFENAS et al., 1991).

3.10.4. Coloração para detecção de proteínas totais, esterase, fosfatase ácida e superóxido dismutase, secagem e interpretação dos zimogramas

3.10.4.1. Proteínas Totais

Após a corrida eletroforética, o gel foi imerso na solução corante de “Coomassie blue” (0,1%) durante 12 horas. Posteriormente, a coloração das bandas de proteínas foi retirado o excesso de corante através de lavagens sucessivas do gel, em solução clareadora (na proporção 5:5:1; metanol, água destilada, ácido acético glacial) e fixada as bandas em fixador PAGE (45 mL de metanol, 10 mL de ácido acético glacial, 45 mL de água destilada) por 20 minutos (ALFENAS, 1998; ALFENAS et al., 1991).

3.10.4.2. Esterase

O gel de poliacrilamida foi revelado com 30 mL de α,β -naftil-acetato 1% em acetona a 50%, 100 mg de fast blue RR e 100 mL de Tris-HCl 0.05M em pH7.1. Em seguida, foi incubado a 30-38°C até que as bandas aparecessem, após aproximadamente cinco a 10 minutos e descartando-se a solução para fixar o gel em solução de glicerol a 10% (ALFENAS, 1998; ALFENAS et al., 1991).

3.10.4.3. Fosfatase Ácida

O gel foi imerso na solução composta por 100mg de α -naftil fosfato ácido de sódio, 100 mg de Fast Garnet GBC salt, 1 mL (ou 10mg) de $MgCl_2$ a 1% e 100 mL de tampão acetato de sódio 0.1M, pH5.0. Depois, foi incubado a 37°C até o aparecimento das bandas. A avaliação foi feita após 24h, descartando a solução e fixando o gel em glicerol a 10% (ALFENAS, 1998; ALFENAS et al., 1991).

3.10.4.4. Superóxido Dismutase

Após a corrida eletroforética, o gel para detecção de superóxido dismutase foi retirado da placa e imerso na solução de revelação (0,004g de riboflavina, 0,3g de EDTA0, 020g de MTT, 100 mL de Tris-HCl pH 8,5), incubado a 37°C até o aparecimento das bandas acromáticas e fixado em solução aquosa de glicerol a 10% (ALFENAS, 1998; ALFENAS et al., 1991).

Após a coloração e fixação os géis foram colocados entre folhas de papel celofane para secagem e conservação, sendo realizado em aproximadamente 48 horas, à temperatura ambiente de $30 \pm 2^\circ C$. A solução para secagem foi

composta por 100 mL de metanol, 20 mL de ácido acético, 80 mL de água destilada e 0,5 mL de glicerol (ALFENAS, 1998; ALFENAS et al., 1991).

A interpretação dos zimogramas foi feita de acordo com o número, posição e intensidade das bandas no gel. O cálculo da mobilidade relativa das bandas foi efetuado pela fórmula descrita por Alfenas et al. (1991): **$R_f = (d/D) \times 100$** , onde: d= distância percorrida pela molécula, D= distância percorrida pela linha do corante (controle).

4. RESULTADOS

4.1 Atividade quitinolítica em *Metarrhizium* spp. durante a degradação da cutícula de *Boophilus microplus*

A linhagem de *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291c), reisolada de *B. microplus* apresentou maior halo de degradação de quitina aos 12 dias de incubação tanto em meio contendo exosqueleto de camarão como em meio com cutícula de carrapato. Menor halo de degradação foi evidenciado por *M. anisopliae* var. *acridum* (CG434c) reisolada de *B. microplus* em meio contendo exosqueleto de camarão e *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291) em meio com cutícula diferiu estatisticamente das demais linhagens testadas. Todas as linhagens apresentaram maior halo de degradação em meio contendo a cutícula do carrapato, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Atividade quitinolítica de oito linhagens *Metarrhizium* spp. aos 12 dias de incubação em meios específicos contendo exosqueleto de camarão ou cutícula de *Boophilus microplus*

Linhagens de <i>Metarrhizium</i>	H a l o (c m)	
	<i>Exosqueleto de camarão</i>	<i>Cutícula de B. microplus</i>
<i>Metarrhizium flavoviride</i> var.		
<i>flavoviride</i> CG291	1,06 ¹ de A ²	1,57e A
<i>Metarrhizium flavoviride</i> var.		
<i>flavoviride</i> CG291c	2,59b B	4,51a A
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var.		
<i>acridum</i> CG288	1,67cde B	2,24de A
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var.		
<i>acridum</i> CG288c	2,14bc A	2,54cd A
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var.		
<i>acridum</i> CG434	1,42cde B	2,92bcd A
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var.		
<i>acridum</i> CG434c	0,99e B	3,50b A
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var.		
<i>Acridum</i> CG442	1,86bcd B	2,75bcd A
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var.		
<i>acridum</i> CG442c	1,04de B	3,16bc A

¹ Médias de quatro repetições² Médias seguidas de letra minúsculas diferentes, na linha e letras maiúsculas diferentes, na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de propabilidade

4.2 Atividade lipolítica em *Metarrhizium* spp.

A atividade lipolítica foi observada nas oito linhagens testadas no meio basal específico, através do halo de degradação aos 05, 10 e 15 dias conforme mostra a Tabela 3. *M. anisopliae* var. *acridum* (CG434c), reisolada de *B. microplus* apresentou o maior halo com 05 dias de crescimento e a linhagem *M. anisopliae* var. *acridum* (CG434) o maior halo de degradação aos 10 e 15 dias. *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291) demonstrou menor halo de degradação com 05 dias e *M. anisopliae* var. *acridum* (CG442) o menor halo aos 10 e 15 dias.

Tabela 3. Atividade lipolítica de oito linhagens de *Metarrhizium* spp. aos 05, 10 e 15 dias de incubação em meio específico contendo tween 20.

Linhagens de <i>Metarrhizium</i>	Diâmetro do halo (mm)		
	5 dias	10 dias	15 dias
<i>Metarrhizium</i> flavoviride var. flavoviride CG291	12,2 ¹ aB ²	19,2cAB	25,7dA
<i>Metarrhizium</i> flavoviride var. flavoviride CG291c	23,6aA	25,0aA	30,7aA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG288	21,6aB	36,5abA	45,0abA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG288c	23,9abB	33,5abAB	39,1aA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG434	19,6aB	44,7aA	49,8aA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG434c	25,1aA	27,0aA	33,7aA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG442	12,8aA	14,7cA	22,0dA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG442c	21,8bB	25,2abAB	34,4aA
CV=24,33%			

¹ Média de cinco repetições² Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3 Atividade proteolítica em *Metarrhizium* spp

Os resultados obtidos aos 05 dias demonstraram a formação de menor halo de degradação para *M. anisopliae* var. *acridum* (CG291) e *M. anisopliae* var. *acridum* (CG442c) reisolada de *B. microplus* foi a que apresentou a maior atividade enzimática em relação as demais aos 05, 10 e 15 dias de incubação (Tabela 4).

Tabela 4. Atividade proteolítica de oito linhagens de *Metarrhizium* spp. aos 05, 10 e 15 dias de incubação em meio específico

Linhagens de <i>Metarrhizium</i>	Diâmetro do halo (mm)		
	5 dias	10 dias	15 dias
<i>Metarrhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> CG291	2,6 ¹ bB ²	2,6dB	7,3dA
<i>Metarrhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> CG291c	6,3abC	19,2abB	29,2aA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG288	4,6bC	8,8cB	13,7cA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG288c	5,0abC	17,5abB	25,2abA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG434	4,5bB	5,1cdB	13,0cA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG434c	5,1abC	14,8bB	26,6abA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG442	5,8abC	15,1bB	21,8bA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG442c	10,1aC	22,0aB	29,7aA
CV=20,55%			

¹ Média de cinco repetições² Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.4 Atividade amilolítica em *Metarrhizium* spp

As Figuras 1e 2 e a Tabela 5 apresentam a atividade amilolítica das linhagens de *Metarrhizium* spp. testadas. *M. anisopliae* var. *acridum* (CG442c) reisolado de *B. microplus* foi o que apresentou o maior halo de degradação do amido ao 05,10 e 15 dias de incubação diferindo estatisticamente das demais linhagens aos 10 dias. *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291c) reisolado de *B. microplus* demonstrou menor crescimento seguido por *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291) e *M. anisopliae* var. *acridum* (CG442) aos 05 dias de incubação, não diferindo das demais linhagens estatisticamente. *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291) e *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291c) reisolado de *B. microplus* não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram os menores crescimentos aos 10 dias de incubação.

Tabela 5. Atividade amilolítica de oito linhagens de *Metarrhizium* spp. aos 05, 10 e 15 dias de incubação em meio específico.

Linhagens de <i>Metarrhizium</i>	Diâmetro do halo (mm) a		
	5 dias	10 dias	15 dias
<i>Metarrhizium</i> flavoviride var. flavoviride CG291	2,8 ¹ aA ²	2,14dA	3,9cdA
<i>Metarrhizium</i> flavoviride var. flavoviride CG291c	2,6aB	2,0dB	7,3dA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG288	3,8aC	10,18bB	18,16aA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG288c	4,6aC	8,8bB	13,7bA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG434	3,6aB	4,9cdB	11,0bcA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG434c	4,5aB	4,1cdB	13,0bA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG442	2,8aC	7,6bcB	17,6aA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG442c	5,8aC	15,1aB	19,8aA
CV=24,82%			

¹ Média de cinco repetições² Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

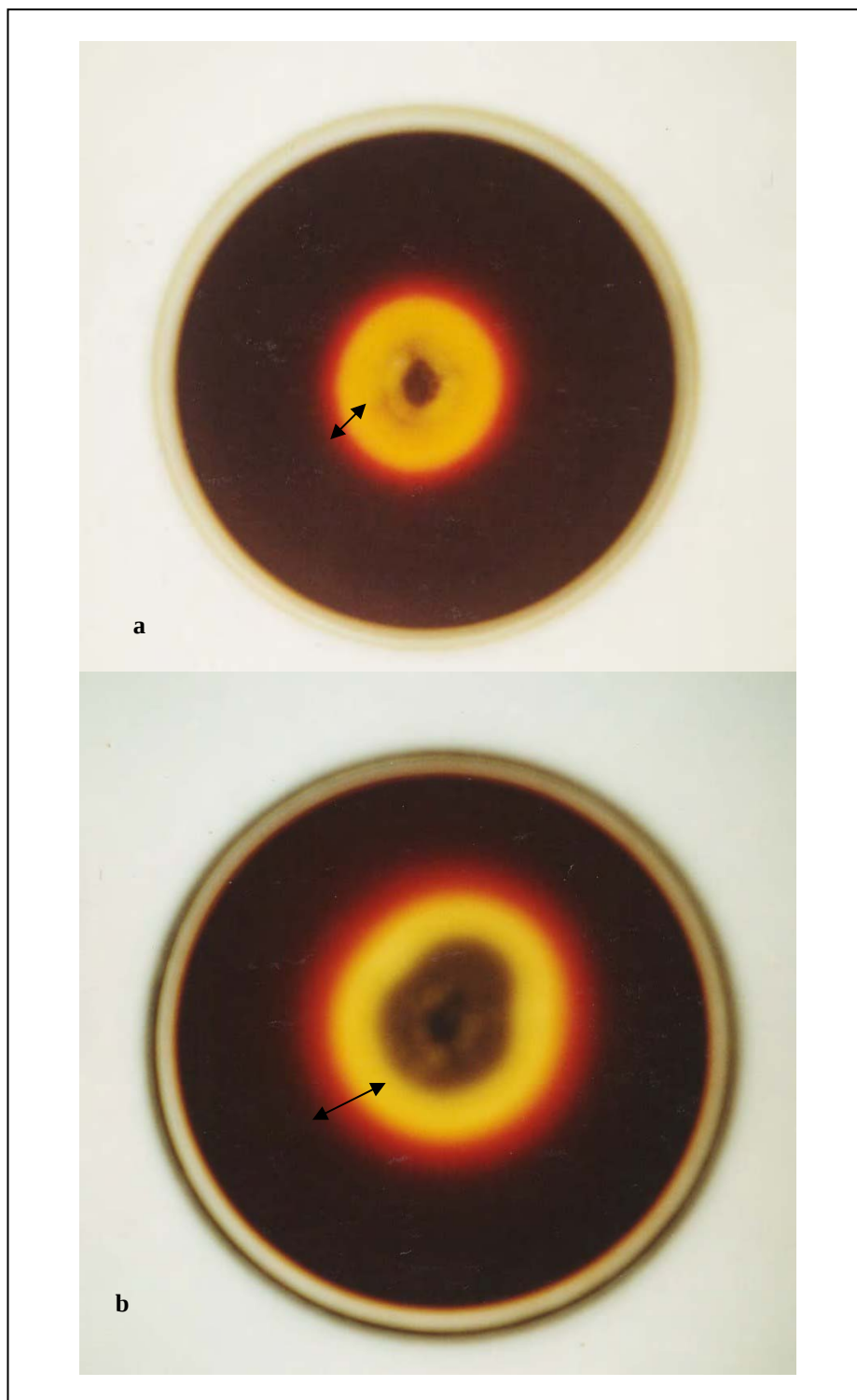


Figura 1. Halo de degradação (seta) do amido em *Metarrhizium anisopliae* var. *acridum* (CG442c) reisolada de *Boophilus microplus* (a) aos cinco dias e (b) aos 10 dias de incubação em meio de cultura específico.

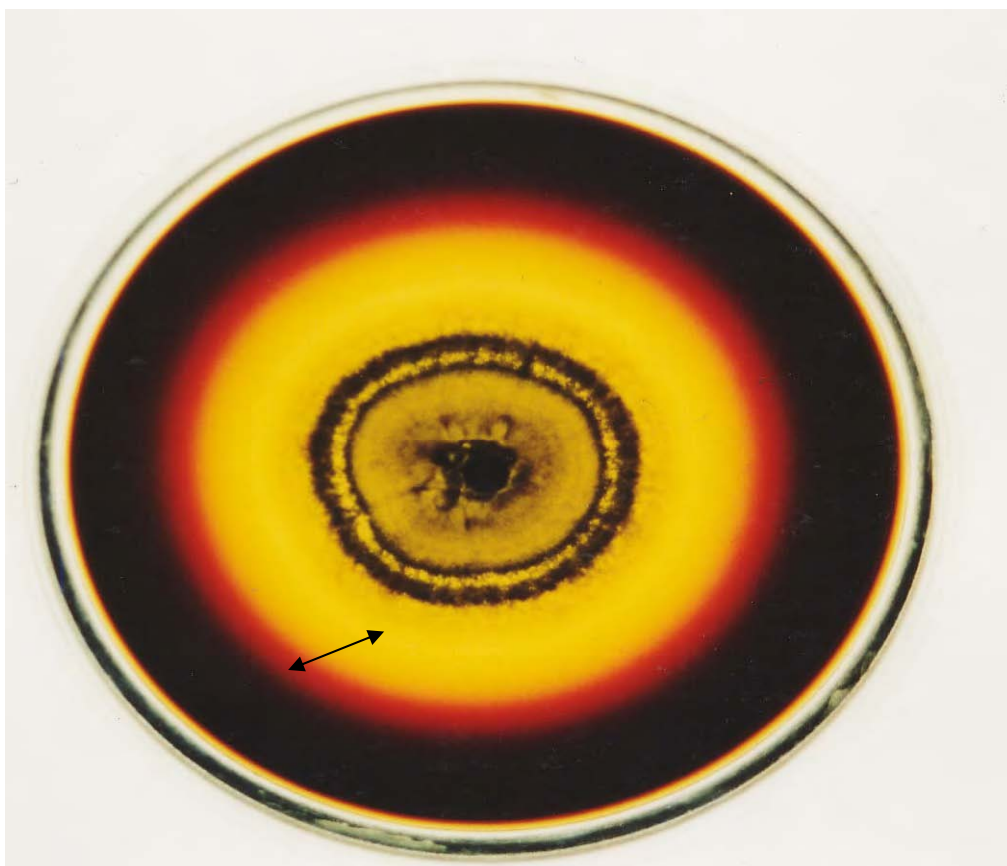


Figura 2. Halo de degradação (seta) de amido em *Metarrhizium anisopliae* var. *acridum* (CG442c) reisolada de *B. microplus* aos 15 dias de incubação.

4.5. Aspectos biológicos de *Metarrhizium* spp.

4.5.1 Crescimento radial

Os dados sobre o crescimento radial nos meios de cultura Czapek, Massa de Arroz e BDA encontram-se na Tabela 6. Foi observado que as linhagens *M. anisopliae* var. *acridum* (CG288) e *M. anisopliae* var. *acridum* (CG442c) reisolada de *B. microplus* apresentaram o menor crescimento em meio Czapek diferindo estatisticamente das demais linhagens. *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291c) reisolada de *B. microplus* apresentou maior crescimento em Czapeck. No meio Massa de Arroz, apresentaram o maior crescimento, as linhagens *M. anisopliae* var. *acridum* (CG434) e *M. anisopliae* var. *acridum* (CG434c) reisolada de *B. microplus* e o menor crescimento foi observado em *M. anisopliae* var. *acridum* (CG288) e *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291). Em BDA, *M. anisopliae* var. *acridum* (CG288) e *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291c) reisolada de *B. microplus* apresentaram crescimento inferiores às demais.

Tabela 6. Diametro de colônia de oito linhagens de *Metarrhizium* spp. em diferentes meios de cultura aos 12 dias de incubação.

Linhagem	Diâmetro de colônia (mm)		
	Czapeck	Massa de Arroz	BDA
<i>Metarrhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> CG291	51,00 ¹ abB ²	46,40c B	71,20aA
<i>Metarrhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> CG291c ³	56,10abA	49,10c AB	47,90bB
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG288	39,20c B	47,00c A	49,20bA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG288c	46,70bcB	75,80abA	75,60aA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG434	55,10abB	78,00a A	75,40aA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG434c	53,00abB	78,90abA	77,00aA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG442	50,40abB	77,10abB	70,50aA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG442c	40,20c C	71,50b B	79,80aA
CV=7.00%			

¹ Média de quatro repetições.

² Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

³ Linhagens reisoladas de *B. microplus*.

As velocidades de crescimento das oito linhagens de *Metarrhizium* spp. encontram-se na Tabela 7. A taxa de crescimento destas linhagens no intervalo de tempo compreendido entre o sexto e sétimo dia de crescimento, variou para cada meio de cultura testado. Em meio BDA, *M. anisopliae* var. *acridum* (CG442c) reisolada de *microplus* apresentou maior velocidade de crescimento e as menores foram evidenciadas por *M. anisopliae* var. *acridum* (CG288) e *M. anisopliae* var. *acridum* (CG434), diferindo estatisticamente das demais. No meio Massa de Arroz as linhagens apresentaram uniformidade no crescimento e em Czapeck, a maior velocidade de crescimento foi observada em *M. anisopliae* var. *acridum* (CG434), igual à linhagem *M. anisopliae* var. *acridum* (CG442).

Tabela 7. Velocidade média de crescimento de *Metarrhizium* spp. em diferentes meios de cultura entre o sexto e sétimo dia de incubação.

Linhagem	Taxa de crescimento (mm/h)		
	Czapeck	Massa de Arroz	BDA
<i>Metarrhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> CG291	0,02 ¹ b B ²	0,02aAB	0,03bcA
<i>Metarrhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> CG291c ³	0,02b A	0,02aA	0,03bcA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG288	0,02 abA	0,02aA	0,02bA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG288c	0,03abA	0,02aB	0,03bcA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG434	0,04a A	0,02aB	0,02c B
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG434c	0,02bAB	0,02aB	0,04b A
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG442	0,04abA	0,02aA	0,03bcA
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG442c	0,03abB	0,02aB	0,06a A
CV=34.85%			

¹ Média de quatro repetições, com o halo expresso em mm.

² Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

³ Linhagens reisoladas de *B. microplus*.

4.5.2 Produção de esporos

Foi observada a produção de esporos em todos os meios de cultura estudados conforme mostra a Tabela 8. Em meio Czapeck, *M. anisopliae* var. *acridum* (CG434c) reisolada de *B. microplus* apresentou a maior esporulação, diferindo estatisticamente das demais. Em meio de Massa de Arroz foi constatada a maior esporulação por *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291), e em meio BDA, *M. anisopliae* var. *acridum* (CG288c) reisolada de *B. microplus*.

Tabela 8. Esporulação de oito linhagens de *Metarrhizium* spp. em diferentes meios de cultura aos 12 dias de incubação.

<i>Linhagem</i>	<i>Média de esporulação (10⁸/mL)</i>		
	Czapeck	Massa de Arroz	BDA
<i>Metarrhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> CG291	3,40 ¹ b B ²	55,60a A	3,10c B
<i>Metarrhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> CG291c ³	10,20ab A	14,40bc A	20,10c A
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG288	9,00abAB	1,50c B	26,50c A
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG288c	3,00b B	15,60bc B	70,70b A
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG434	3,90b C	30,30b B	58,10b A
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG434c	31,10a A	11,90bc B	5,20c B
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG442	9,50ab A	10,00bc A	19,10c A
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG442c	4,80b C	13,00bc A	20,60c A
CV=28.23%			

¹ Média de quatro repetições² Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade³ Linhagens reisoladas de *B. microplus*.

4.5.3 Peso seco

Os dados obtidos mostram que houve variação no peso seco das linhagens nos diferentes meios de cultura. (Tabela 9). Em meio Czapeck, *M. anisopliae* var. *acridum* (CG288) mostrou menor peso e maior peso em *M. anisopliae* var. *acridum* (CG442), já em Massa de Arroz, as linhagens *M. anisopliae* var. *acridum* (CG288c) reisolada de *B. microplus* e *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291) apresentaram o menor peso e *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291c) reisolada de *B. microplus*) o maior peso. A linhagem *M. anisopliae* var. *acridum*

(CG442) e *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291c) reisolada de *B. microplus* apresentaram os maiores peso em meio BDA, não apresentando diferença estatisticamente significativa em relação as outras linhagens estudadas. A linhagem *M. anisopliae* var. *acridum* (CG288c) reisolada de *B. microplus* apresentou o menor peso seco em BDA.

Tabela 9. Peso seco de oito linhagens de *Metarrhizium* spp. em diferentes meios de cultura aos 12 dias de incubação.

<i>Linhagem</i>	<i>Peso seco (g) nos meios de cultura</i>		
	Czapeck	Massa de Arroz	BDA
<i>Metarrhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> CG291	0,46 ¹ b A ²	0,43aA	0,14aB
<i>Metarrhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> CG291c ³	0,37bc B	0,65aA	0,16aC
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG288	0,22c B	0,62aA	0,14aB
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG288c	0,42bc A	0,43aA	0,13aB
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG434	0,40bc A	0,45aA	0,15aB
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG434c	0,39bc A	0,45aA	0,15aB
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG442	0,68 ^a A	0,50aB	0,16aC
<i>Metarrhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> CG442c	0,50 ^a b A	0,45aA	0,14aB
CV=28.23%			

¹ Média de quatro repetições.

² Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

³ Linhagens reisoladas de *B. microplus*.

4.6 Caracterização protéica e isoenzimática de *Metarrhizium* spp. em gel de poliacrilamida

As linhagens de *Metarrhizium* spp analisadas por eletroforese mostraram um padrão variável em relação às bandas de proteínas totais e para as enzimas fosfatase ácida e esterase e simples para superóxido dismutase.

4.6.1 Perfil protéico total

Os resultados da análise do extrato protéico contido no micélio das oito linhagens de *Metarrhizium* spp. estão documentados na Tabela 10 e na Figura 3.

Foi observado um comportamento polimórfico em relação às bandas de proteínas totais, sendo reveladas bandas com intensidade forte, média e fraca em diferentes regiões do gel, que variaram em número de um a oito, predominando o número de cinco bandas. Os valores de mobilidade relativa (Rf), das bandas protéicas mostraram bandas em comum produzidas pelas linhagens e localizadas em diferentes regiões do gel.

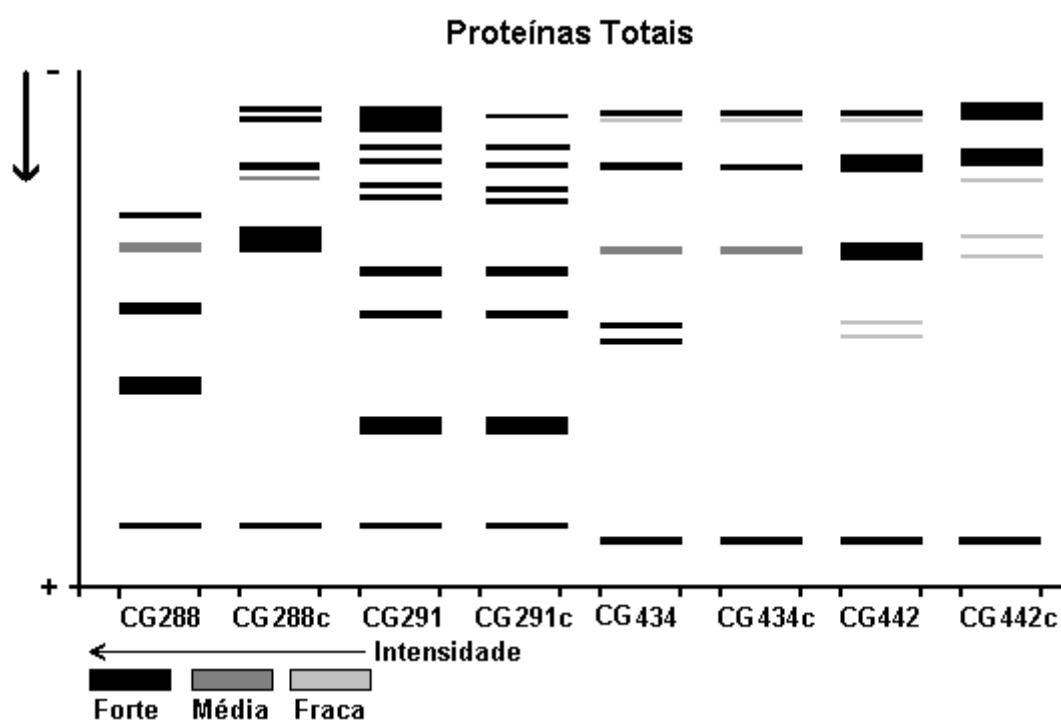


Figura 3. Eletroferograma de proteínas totais de oito linhagens de *Metarrhizium* spp. em gel de poliacrilamida (12%).

Tabela 10. Mobilidade relativa de proteínas totais em gel de poliacrilamida de oito linhagens de *Metarrhizium* spp.

Regiões do gel	Mobilidade relativa (Rf)							
	CG288	CG288c	CG291	CG291c	CG434	CG434c	CG442	CG442c
1								
2					2,12	2,12	2,12	2,12
3		2,22						
4					4,25	4,25	4,25	
5		4,44						
6				6,38				
7			6,66					
8				10,63				
9			11,11					
10								12,76
11							14,89	
12			15,55					
13					15,95	15,95		
14		16,66						
15				17,02				
16								18,08
17		20,00						
18				20,21				
19			21,11					
20				23,40				
21			24,44					
22	31,81							
23								36,17
24					38,29	38,29	38,29	
25	38,63							
26		40,00						
27								40,42
28				43,61				
29			45,55					
30				55,31				
31	56,81							
32					57,44		57,44	
33			57,77					
34					61,70		61,70	
35				74,46				
36			77,77					
37	79,54							
38		95,55	95,55					
39				95,74	95,74	95,74	95,74	95,74
40	97,72							

4.6.2 Atividade esterásica

Os padrões de esterase das diferentes linhagens estão representados pelo eletroferograma da Figura 4 e pela mobilidade relativa mostrada na Tabela 11.

As linhagens apresentaram polimorfismo com bandas em comum reveladas em diferentes regiões do gel. *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291) e *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291c) reisolada de *B. microplus* apresentaram fenótipos iguais com relação à esterase, com apenas uma banda monomórfica de mesma intensidade e posição no gel. Expressões fenotípicas semelhantes foram evidenciadas entre *M. anisopliae* var. *acridum* (CG434), *M. anisopliae* var. *acridum* (CG442c) reisolada de *B. microplus*, bem como entre *M. anisopliae* var. *acridum* (CG 434c) reisolada de *B. microplus* e *M. anisopliae* var. *acridum* (CG442).

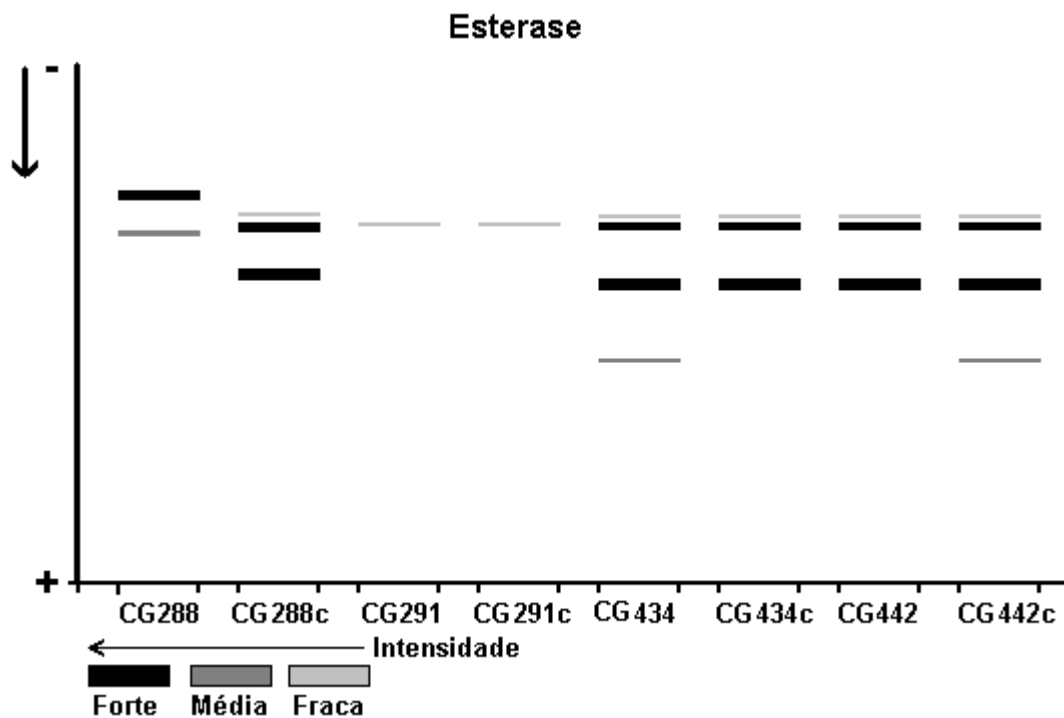


Figura 4. Eletroferograma de esterase de oito linhagens de *Metarrhizium* spp. em gel de poliacrilamida (12%).

Tabela 11. Mobilidade relativa de esterase em gel de poliacrilamida de oito linhagens de *Metarrhizium* spp..

Regiões do gel	Mobilidade relativa (Rf)							
	CG288	CG288c	CG291	CG291c	CG434	CG434c	CG442	CG442c
1	25,53							
2					26,92		26,92	26,92
3						27,45		
4		28,57						
5			29,41	29,41				
6					29,80		30,76	30,76
7						31,37		
8		31,63						
9	34,04							
10								41,34
11					44,23		44,23	
12		44,89						
13						45,09		
14					61,53			61,53

4.6.3 Atividade de fosfatase ácida

A Figura 5 mostra o sistema de fosfatase ácida presente no micélio das 8 linhagens estudadas. Foi evidenciado a presença de 7 padrões de bandas de intensidade forte, média e fraca com predominância de bandas fracas. A mesma expressão fenotípica foi evidenciada entre *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291) e *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291c) reisolada de *B. microplus*, com as bandas apresentando mesma intensidade e mobilidade relativa no gel, conforme mostra a Tabela 12. O sistema de fosfatase ácida apresentou 24 regiões diferentes.

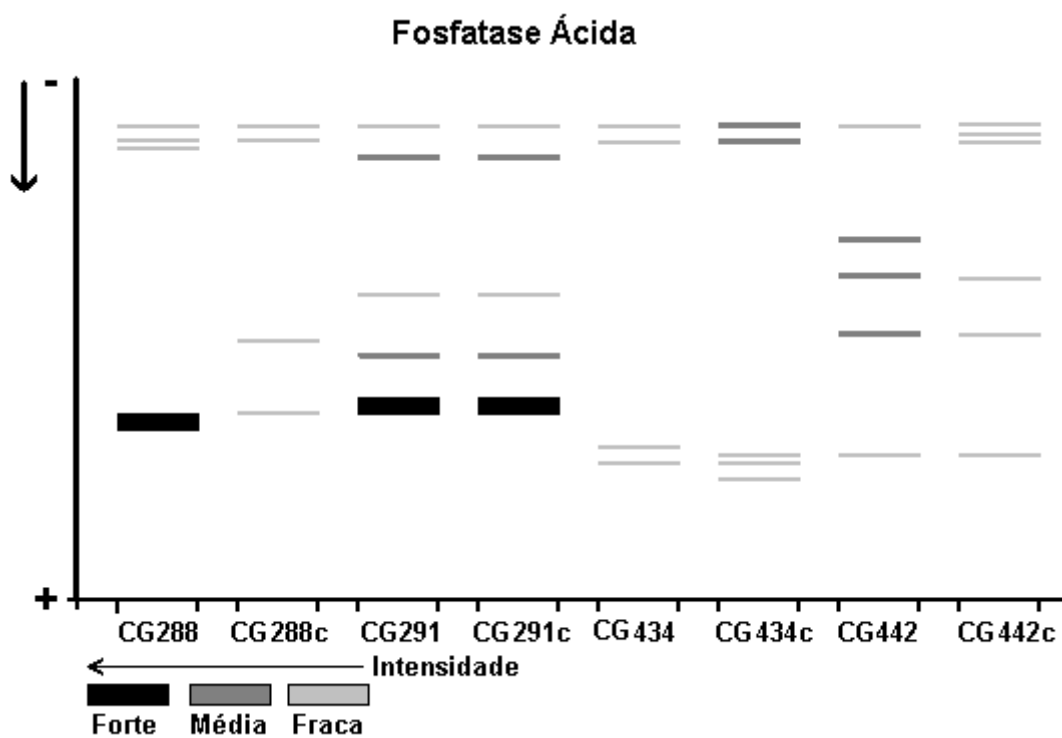


Figura 5. Eletroferograma de fosfatase ácida de oito *Metarrhizium* spp., em gel de poliacrilamida (12%).

Tabela 12. Mobilidade relativa de fosfatase ácida em gel de poliacrilamida de 8 linhagens de *Metarrhizium* spp.

Regiões do gel	Mobilidade relativa (Rf)							
	CG288	CG288c	CG291	CG291c	CG434	CG434c	CG442	CG442c
1	2.08	2.08	2.08	2.08	2.08	2.08	2.08	
2								2,12
3								4.25
4	6.25	6.25				6.25		
5								6.38
6					7.29			
7	8.33							
8			10.41	10.41				
9							31.25	
10							41.66	
11								42.55
12			45.83	45.83				
13							56.25	
14								57.44
15		58.33						
16			61.45	61.45				
17			75.00	75.00				
18		77.08						
19	79.16							
20					85.41			
21						87.50	87.50	
22								89.36
23					89.58	89.58		
24						93.75		

4.6.4 Atividade de superóxido dismutase

O perfil eletroforético nas condições adotadas para este estudo, não detectou o sistema superóxido dismutase em *M. anisopliae* var. *acridum* (CG434), *M. anisopliae* var. *acridum* (CG434c) reisolada de *B. microplus*, *M. anisopliae* var. *acridum* (CG442) e *M. anisopliae* var. *acridum* (CG442c) reisolada de *B. microplus* e a presença de dois padrões de bandas entre *M. anisopliae* var. *acridum* (CG288), *M. anisopliae* var. *acridum* (CG288c) reisolada de *B. microplus*, *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291) e *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291c) reisolada de *B. microplus* (Figura 6). Foi observado a predominância de bandas de intensidade forte nas linhagens 288, 291 e 291c. Os valores de mobilidade relativa mostrados na Tabela 13 evidenciaram bandas em comum produzidas em *M. anisopliae* var. *acridum*

(CG288), *M. anisopliae* var. *acridum* (CG288c) reisolada de *B. microplus*, *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291) e *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291c) reisolada de *B. microplus* e localizadas em diferentes regiões do gel. Foi evidenciado em *M. anisopliae* var. *acridum* (CG288c) reisolada de *B. microplus*, *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291) e *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CG291c) reisolada de *B. microplus* uma banda de mesma mobilidade relativa e intensidade.

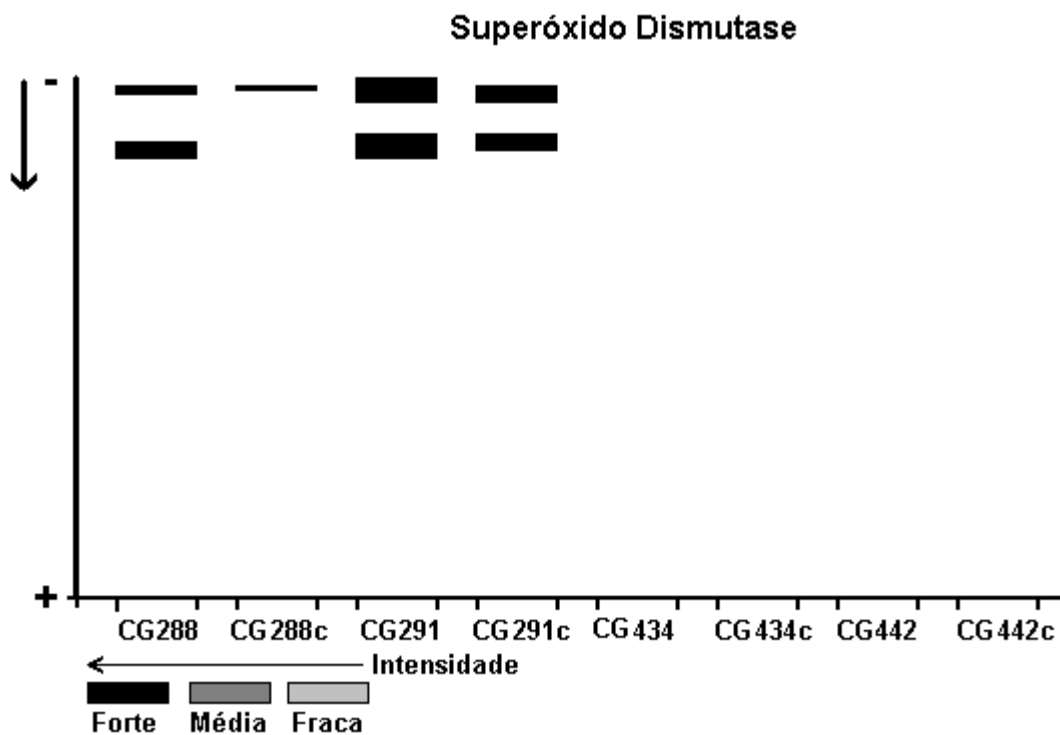


Figura 6. Eletroferograma de superóxido dismutase de oito linhagens de *Metarrhizium* spp. em gel de poliacrilamida (12%).

Tabela 13. Mobilidade relativa de superóxido dismutase em gel de poliacrilamida de oito linhagens de *Metarrhizium* spp..

Regiões do gel	Mobilidade relativa (Rf)							
	CG288	CG288c	CG291	CG291c	CG434	CG434c	CG442	CG442c
1	2,56							
2		2,63	2,63	2,63				
3	17,94							
4				18,42				
5			21,05					

5. DISCUSSÃO

5.1. Atividade quitinolítica

A penetração dos fungos através da cutícula dos insetos envolve um mecanismo de adesão via apressório (St LEGER et al., 1991) e outro via produção de várias enzimas extracelulares que atuam na degradação ativa durante o processo de penetração no hospedeiro (ROSATO et al., 1981; St LEGER et al., 1986a, 1986b, 1986c; 1986d). Experimentos *in vitro* utilizando cutícula de carrapato e exosqueleto de camarão como substrato mostraram que *M. flavoviride* var. *flavoviride* e *M. anisopliae* var. *acridum* foram capazes de produzir quitinase. Das oito linhagens testadas todas apresentaram níveis variados de atividade quitinolítica, sendo que tanto o substrato exosqueleto de camarão quanto o substrato cutícula de carrapato, o maior nível foi apresentado por *M. flavoviride* var. *flavoviride* CG291c (Tabela 2). Esses resultados comprovam que os fungos entomopatogênicos produziram esta enzima ao promoverem a degradação da cutícula do artrópode. Os resultados obtidos em meio com cutícula de carrapato apontam a alta produção de quitinase induzida por este substrato frente a quitina obtida de outro artrópode. Neste sentido é necessário que se desenvolvam estudos utilizando diferentes exosqueletos como uma maneira de se detectar linhagens fúngicas mais patogênicas às pragas de interesse veterinário e agroindustrial. Estudos desenvolvidos com outros grupos de fungos quanto à produção de quitinase em meio sólido foram investigados em relação à produção de várias enzimas, dentre as quais a quitinase (St Leger et al., 1996a). Os autores investigaram o número e tipos de enzimas quitinolíticas produzidas por *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *B. bassiana* e concluíram que cada espécie produziu uma variedade de N-acetil- β -D-chitobioses durante o crescimento em meio contendo cutícula de inseto e que *M. flavoviride* também produziu 1,4- β -quitobiosidases. El-Sayed et al. (1989) correlacionaram a atividade quitinolítica com a virulência, utilizando linhagens selvagens e

mutantes de *Nomuraea rileyi*, outro fungo entomopatogênico, empregado no controle de *Nezaria viridula*, o percevejo da soja e *Anticarsia gemmatilis*, lagarta da soja (ALVES, 1998). Constataram que as linhagens virulentas produziram altos níveis de quitinase durante a penetração do fungo no hospedeiro.

5.2 Atividade lipolítica

As lipases também atuam no processo de penetração dos fungos, principalmente nos entomopatogênicos na fase de adesão no hospedeiro, antes mesmos da emissão do tubo germinativo dos conídios, liberando enzimas e favorecendo o processo de nutrição entre o agente e o hospedeiro (ROBERTS et al., 1987; ALVES, 1998; PUPIM et al., 2000). Nas condições do trabalho, foi detectada a atividade lipásica em todos os micélios das 8 linhagens de *Metarrhizium*, aos 15 dias de incubação. A linhagem CG434 (*M. anisopliae* var. *acridum*) apresentou maior atividade lipásica, a partir do décimo dia de incubação ao contrário da linhagem CG 434c (*M. anisopliae* var. *acridum* reisolada de *B. microplus*) provavelmente a fisiologia da linhagem citada anterior foi modificada ativando a produção de lipase nos primeiros dias de incubação o que levou a atingir sua fase estacionária rapidamente, diminuindo a produção durante os demais dias. A importância das enzimas na interação fúngica com o hospedeiro despertam em muitos pesquisadores o interesse em compreender a dinâmica que envolve a produção e ativação das enzimas nos mais variados grupos de fungos. Estudando a produção de amilase em meio sólido, o mesmo utilizado neste trabalho, Alves et al (2002) detectaram a produção de lipase em 56 isolados de *Mucor*. Já Roberts et al. (1987) detectaram a produção de lipase por fungos quando observaram sua produção em 23 isolados fúngicos liofilizados e dois isolados que não sofreram o processo de liofilização. A maior atividade foi observada nos filtrados de fungos liofilizados. A produção de lipase extracelular também foi detectada por Rapp e Backhaus (1992) em culturas submersas, em

meio basal com 1% de óleo de oliva, a partir de fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Onde as espécies de *Rhizopus* foram as maiores produtoras de lipase após 96 h de crescimento, seguidas por *Fusarium oxysporum* f sp *casinfectum* após 220 horas de crescimento. Oliveira (1999) investigou a atividade lipolítica em 15 isolados de fungos obtidos do cajueiro, testados no qual destacaram *F. moniliforme* e *Colletotrichum gloesporioides* que foram considerados pelo autor como endofítico e fitopatógeno respectivamente. De acordo com as investigações de Knight et al. (2000), a lipase de *F. solani* FS1 foi imobilizada através da atração covalente em gotas de poliacrilamida e sobre Dacron magnetizado, restando 12 e 97% de atividade respectivamente. Investigações comparativas foram desenvolvidas por Pupin et al. (2000) em dois estágios de crescimento, em conídios (C) e micélio (M), com dois meios de cultivo (meio mínimo MM e meio completo MC), em 12 linhagens de *M. anisopliae* das quais duas dessas, são *M. anisopliae* var. *majus*. As linhagens investigadas por Pupin et al. (2000) apresentaram similaridades nas percentagens de lipídios totais, no entanto, a proporção do conteúdo de lipídios nos conídios e micélio que foram cultivados em MM e MC mostraram diferenças significativas entre os meios, ao nível de 5% pelo teste de Tukey tanto para o micélio quanto para os conídios indicando variabilidade na produção de lipídios totais durante o crescimento. A atividade variável de lipase também indica alto nível de diversidade entre as linhagens estudadas (Tabela 3), confirmando os resultados anteriormente expostos.

5.3 Atividade proteolítica

Os fungos entomopatogênicos são hábeis em produzir protease em substratos específicos *in vitro* e durante a colonização, degradando as proteínas que compõem a cutícula do hospedeiro (BRAGA et al., 1994; St LEGER et al., 1997; VALADARES-INGLIS; AZEVEDO, 1997; BRAGA et al., 1999). Nesse trabalho foi observada a atividade proteolítica em meio basal sólido, aos 05, 10 e 15 dias de incubação, nas 8 linhagens de *Metarrhizium* spp testadas, à temperatura

de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. A atividade proteolítica destas linhagens tem sua importância quando se aponta que as proteases secretadas estão evidenciadas no processo de degradação da cutícula durante a penetração no inseto e por também estar correlacionada com o processo de infecção. St Leger et al. (1987a; 1987c) descreveram a presença das proteases Pr1 e Pr2 durante a degradação da cutícula de insetos por *M. anisopliae* e correlacionaram a presença dessas proteínas com a virulência sobre vários insetos (GOETTEL et al., 1989; GILLESPIE et al., 1998). Todas as linhagens de *Metarrhizium* spp. (Tabela 4) reisoladas de *B. microplus* demonstraram maiores atividades, o que indica que a protease contida na cutícula do carrapato ativou a produção da enzima, conseqüentemente, estas linhagens devem expressar um melhor resultado quando utilizadas no controle desta praga. Os resultados obtidos nesse estudo quanto à detecção desta atividade, foram encontrados em outros fungos filamentosos, por Alves et al (2002) quando detectaram 82% de protease em meio sólido em 56 isolados de *Mucor*. Andrade et al (2002) trabalharam com *Mucor circinelloides* utilizaram D-glicose, em diferentes concentrações (40, 60 e 80g/L) como substrato para a detecção de proteases e confirmaram que a atividade enzimática aumentou quando a concentração do substrato foi reduzida para 40 g/L. Nas investigações realizadas por Bidochka e Khachatourians (1994) com relação a adsorção das proteases de *M. anisopliae*, *V. lecanii* e *B. bassiana* sobre a cutícula de insetos, os resultados sugeriram que as proteases produzidas por *M. anisopliae* e *V. lecanii* foram similares em suas propriedades de adsorção.

A atividade de protease também foi observada em duas linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, com a produção de proteína determinada através das fases de crescimento e autólise das culturas sobre meio em condições de indução de protease (na presença de caseína como única fonte de carbono e nitrogênio) (BRAGA et al., 1999), com a produção variando significativamente durante as várias fases de crescimento e autólise. A degradação de um amplo espectro de proteínas, com relevância a elastina e micina, foi evidenciado por St Leger et al. (1997), em *M. anisopliae*, *Verticillium lecanii* e *B. bassiana* através da habilidade

que estes fungos apresentaram em produzir halo de degradação em meio ágar contendo substratos adequados. Por outro lado, Cardoso et al. (2001) nas investigações para o controle de *Hypothenemus hampei* com fungos, quantificaram as proteinases totais através de espectrofotometria dos isolados Bb9620 (monospórico) e Bb9205 (multispórico) de *Beauveria bassiana* e os isolados Ma 9303 (monospórico) e Ma 9236 (multispórico) de *M. anisopliae*. Demonstraram que os picos de atividade máxima de proteinases totais ocorreram entre o primeiro e segundo dias de incubação e que esta atividade nos isolados de *M. anisopliae* foi altamente significativa quando comparada com os isolados de *B. bassiana*. A importância da proteinase foi indicada para o mecanismo de infecção inicial do fungo sobre a cutícula de *H. hampei*. Contudo, outros trabalhos podem evidenciar a relação entre a infecção do fungo e a proteína, nesse contexto, Song et al. (2002) investigaram o efeito da infecção de *M. anisopliae* sobre o número de hemócitos e de proteína solúvel na hemolinfa das larvas de 3ª e 4ª instar de *Dendrolimus punctatus*. Observaram que entre o primeiro e o quarto dia após a infecção, a quantidade de hemócito total e a concentração de proteína solúvel na hemolinfa foram significativamente mais altas nas larvas infectadas quando comparadas com as não infectadas, e que os resultados obtidos usando eletroforese em gel de poliacrilamida no terceiro, quarto e sexto dia após a infecção revelaram que *M. anisopliae* afetou o metabolismo das proteínas no hospedeiro e que a atividade de peroxidase foi diminuída.

5.4 Atividade amilolítica

Todas as linhagens estudadas apresentaram halo de degradação, produzindo assim amilase, em pH de 6,8 e à temperatura de $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Embora apresentando uma temperatura e pH diferenciados, dos descritos por outros autores. É conhecida a importância do pH na expressão fisiológica dos fungos, se testado em condições de temperatura e pH diferentes possivelmente as linhagens

de *Metarhizium* não apresentariam uma produção de amilase tão significativa. A produção de amilase foi investigada em outros fungos filamentosos como pode ser constatada por Domingues e Peralta (1993), embora tenham trabalhado com fungos filamentosos do solo, através de sua habilidade de produzir amilase em meio líquido ou semi-sólido com farelo de trigo. Esses autores selecionaram e identificaram uma linhagem de *A. fumigatus* que demonstrou atividade enzimática para α -amilase e glucoamilase, em pH de 6.0 e temperatura de 50°C. Roberts e Messing-Al-Aidross (1985) investigaram *in vitro*, os efeitos da virulência de *M. anisopliae* contra o *Culex*, através da atividade de amilase, protease e lipase, concluíram que todas essas enzimas têm importante efeito sobre a virulência neste mosquito. Valadares-Inglis e Azevedo (1997) demonstraram a segregação de amilase em linhagens recombinantes de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e concluíram que ocorre diferenças significativas durante a segregação dessa enzima entre recombinantes e parentais. Resultados semelhantes aos obtidos nesse trabalho com relação a atividade de amilase em meio sólido em *M. anisopliae* var. *anisopliae*, foram encontrados por Valadares e Azevedo (1996). A atividade de amilase em meio sólido também foi investigada em 56 isolados de *Mucor* por Alves et al. (2002) que detectaram a produção em 84% dos isolados. Esses resultados comprovam a frequente habilidade dos fungos entomopatogênicos em produzirem amilase.

5.5 Aspectos biológicos de *Metarhizium* spp

5.5.1 Crescimento Radial

O crescimento radial demonstrado pelas linhagens de *Metarhizium* spp em BDA, assemelham-se com os dados obtidos por Ferreira (2000) quando testou o crescimento de *B. bassiana* (CL1), *M. anisopliae* (PL43) e *M. flavoviride* (BR) em meio BDA em diferentes temperaturas (25°, 28° e temperatura ambiente =

28°± 2°C), e observou que a temperatura ambiente foi a que propiciou o maior crescimento. A temperatura é um fator importante para se evidenciar o bom desenvolvimento das colônias fúngicas, seu efeito foi estudado por Fargues et al. (1997) assim como o crescimento linear de isolados de *B. bassiana*, isolado de Coleoptera, Lepdoptera e Orthoptera de diferentes regiões e observaram que a temperatura ótima variava entre 20 e 30°C. Já Inglis et al. (1999) estudaram a influência da temperatura na competitividade e colonização do gafanhoto migratório por *B. bassiana* e *M. flavoviride* e constataram que o crescimento desses fungos variou entre 25 a 40°C. Sendo que *M. flavoviride* foi superior ao de *B. bassiana* contra esses insetos, nas condições de oscilação de temperaturas.

5.5.2 Produção de esporos

Os dados obtidos permitiram estabelecer a produção de conídios nos diferentes meios empregados, durante 12 dias, entre eles, a Massa de Arroz, o qual foi testado pela primeira vez, em trabalhos científicos, como substrato para estudo do comportamento de fungos *in vitro*. A Massa de Arroz apresentou dados bastante promissores e sendo um substrato de baixo custo, poderá ser usado em laboratório, para manutenção de fungos entomopatogênicos. Os resultados apresentados assemelham-se a maior esporulação de *Metarrhizium* spp em BDA, como já foi constatado por Ferreira (2000) quando realizou estudos com duas diferentes linhagens de *Metarrhizium* spp. (*M. anisopliae* PL43 e *M. flavoviride* BR). Entretanto, nos trabalhos de Ribeiro (1997) e Vilas Boas et al. (1996), que desenvolveram estudos com espécies de *Metarrhizium*, o substrato descrito para a produção de pré-inóculo é o arroz parboilizado. Já Lima (2000), embora tenha trabalhado com fungo fitopatogênico, estudou o comportamento de isolados de *Colletotrichum graminicola* nos meios BDA, MDA (fubá de milho, dextrose, ágar), ADA (aveia em flocos, dextrose, ágar) e V-8 (suco V-8, ágar, CaCO₃) com o meio ADA sendo o mais favorável para o processo fisiológico. Logicamente deve-se levar em consideração que Lima (2000) realizou estudos com um fungo

que apresenta características genéticas distintas das demonstradas pelas linhagens de *Metarrhizium* spp.. Trabalhos relacionados com a esporulação de *M. anisopliae* var. *acridum* e *B. bassiana* quanto as condições ambientais de umidade foram constatados por Magalhães et al. (2000) em cadáveres de *R. schistocercoides*, com *M. anisopliae* var. *acridum* produzindo mais conídios que *B. bassiana* em umidade relativa de 53% e 75% internamente e com estas mesmas umidade relativa externamente conídios não foram produzidos. O efeito da temperatura e umidade relativa sobre a esporulação de *M. anisopliae* var. *acridum* em cadáveres de *S. gregaria* foram analisados em laboratório por Arthurs e Thomas (2001) que observaram a produção conidial em condições constantes após 10 dias, com umidade relativa acima de 96% e temperaturas entre 20° e 30°C.

Com uma abordagem diferenciada das que se submeteram neste estudo, mas, realizando investigações com linhagens de *Metarrhizium* spp., também foram desenvolvidos estudos com linhagens de *M. anisopliae* (M337, M103, M104, M115, M335 e M336) em culturas submersas por Song (2001), com a produção de conídios via esporogênese microcíclica. A esporulação da linhagem M337 foi observada no meio contendo vários elementos nutritivos, onde várias fontes de carbono e nitrogênio afetaram a produção de conídios submersos. A glicose, o amido solúvel e a lactose foram efetivos para que ocorresse a esporulação, assim como as fontes ideais de nitrogênio foram o pó de amendoim, extrato de levedura e peptona. Na literatura especializada encontram-se investigações realizadas com *M. anisopliae* e outros fungos conhecidos como entomopatogênicos. Que assemelham-se aos dados desse trabalho, no que se refere à produção de esporos destacaram-se mais no substrato BDA para *M. anisopliae*. As investigações realizadas por Kampe e Bidochka (2002) também demonstraram a produção de esporos por *M. anisopliae* (A-1b, MAA1-2iii, Ma2575 e HAA2-2b), *B. bassiana* (Bb252) e *Verticillium lecanii* (V1 973) em vários tipos de ágar comercializado. As linhagens de *M. anisopliae* e *B. bassiana* apresentaram grande produção de esporos sobre o meio contendo batata dextrose ágar enquanto *V. lecani* em extrato de levedura peptona dextrose ágar.

5.5.3 Peso da matéria seca

Entre os meios testados, foi constatado melhor peso da matéria seca em BDA, ocorrendo variação no peso das oito linhagens nos diferentes meios, sugerindo que não tenha ocorrido a exaustão total dos nutrientes que compoem os meios de cultivo, o que indica que os meios testados, poderiam propiciar uma massa maior quando avaliado em período maior de tempo pré-estabelecido. O peso da matéria seca foi investigado também por Braga et al. (1999), quando observaram a autólise das duas linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* atingindo cerca de 62,7% de massa seca produzida e iniciada logo após o esgotamento da fonte de carbono. Poucos são os trabalhos descritos na literatura, que abordam os aspectos relacionados com o peso de matéria seca, com fungo entomopatogênico. Todavia, Lima (2000) também investigou a produção da massa seca, em diferentes isolados de *C. graminicola*, um fungo fitopatogênico. Em outras condições de estudo a influência da fonte de carbono foi analisada em fermentação no estado sólido por Domenech et al. (2000) com *M. anisopliae* que utilizaram as concentrações de 15, 20, 25 30, 35, 40 e 45g de carboidratos para cada 100g de matéria seca fúngica. No sétimo dia de fermentação foi obtida uma concentração máxima de esporos que correspondeu a $3,79 \times 10^9$ de esporos/100g de matéria seca. Foi determinado também a relação entre a umidade e a atividade da água e se observou que o aumento da quantidade de açúcar reduziu a atividade de água no meio de cultivo.

5.6 Caracterização isoenzimática de *Metarhizium* spp em gel de poliacrilamida

5.6.1 Padrão protéico

Os resultados obtidos neste estudo no que concerne às diferenças apresentadas nos padrões de bandas, demonstram o grande polimorfismo

evidenciados entre as linhagens de *Metarrhizium* spp.. Embora trabalhando com o mesmo fungo, mas, com linhagens e em condições diferenciadas, Gorinstein et al. (1996) encontraram resultados contraditórios quanto aos padrões de bandas entre dois isolados de *M. anisopliae* (M5 e M12), e concluíram existir similaridades no peso molecular de suas bandas. No entanto, a amplitude de padrões protéicos foi confirmada por St Leger et al (1995) quando analisaram as proteínas extracelulares totais através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) do isolado ME1 de *M. anisopliae* observando um número amplo de proteínas, quando o fungo cresceu sobre a cutícula do gafanhoto e uma menor quantidade de bandas foi detectada em meio crescendo sem a cutícula, os autores citaram ainda que existiam evidências de que muitas proteínas eram induzidas especificamente durante o crescimento sobre a cutícula. Mesmo as linhagens deste experimento não tendo sido avaliadas durante seu crescimento sobre a cutícula de *B. microplus* demonstraram uma amplitude em seus padrões de bandas (Figura 3). Estudos direcionados para o melhoramento genético foram desenvolvidos por St Leger et al. (1996b) através da obtenção de cópias adicionais do gene que codifica a protease (Pr1) regulada para degradar a cutícula de inseto. Estas cópias foram inseridas dentro do genoma de *M. anisopliae* para cada Pr1 que foi constitutivamente produzida sobre a hemolinfa de *Manduca sexta*, ativando o sistema de profenoloxidase. Foi concluído que os efeitos combinados da Pr1 com os produtos de reação da profenoloxidase exibiram uma redução de 25% no tempo letal (TL50) das larvas, reduziram o consumo da alimentação em 40% e os insetos infectados resultaram em cadáveres pobres em esporulação fúngica. Já Oliveira e Messias (1996) quando investigaram a variação de proteínas totais dos esporos durante a germinação das linhagens E9, Pegro e BSA de *M. anisopliae* var. *anisopliae* concluíram que a E9 iniciou a síntese de proteína a partir do tempo zero até sete horas após a germinação e para Pegro e BSA iniciaram a germinação entre sete e 13 horas da germinação.

5.6.2 Esterase

As esterases são bem estudadas em fungos fitopatógenos, Meyer e Renard (1969) analisaram padrões de proteínas e esterases em quatro linhagens de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* e cinco de *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis* obtidas de áreas restritas através de gel de poliacrilamida, com o objetivo de determinar a eficiência deste método na identificação de formas patogênicas. Foi concluído que os padrões de proteínas e esterases das duas formas especiais de *Fusarium* mostraram-se quimicamente heterogêneos, sugerindo que estes padrões não foram válidos para a identificação das formas patogênicas do *Fusarium*. O polimorfismo evidenciado entre as linhagens de *Metarrhizium* spp para o sistema de esterase neste estudo (Tabela 11) também foi evidenciado por Valim-Labres et al. (1997) ao analisarem os efeitos da resistência do hospedeiro sobre os padrões isoenzimáticos de 27 isolados, entre estes, evidenciaram o polimorfismo existente dentro do mesmo isolado recuperado de hospedeiros diferentes. Conforme Valim-Labres et al. (1997) estes resultados são possíveis desde que o número de genes envolvidos sejam bem maiores no sistema de esterase do que aqueles sistemas de metabolismo interno, onde os produtos são muito mais uniformes. Como as esterases têm um amplo número de genes que codificam para diferentes moléculas com a mesma função, os genes do hospedeiro correspondente podem neutralizar alguns, mas, não todos os genes dos patógenos. Martinez et al (1997) determinaram a variabilidade no sistema de esterases de *M. anisopliae* por eletroforese em gel de poliacrilamida, analisaram o zimograma de 10 isolados de diferentes origens geográficas e hospedeiros, distinguindo seis padrões de esterase, revelando um grande polimorfismo para o sistema de esterase de *M. anisopliae*. Os resultados deste trabalho não se assemelham aos constatados por Oliveira (1999), quando investigou que de modo geral, nos isolados de *Penicillium alutaceum* foram observadas quatro bandas de esterase, com os isolados Pa-1, Pa-2, Pa-3, Pa-5 e Pa-6 apresentando praticamente a mesma mobilidade relativa no gel de poliacrilamida, com variação na intensidade das bandas entre os isolados Pa-2 e Pa-6. A análise dos

zimogramas de esterase de espécies diferentes de *Fusarium* spp, foram obtidas por Szécsi et al. (1995) por eletroforese em gel de poliacrilamida, que detectaram o polimorfismo entre as espécies estudadas. Esses resultados se assemelham aos resultados encontrados nesse trabalho, no que se refere ao polimorfismo evidenciado entre as linhagens de *Metarrhizium* spp.. Outro trabalho descrito na literatura especializada com *Fusarium* foi desenvolvido através da análise dos zimogramas de esterase, obtidos a partir da eletroforese, em gel de poliacrilamida, de extratos protéicos de *Fusarium sambucinum* originados de diferentes localizações geográficas por Szécsi et al. (1995) que concluíram que os isolados desta espécie foram indistinguíveis por eletroforese. Diferentemente das semelhanças encontradas entre as linhagens CG291 e CG291c todas as demais linhagens estudadas neste trabalho foram indistinguíveis através da mobilidade relativa (Tabela 11). No entanto, os resultados desse trabalho, também não se assemelham as investigações realizadas por Lima e Menezes (2002), que detectaram em outro fungo fitopatogênico, um pequeno polimorfismo nos nove isolados de *C. graminicola*.

Diante da detecção das atividades expressadas pelas oito linhagens de *Metarrhizium* spp. neste trabalho sugere-se a análise de diferentes amostras de *M. anisopliae* e de *M. flavoviride* para posteriores utilizações em programas de controle de pragas, principalmente de carrapato, que é um problema na região Nordeste, com destaque para o Sertão da Paraíba. Baseado neste ponto de vista pode ser citado os estudos de Freimoser et al. (2003) que analisaram sequências expressadas por *M. anisopliae*, com amostras de *M. anisopliae* var. *anisopliae* denominada como patógena de amplo alcance entre as doenças de insetos e a amostra específica para gafanhotos *M. anisopliae* var. *acridum* de proteínas secretadas com potencial de atividade em insetos hospedeiros. As enzimas ditas como alvo potencial nos insetos hospedeiros incluíram as proteases (proteínases), quitinases, fosfolipases, lipases, esterases, fosfatases, com uma série de diversas proteases que abrangem 36% de todas as sequências expressadas por *M.*

anisopliae var. *anisopliae*. Das sequências expressadas, 80% pode ser agrupada dentro dos grupos funcionais com significância em outros fungos ascomicetos.

5.6.3 Fosfatase ácida

Nos sistemas de fosfatase ácida (ACP) desse trabalho foram detectados uma variação entre quatro a seis bandas que variaram em sua posição e intensidade, originando 24 regiões no gel. A presença do polimorfismo no sistema de ACP descrito foi evidenciado em fungo fitopatogênico por Lima e Menezes (2002) nos estudos desenvolvidos com nove isolados de *C. graminicola* em gel de poliacrilamida, onde todos apresentaram duas bandas de enzima com variação na intensidade e posição no gel. O polimorfismo detectado neste trabalho para o sistema de ACP pode ser observado na Tabela 12, o que já foi evidenciado em outro fungo filamentoso, *Bipolaris sorokiniana*, por Valim-Labres et al. (1997). Embora Xia et al. (2000) não tenha trabalhado com as mesmas linhagens de *Metarrhizium* spp. testadas nesse experimento realizaram investigações com outro isolado de *M. anisopliae* var. *acridum* e detectaram um aumento na atividade de ACP da hemolinfa do inseto *S. gregaria* no 3º após a inoculação, o que coincidiu com o declínio na quantidade de hemócitos totais e uma redução marcada na proporção que os plasmócitos e coagulócitos mostraram manchas positivas para fosfatase ácida. Os resultados sugeriram uma origem fúngica da enzima através da identificação de isoformas da ACP na hemolinfa do inseto nos diferentes tratamentos. Nas investigações de Jones et al. (1995) foram analisadas imagens coloridas e usadas para a mensuração da co-relação posicional entre a concentração intracelular de fosfatase ácida e a diferenciação celular da hifa com procedência para os padrões de atividades através de zonas circulares concêntricas.

5.6.4 Superóxido dismutase

Os resultados obtidos indicaram a ausência de bandas em 50% das linhagens de *Metarrhizium* testadas. A presença deste sistema de enzimas em fungos foi descrito por Kwon e Anderson (2000) nos estudos realizados com *Fusarium proliferatum* durante a infecção em bainha de trigo, com o fungo expressando o padrão enzimático em condições com limitações nutricionais ou de estresse oxidativo durante o processo de colonização da bainha do trigo.

6. CONCLUSÕES

1. A produção de quitinase foi evidenciada em todas as linhagens de *Metarrhizium* spp. testadas;
2. A melhor produção de quitinase foi em meio com cutícula de carrapato;
3. A maior atividade enzimática em meio basal específico foi observada em *M. anisopliae* var. *acridum* (434c) reisolada de *B. microplus* e *M. anisopliae* var. *acridum* (434) para a produção de lipase, *M. anisopliae* var. *acridum* (442c) reisolada de *B. microplus* para a produção e protease e *M. anisopliae* var. *acridum* (442) para a produção de amilase;
4. O meio Massa de Arroz e o BDA, induziram melhor crescimento radial;
5. *M. anisopliae* var. *acridum* (442c) reisolada de *B. microplus* apresentou o maior crescimento micelial e a maior velocidade de crescimento em BDA;
6. O meio BDA induziu a maior esporulação e melhor peso da matéria seca nas espécies de *Metarrhizium* ;
7. Todas as linhagens apresentaram variação quanto aos padrões protéicos;
8. O sistema de fosfatase ácida, superóxido dismutase e isoesterásico revelaram a diversidade genética existente entre as espécies de *Metarrhizium*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de Isoenzimas e Proteínas Afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa, UFV, 1998, 573p.

ALFENAS, A. C.; PETERS, L.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de Proteínas e Isoenzimas de Fungos e Essências Florestais**. Viçosa, UFV, 1991. 242p.

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high genimic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research.**, v. 25, p.4692-4693, 1997.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: S. B. ALVES Coord. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Manole, 1998. p. 289-381.

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor* spp. for the production of amilase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 325-330, 2002.

ANDERSEN, S. O. Cuticular sclerotization. In: T. A. MILLER. **Cuticle Techniques in Arthropods**. New York. Springer-Verlag, 1980. p. 185-217.

ANDRADE, V. S.; SARUBRO, L. A.; FUKUSHIMA, K.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. CAMPOS-TAKAKI, G. M. Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source/substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 106-110, 2002.

ARTHURS, S.; THOMAS, M. B. Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarrhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of

Schistocerca gregaria. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 59-65, 2001.

ASSIS, C. M.; GAMBALE, W.; PAULA C. R. Production of proteinase and phospholipase by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v. 146. p. 13-17, 1999.

ATHAYDE, A. C. R. **Patogenicidade de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviride* sobre ovos, larvas e teleóginas de *Boophilus microplus* da região Semi-árida Paraibana**. Tese de Doutorado, Centro de Ciências Biológicas, Recife, UFPE, 138p., 2002.

ATHAYDE, A. C. R.; BARRETO, C. DE A.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. Efeito de *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* do semi-árido paraibano-PB. **XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, Salvador-BA, p.95-96, 1999a.

ATHAYDE, A. C. R.; BARRETO, C. DE A.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. Efeito de *Beauveria bassiana* sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* do semi-árido paraibano-PB. **XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, Salvador-BA, p.95-96, 1999b.

ATHAYDE, A. C. R.; FERREIRA, U. L.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. Fungos entomopatogênicos: uma alternativa para controle do carrapato bovino *Boophilus microplus* do município de Ribeirão-PE. **III Congresso Brasileiro de Micologia**, Águas de Lindóia, SP, p. 42, 2001.

AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S. de. **Controle Biológico**. v. 1. Jaguariuna: EMBRAPA, 1998, 264p.

AZEVEDO, J. L.; MESSIAS, C. L. Aspectos genéticos do controle biológico de insetos por fungos. In: **Genética de Microrganismos em Biotecnologia e Engenharia Genética**. Piracicaba, Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1985, p.111-114.

BALLOW, C. E. Yeast cell wall and cell surface. In: J. N. STRATHERN.; E. W. JONES.; J. R. BOACH (eds.). **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: metabolism and gene expression**. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 335-360.

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

BENHAMON, N.; CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. **Phytopathology**, v. 83, p. 1062-1071, 1993.

BERGMAN, M.; ROSS, W. F. On proteolytic enzymes. X. The enzymes of papain and their inactivation. **Journal of Biological chemistry**, v. 114, p. 717-726, 1936.

BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, p. 26-32, 1994.

BITTENCOURT, U. R. E. P. Controle biológico de carrapatos. In: J. S. MELO; J. L. AZEVEDO. **Controle Biológico**, v. 2. Jaguariuna, EMBRAPA, p. 146-347, 2000.

BITTENCOURT, U. R. E. P.; SOUZA, E. J.; PERALVA, S. L. F. S.; REIS, R. C. S. Eficácia do fungo *Metarrhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 em teste de campo com bovinos infestados por carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1987) (ACARI; IXODIDAE). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 21, p. 78-82, 1999.

BONDE, M. R.; PETERSON, G. L.; MATSUMOTO, T. T. The use of isozymes to identify teliospores of *Tilletia indica*. **Phytopathology**, v. 79, p. 596-599, 1989.

BRAGA, G. U. L.; MESSIAS, C. L.; VENCOSKY, R. Estimates of genetic parameters related to protease production by *Metarrhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, p. 6-12, 1994.

BRAGA, G. U. L.; DESTÉFANO, R. H. R.; MESSIAS, C. L. Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarrhizium anisopliae* cultures. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 107-113, 1999.

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

BUSOLI, A. C.; FERNANDES, O. A.; TAYRA, O. Controle da broca da bananeira *Cosmopolites sordidus* Germar, 1824 (Coleoptera: Curculionidae) através dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (HYPHOMYCETES). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 18, p. 33-41, 1989.

BURGES, H. D. (Ed.) **Microbial Control of Pests and Plant Diseases** 1970-1980. London, Academic Press, 1981, 949p.

CABIB, E.; ROBERTS, R.; BOWERS, B. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. **Annual Review of Microbiology**, v. 47, p. 763-793, 1982.

CANELLA, K. M. N. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel-influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, p. 13-17, 2001.

CARDOSO, G. E. M.; LOPES, F. Y.; DELGADO, B. F.; VELEZ, A. P. E. Enzymatic activity of *Beauveria bassiana* and their relationship with pathogenicity to the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 27, p. 61-65, 2001.

CHET, I.; BAKER, R. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology**, v. 70, p. 994-998, 1980.

COUTINHO, H. L. C. Diversidade microbiana e agricultura sustentável. **Workshop Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas**, Campinas-SP, p.17, 1996.

DOMENECH, F.; RODRIGUEZ, J. A.; SANCHEZ, D.; ALFONSO, A. Relation between concentration of carbohydrates and activity of water. Influence on the growth and sporulation of *Metarrhizium anisopliae* isolate nº 11 by solid state fermentation. **Revista Sobre los Derivados de la Cana-de-Azucar**, v.34, p. 2-19, 2000.

DOMINGUES, C. M.; PERALTA, R. M. Production of amylase by soil, fungi and partial biochemical characterization of amylase of a selected strain (*Aspergillus fumigatus* Fresenius). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 681-685, 1993.

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

EBELING, W.; HENNRICH, N.; KLOCKOW, M.; METZ, H.; ORTH, H. D.; LANG, H. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, p. 91-97, 1975.

ELAD, Y.; BARAK, R.; CHET, I. Possible role of lectins in mycoparasitism. **Journal of Bacteriology**, v. 154, p. 1431-1435, 1983.

EL-SAYED, G. N.; COUDRON, T. A.; IGNOFFO, C. M. Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 54, p. 394-403, 1989.

ESTRADA-PEÑA, A.; GONZALES, J.; CASOLAS, A. The activity of *Aspergillus ochraceus* (Fungi) on replete females of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in natural and experimental conditions. **Folia Parasitologica**, v. 37, p. 331-336, 1990.

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.

FERNANDES, P. M. ; ALVES, S. B. Controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832): (Isoptera: Termitidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em condições de campo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 20. p.45-49, 1991.

FERREIRA, U. L.. **Crescimento e condição nuclear de *Beauveria bassiana*, *Metarrhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviride* em meio de cultura e substratos naturais diferentes.** Mestrado em Biologia de Fungos (Dissertação), Recife, UFPE, 68p, 2000.

FONTES, E. G. Fungo é o inimigo natural. In: O. M. Alvarenga (ed.). **Manual de Controle Biológico.** Rio de Janeiro, Sociedade Nacional de Agricultura, 1992, p. 27-28.

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

GAMS, W.; ROZSYPAL, J. *Metarhizium flavoviride* n.sp. isolated from insects and from soil. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 22, p.518-521, 1973.

GILLESPIE, J. P.; BATEMAN, R.; CHARNLEY, A. K. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium spp* for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, p. 128-137, 1998.

GOETTEL, M. S.; St LEGER, R. J.; RIZZO, N. W.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 2233-2239, 1989.

GONZALES, J. C. **O carrapato do Boi.** São Paulo, Editora Mestre Jov. 1974, 104p.

GORINSTEIN, S.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; BELO, V. A.; AZEVEDO, J. L. Characterization of *Beauveria bassiana*, *Metarrhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* through electrophoretic patterns of their protein fractions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, p. 89-92, 1996.

HAMMILL, T. M. electron microscopy of phialoconidiogenesis in *Metarrhizium anisopliae*. **American Journal of Botany**, v. 59, p. 317-326, 1972.

HANKIN, L; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, p. 597-607, 1975.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; OPPENHEIM, A.; CHET, I. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. **Phytopathology**, v. 86, p. 980-985, 1996.

HORN, S. C. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos, Brasil, 1983. **Boletim de Defesa Sanitária Animal (Nº Especial)**, Ministério da Agricultura, Brasília, DF, 1985, 83p.

HOOGSTRAAL, H. **Ticks**. In: GAAFAR, S. M.; HOWARD, W. E.; MARSH, R. E. Eds. Parasites, pests and predators. Netherlands: Elsevier, 1985. 575p.

HUGHES, S. J. Conidiophores, conidia and classification. **Canadian Journal of Botany**, v. 31, p. 577-659, 1953.

HUNSLEY, D.; BURNETT, J. H. The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi. **Journal of General Microbiology**, v. 62, p. 203-218, 1970.

INGLIS, G. D.; GRANT, M. D.; KAWCHUK, L. M.; GOETTEL, M. S. Influence os ocillating temperatures on the competitive infection and

colonization of the migratory grasshopper by *Beauveria bassiana* and *Metarrhizium flavoviride*. **Biological Control**, v. 14, p. 111-120, 1999.

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

KAMP, A. M.; BIDOCHKA, M. J. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 74-77, 2002.

KENDRICK, B. **Taxonomy of Fungi Imperfect**. Toronto, University of Toronto. Press, 1971, 390p.

KENDRICK, B. **The Fifth Kingdom**. Canadá, Mycologue Publications, 1992, 406p.

KNIGHT, K.; PIMENTEL, M. C. B.; MORAIS, M. M. C.; LEDINGHAM, W. M.; FILHO, J. L. L.; MAIA, M. M. D. Immobilization of lipase from *Fusarium solani* FS1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p.219-221, 2000.

KUKLINSKY-SOBRAL, J. **Variabilidade genética por regeneração de protoplastos e sensibilidade a fungicidas em *Metarrhizium flavoviride***. Mestrado em Genética (Dissertação). Recife, UFPE, 94p. 1999.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. Citologia e variabilidade genética em *Metarrhizium flavoviride*. **XIII Encontro de Genética do Nordeste**, Feira de Santana-BA, p.417, 1998.

KWON, S. I.; ANDERSON, A. J. Differential production of superoxide dismutase and catalase isozymes during infection of wheat by a *Fusarium*

proliferatum like fungal isolate. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 58, p.73-81, 2001.

LILLY, V. G.; BARNETT, H. E. **Physiology of the Fungi**. New York, McGraw Hill Inc, 1951. 464p.

LIMA, M. L. F. **Caracterização patogênica, fisiológica e enzimática de isolados de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wilson, agente causal da antracnose do milho, *Zea mays* L.** Mestrado em Biologia de Fungos (Dissertação), Recife, UFPE, 62p, 2000.

LIMA, L. H. C.; MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: J. S. MELO; J. L. AZEVEDO. **Controle Biológico**, v. 2. Jaguariuna, EMBRAPA, p. 263-304, 2000.

LIMA, M. L. F.; MENEZES, M. Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum graminicola* através da análise eletroforética de padrões protéicos e isoenzimáticos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 12-16, 2002.

LIPA, J. Microbiological control of mites and ticks. In: BURGESS, H. D. & HUSSEY, N. W. **Microbial Control of Insects and Mites**. London, Academic Press, 1971. p.357-374.

LU, T. H.; GROTH, J. V. Isozyme detection and variation in *Uromyces appendiculatus*. **Canadian Journal of Botany**, v. 66, p. 885-890, 1987.

LUNA-ALVES LIMA, E.A. Aspectos taxonômicos e citológicos de Hyphomycetes (Deuteromycotina) entomopatogênicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p.17-20, 1989

LUNA-ALVES LIMA, E. A. **Características citológicas e genéticas de linhagens Selvagens, mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Mtsch.) Sorokin.** Tese de Doutorado, Rio de Janeiro, UFRJ. 260 p. 1985.

MAGALHÃES, B. P.; GOETTEL, M. S.; FRAZÃO, H. S. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Beauveria bassiana* on *Rhammatocerus schiistocercoides* under humid and dry conditions. **Brasilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 162-164, 2000.

MAGALHÃES, B.; FARIA, M.; TIGANO, M.; SOBRAL, B. W. S. *Metarhizium flavoviride*, a pathogen of grasshoppers in Brazil, p. 41. In: **Proceedings Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology**, 28, 75p. 1995.

MAGALHÃES, B. P.; FARIA, M. R.; TIGANO, M. S.; SOBRAL, B. W. S. Characterization and virulence of a brasilian isolate of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (Hyphomycetes). **Memory of the Entomological Society of Canada**, v. 171, p. 313-321, 1997.

MAGALHÃES, B.; TIGANO, M.; MARTINS, I.; FRAZÃO, H.; RAMIREZ, G. Caracterização molecular e funcional de um isolado peruano de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Comunicado Técnico**, 77, EMBRAPA-DF, 2002.

MARKARYAN, A.; MOROZOVA, I.; YU, H.; KOLATTUKUDY, P. E. Purification and characterization of an elastinolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron; microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. **Infection and Immunology**, v. 62, p. 2149-2157, 1994.

MARTINEZ, M. E. E.; PIÑÓN, D. R.; CAPOTE, M. C. Variabilidad de las esterasas de *Metarhizium anisopliae*. **Revista Iberoamericana Micología**, v. 14, p. 20-30, 1997.

MEYER, J. A. RENARD, J. L. Protein and esterase patterns of two formae speciales of *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, v. 59, p. 1409-1411, 1969.

McDONALD, B. A.; McDERMOTT, J. M. Population genetics of plant pathogenic fungi. **Bioscience**, v. 43, p. 311-319, 1993.

MONTEIRO, A. C. **Aspectos fisioecológicos de isolados de fungos entomopatogênicos obtidos na região Amazônica (Manaus)**. Tese de Doutorado. São Carlos, Universidade de São Carlos, 233 p., 1988.

MONTEIRO, A. C.; FIORIN, A. C.; CORREIA, A. C. B. Pathogenicity of isolates of *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 109-112, 1998.

MOORE, D.; REED, M.; PATOUREL, G. L.; ABRAHAM, Y. J.; PRIOR, C. Reduction of feeding by the desert locust, *schistocerca gregaria*, after infection with *Metarrhizium flavoviride*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, p. 304-307, 1992.

MOREIRA, A. M.; ALFENAS, A. C. Diferenciação de espécies de *Cylindrocladium* por meio da análise eletroforética de proteínas e isoenzimas em géis de poliacrilamida. **Fitopatologia Brasileira**, v. 10, p. 258, 1985 (Resumo).

MOREIRA, M. A. B.; MAGALHÃES, B. P.; VALADARES, M. C. C.; CHAGS, M. C. M. Occurrence of *Metarrhizium flavoviride* Gams and Rozsypal (Hyphomycetes) on *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) in Rio Grande do Norte, Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, p. 63-76, 1996.

OLIVEIRA, F. C. **Fungos endofíticos de folhas de cajueiro, *Anacardium occidentale* L.; propriedades antagônicas a *Colletotrichum gloesporioides* (Penzig) Saccardo, e avaliação enzimática através de eletroforese e substratos específicos.** Mestrado em Criptógamos (Dissertação), Recife, UFPE, 101p, 1999.

OLIVEIRA, N. T.; MESSIAS, C. L. 'Variability of strains of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin in terms of protein content and spore germination. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 268-272, 1996.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE LA SALUD. Ordenamiento del medio para la lucha antivectorial. Ginebra, 1980 (Série de informes técnicos, 649).

ONOFRE, S. B.; MINIUK, C. M.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 1478-1480, 2001.

ONOFRE, S. B.; VARGAS, L. R. B.; ROSSATO, M.; BARROS, N. M.; BOLDO, J. T.; NUNES, A. R. F.; AZEVEDO, J. L. Controle biológico de pragas na agricultura, por meio de fungos entomopatogênicos. In: L. A.SERAFINI; N. M. BARROS; J. L. AZEVEDO. Org. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria.** Caxias do Sul. EDUCS. p. 297-317, 2002.

PUPIN, A. M.; MESSIAS, C. L.; PIEDRABUENA, A. E.; ROBERTS, D. W. Total lipids and fatty acids of strains of *Metarhizium anisopliae*. **Brasilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 121-128, 2000.

RAMIREZ, F. Projeto de estudos de factilidade para el control de la garrapata en Costa Rica. **Salva Animal --IICA.** Publicação Científica, n. 1, 1982.

RAPP, P.; BACKHAUS, S. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 938-943, 1992.

RIBEIRO, S. M. A. **Caracterização citológica e sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* e infectividade sobre o cupim *Coptotermes* sp.** Tese de Doutorado. Recife, UFPE . 155p. 1997.

ROBERTS, A.; MESSING-AL-AIDROSS, K. Acid production by *Metarhizium anisopliae*, effects on virulence against mosquitoes and on detection of *in vitro* amylase, protease and lipase activity. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 45, p. 9-15, 1985.

ROBERTS, R. G.; MORRISON, W.H.; ROBERTSON, J. A.; HANLIN, R. T. Extracellular lipase production by fungi from sunflower seed. **Mycologia**, v. 79, p. 265-273, 1987.

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

ROSATO, Y. B.; MESSIAS, C. L.; AZEVEDO, J. L. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 38, p. 1-3, 1981.

SAMISH, M.; REHACEK, J. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 159-182, 1999.

SAMSINÁKOVÁ, A. *Beauveria globulifera* (Speg) Pic. iako parazit klistete *Ixodes ricinus* L. **Zoologie Lisy**, v. 6, p. 329-330, 1957.

SAMSINÁKOVÁ, A.; KÁLALOVÁ, S. Mass production of *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata* populations. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 38, p. 169-174, 1981.

SAMSON, R. A. Identification of entomopathogenic Deuteromycetes. In : H. D. Burgues (ed.). **Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970 - 1980**. London, Academic Press, 1981, p. 93-106.

SANTOS, R. M. D. B. **Hidrolise de queratina pelo fungo *Aspergillus fumigatus*: purificação e caracterização da proteinase queratinolítica com potencial biotecnológico**. Tese de Doutorado. Brasília, Universidade de Brasília. 187p. 1996a.

SANTOS, R. M. D. B.; FIRMINO, A. P.; DE SÁ, C. M.; FELIX, C. R. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Current Microbiology**, v. 33, p. 364-370, 1996b.

SARATH, G.; DE LA MONTE, R. S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: Beynon, R. J.; Bonde, J. S. (eds). **Proteolytics Enzymes: a practical approach** Oxford, Oxford University Press. 1989.

SHAN, R. The polyunsaturated fatty acids of microorganisms. **Advance in Lipid Research**, v. 4, p. 107-174, 1966.

SOCCOL, C. R.; AYALA, L. A.; SOCCOL, V. T.; KRIEGER, N.; SANTOS, H. R. Spore production by entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* from declassified potatoes by solid-state fermentation. **Revista de Microbiologia**. v. 28, p. 34-42, 1997.

SONG, Z. Studies on sporulation of *Metarrhizium* in submerged culture. **Scientia Silvar Sinicae**, v. 37, p. 134-139, 2001.

SONG, Z.; FENG, L. Z.; JING, Y. Changes of some biochemical estimates in the hemolymph and body wall of *Dendrolimus punctatus* infected by *Metarrhizium anisopliae*. **Entomological Knowledge**, v. 39, p. 297-300, 2002.

St LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 47, p. 167-177, 1986a.

St LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 47, p. 295-302, 1986b.

St LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 48, p. 85-95, 1986c.

St. LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarrhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 253, p. 221-232, 1987a.

St. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNEY, A. K. Distribution of chymoelastases and tryosin-like enzymes in five species of entomopathogenic deuteromycetes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 258, p. 123-131, 1987b.

St. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNEY, A. K. Production of degrading enzymes by the entomopathogen *Metarrhizium anisopliae* during infection of

cuticles from *Colliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. **Journal of General Microbiology**, v. 133, p. 1371-1382, 1987c.

St. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. W. Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. **Microbiology**, v. 143, p. 1983-1992, 1997.

St. LEGER, R. J.; DURRANDS, P. K.; CHARNEY, A. K.; COOPER, R. M. Role of extracellular chymioelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, p. 285-293, 1988.

St. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Protein synthesis in *Metarhizium anisopliae* growing on host cuticle. **Mycological Research**, v. 99, p. 1034-1040, 1995.

St. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal Invasion of host (*Manduca Sexta*) cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 907-912, 1996a.

St. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Construction of na improved mycoinsecticide overexpressin toxic protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 25, p. 6349-9354, 1996b.

St LEGER, R. J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 168-179, 1991.

STIRLING, J.; COOK, G.; POPE, A. A chitin and its degradation. In: BRITISH MYCOLOGICAL SOCIETY. **Fungal wall and hyphal growth**. (S. I): British Mycological Society, 1979, p. 169-188.

SOSA-GOMÉS, D. R.; ALVES, S. B. Caracterización do once aislamiento de *Metarrhizium anisopliae* (Mesch.) Sorokin. I. estandarización, virulência y actividade enzimática. CIRPON. **Revista del Investigation**, v. 1, p. 83-101, 1983.

SZÉCSI, A.; TURÓCZI, G.; BORDÁS, B. analysis of esterase zymograms of *Fusarium sambucinum* and related species. **Mycopathologia**, v. 129, p. 165-171, 1995.

TANADA, Y.; KAYA, H. K.. **Insect Pathology**. Academic Press, 1993. 666p.

TIGANO-MILANI, M. S.; 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.

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

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. 2. Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A, 1998, p. 156-163.

VALADARES, M. C. C.; AZEVEDO, J. L. Production of amylases and proteases by wild-type and mutant strains of *Metarrhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 237-241, 1996.

VALADARES-INGLIS, M. C.; AZEVEDO, J. L. Amylase and protease secretion in recombinant strains of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* following parasexual crosses. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, p. 171-175, 1997.

VALIM-LABRES, M. E., PORTO, M. D. M., MATSUMURA, A. T. S. Effects of host resistance on isozymatic patterns of *Bipolaris sorokiniana* (Dematiaceae, Moniliales). **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p.541 - 545, 1997.

VILAS BOAS, A. M. Produção e atuação do bioinseticida *Metarhizium anisopliae* sobre a cigarrinha da cana-de-açúcar *Mahanarva posticata* em Pernambuco. **Caderno Ômega**, v. 5, p. 25-36, 1992.

VILAS BOAS, A.M.; ANDRADE,R.M. & OLIVEIRA, J.V. Diversificação de meios de cultura para produção de fungos entomopatogênicos. **Arquivo de Biologia e Tecnologia**. v.39, p.123-128, 1996

WAHARTON, R. H. Enfermedades del ganado transmitidas por las garrapatas y sus vectores. S. resistência a los acaricidas. **World Animal Review, Food and Agriculture Organization (FAO)**, v. 36, p. 8-15, 1983.

WEETE, J. D. **Lipid biochemistry of fungi and others organisms**. Plenum Press, New York, 1980, 388p.

WEETE, J. D. Lipids in fungal growth and reproduction. In: G. TURIAN and H. R. HOHL (eds). **The Fungal Spore: Morphogenic Controls**. New York. Academic Press, 1981, p. 463-485.

WEETE, J. D.; LAWER, G. C.; LASETER, J. L.. Total lipid and esters components of *Rhizopus arrhinius*: Identification and metabolism. **Archieve of Biochemistry and Biophysics**. V. 155, p. 411-419, 1973,

XAVIER-SANTOS, S. **Aspectos do comportamento cultural citológico e entomopatogênico de *Metarhizium flavoviride***. Mestrado em Criptógamos (Dissertação). Recife, UFPE, 108p., 1995.

XIA, Y.; DEAN, P.; JUDGE, A.; J.; GILLESPIE, J. P.; CLARKSON, J. M.; CHARNLEY, A. K. Acid phosphatases in the haemolymph of the desert locust, *Schistocerca gregaria*, infected with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal Insect Physiololy**, v. 46, p. 1249-1257, 2000.

ANEXOS

Tabela 14. Atividade quitinolítica de linhagens de *Metarhizium* spp aos 12 dias de incubação em basal específico.

Linhagem	Meio Basal	
	Com Cutícula	Sem Cutícula
288	2.24 de A	1.67 cde B
288C	2.54 cd A	2.14 bc A
291	1.57 e A	1.06 de A
291C	4.51 a A	2.59 b B
434	2.92 bcd A	1.42 cde B
434C	3.50 b A	0.99 e B
442	2.75 bcd A	1.86 bcd B
442C	3.16 bc A	1.04 de B
CV = 15,21%		

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 15. Atividade lipolítica de linhagens de *Metarhizium* spp após cinco dias de observação em meio basal específico.

Linhagem	Passagem	
	Com	Sem
288	3.35 a A	3.65 a A
291	2.50 a A	1.92 b A
434	2.70 a B	4.47 a A
442	2.52 a A	1.47 b B
CV = 20,66%		

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 16. Atividade lipolítica de linhagens de *Metarhizium* spp após 10 dias de observação em meio basal específico.

Linhagem	Passagem	
	Com	Sem
288	3.35 a A	3.65 a A
291	2.50 a A	1.92 b A
434	2.70 a B	4.47 a A
442	2.52 a A	1.47 b B
CV = 20,66%		

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 17. Atividade lipolítica de linhagens de *Metarrhizium* spp após 15 dias de observação em meio basal específico.

Linhagem	Passagem	
	Com	Sem
288	3.91 a A	4.50 a A
291	3.07 a A	2.57 b A
434	3.37 a B	4.98 a A
442	3.44 a A	2.20 b B
CV = 20,88%		

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 18. Atividade proteolítica de linhagens de *Metarrhizium* spp após cinco dias de observação em meio basal específico.

Linhagem	Passagem	
	Com	Sem
288	0.50 b A	0.27 ab A
291	0.63 b A	0.41 a A
434	0.51 b A	0.24 ab B
442	1.04 a A	0.00 b B
CV = 44,43%		

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 19. Atividade proteolítica de linhagens de *Metarrhizium* spp após 10 dias de observação em meio basal específico.

Linhagem	Passagem	
	Com	Sem
288	2.52 a A	1.45 b B
291	2.92 a A	2.32 a B
434	2.64 a A	0.77 c B
442	2.97 a A	1.17 bc B
CV = 15,73%		

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 20. Atividade proteolítica de linhagens de *Metarhizium* spp após 15 dias de observação em meio basal específico.

Linhagem	Passagem	
	Com	Sem
288	2.52 a A	1.45 b B
291	2.92 a A	2.32 a B
434	2.64 a A	0.77 c B
442	2.97 a A	1.17 bc B
CV = 15,73%		

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 21. Atividade amilolítica de linhagens de *Metarhizium* spp após cinco dias de observação em meio basal específico.

Linhagem	Passagem	
	Com	Sem
288	0.38 a B	0.46 b A
291	0.28 a A	0.26 c A
434	0.36 a B	0.45 b A
442	0.28 a B	0.58 a A
CV = 20,66%		

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 22. Atividade amilolítica de linhagens de *Metarhizium* spp após 10 dias de observação em meio basal específico.

Linhagem	Passagem	
	Com	Sem
288	1.22 a A	0.88 a B
291	0.21 c A	0.20 b A
434	0.49 bc A	0.41 b A
442	0.76 b B	1.11 a A
CV = 38.12%		

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

ARTIGO PUBLICADO



Fungos Entomopatogênicos

Uma alternativa para o controle do carrapato bovino - *Boophilus microplus*

Ana Célia Rodrigues Athayde

Professora Assistente - Departamento de Medicina Veterinária, Campus VII
UFPE - Centro de Saúde e Tecnologia Rural
athayde98@zipmail.com.br

Ubirany Lopes Ferreira

Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos - Departamento de Micologia,
UFPE - Centro de Ciências Biológicas
bana2000@ig.com.br

Elza Áurea de Luna Alves Lima

Professora Adjunta - Departamento de Micologia,
UFPE - Centro de Ciências Biológicas
odami@biologia.com.br

Fotos cedidas pelos autores



s carrapatos são os mais importantes ectoparasitas em áreas de exploração pecuária tanto em regiões tropicais quanto subtropicais e são responsáveis por severas perdas econômicas, principalmente no que concerne à transmissão de patógenos e toxinas, como vetores potenciais. O maior prejuízo causado pelos carrapatos deve-se a sua habilidade em transmitir protozooses, riquetisioses e viroses. As enfermidades transmitidas pelos artrópodes situam-se entre os mais importantes problemas de saúde em todo o mundo. Mas, apesar do progresso alcançado em décadas anteriores, pelos programas de controle de artrópodes através de agentes químicos, os carrapatos ainda representam, na atualidade, um risco constante e grave para a população mundial, seja a humana, seja a animal, sendo fundamental o conhecimento da interrelação "artrópode - agente patogênico - hospedeiro" dentro do ambiente total, para se pensar em controle efetivamente viável (OMS, 1980; Waharton, 1983).

A inclusão de bovinos especializados em zonas onde originariamente esses animais não existiam ou, mais especificamente, a presença de raças

européias nos trópicos, acentuou a necessidade de se controlar as infestações por carrapatos. No Brasil, esse controle é exclusivamente voltado para o *Boophilus microplus*, carrapato de um só hospedeiro, que, no entanto, acarreta prejuízos globais na pecuária sul-americana no valor de US\$ 967.886.184.00 (Hom, 1983), inviabilizando o aproveitamento do couro em 80% a 90%, uma perda sanguínea em torno de um litro por ciclo por animal e uma diminuição no ganho de peso de um quilograma/ano (Ramirez, 1982).

O homem desenvolveu vários métodos para o controle do carrapato (Garcia & Ozaki, 1993; Nari, 1995; Fernandez-Ruvalcaba et al., 1999; Khalaf-Allah, 1999), no entanto, nem todos foram capazes de resolver o problema (Monteiro et al., 1998; Frisch, 1999) para cuja solução imediatista sempre fora o uso de substâncias químicas acaricidas; porém, essas drogas determinaram, em diferentes épocas, o aparecimento de populações de carrapatos resistentes, além de determinarem a permanência de resíduos em produtos de origem animal e no meio ambiente, tornando a busca de outras alternativas para o controle do carrapato uma questão fundamental (Garcia & Ozaki, 1993; Frisch, 1999). Conseqüentemen-

te, o controle das populações de artrópodes deve ser realizado também com o propósito de reduzir significativamente seus números populacionais, respeitando, no entanto, a integridade do ecossistema (Cuisance et al., 1994; Kunz & Kemp, 1994; Monteiro et al., 1998); para isso, vem-se efetivando o controle biológico como medida alternativa e promissora (Gronvold et al., 1996; Hogsette, 1999; Samish & Rehacek, 1999). A pesquisa acerca do uso de microrganismos para controle do carrapato ainda é incipiente, no entanto, vários pesquisadores têm-se dedicado ao estudo de infecções experimentais de carrapatos com bactérias e fungos, mais especificamente



Figura 1: *Metarrhizium flavoviride* colonizando teleóginas de *Boophilus microplus* em meio BDA

usando o *Metarbizium anisopliae* (Bittencourt et al., 1999; Monteiro et al., 1998).

O *Beauveria bassiana* é um fungo entomopatogênico de distribuição cosmopolita, amplamente aplicado no controle de pragas (Bell & Hamalle, 1970; Brady, 1981) e, recentemente, no dos carrapatos (Bittencourt, 1999). Um fungo entomopatogênico que causa epizootia caracteriza-se pela alta taxa de crescimento, produção elevada de unidades infectantes, capacidade de sobrevivência dessas unidades no ambiente do seu hospedeiro; capacidade de resistir às barreiras físico-químicas do tegumento e da hemolinfa do hospedeiro e capacidade de provocar sua morte rapidamente (Fuxa & Tanada, 1987; Fuxa, 1987).

As espécies pertencentes ao gênero *Metarbizium*, de distribuição cosmopolita, são o *M. anisopliae* e o *M. flavoviride* (Recentemente DRIVER et al. (2000), apresentou uma nova classificação para o *M. flavoviride*, considerando-o após análises moleculares como *Metarbizium anisopliae* var. *acridium*), de comprovado sucesso no controle de insetos-praga, notadamente as cigarrinhas da cana-de-açúcar (Luna, 1985) e os gafanhotos (Moreira et al., 1996; Faria et al., 1999), sendo o *M. anisopliae*, recentemente usado no controle biológico de carrapatos (Bittencourt, 1999). Ambos estão entre os mais importantes patógenos microbianos, com grande potencial para o desenvolvimento como agentes de controle biológico, possuindo um alto grau de infectividade e patogenicidade contra insetos-praga (Goettel et al., 1995).

Entre os fungos entomopatogênicos, os mais empregados no controle de pragas são o *B. bassiana* e o *M. anisopliae*; este fato talvez se deva a sua ampla distribuição geográfica, à variedade de hospedeiros e às ocorrências em condições naturais, enzooticas ou epizooticas (Alves, 1998).

A necessidade, cada dia maior, de se conseguir controlar os carrapatos têm levado os pesquisadores a conseguirem formas alternativas para esse controle. Embora os estudos tenham-se intensificado no sentido do controle imunológico, a procura do desenvolvimento de vacinas (Vaz Júnior et al., 2000), e trabalhos que utilizam mi-



Figura 2: *Beauveria bassiana* colonizando teleógina *Boophilus microplus* em meio BDA

crorganismos como método alternativo indicam o controle biológico como a técnica mais viável de procedimento (Alves, 1998).

Para avaliar o efeito *in vitro* de *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *B. bassiana*, à temperatura ambiente, sobre teleóginas e ovos do carrapato *B. microplus*, coletados no campo, a equipe de pesquisadores do Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Micologia da Universidade Federal da Pernambuco, sob a responsabilidade da Professora Elza Áurea de Luna-Alves Lima, orienta trabalhos com o objetivo de caracterizar fungos entomopatogênicos com potencialidade para ser utilizados no controle biológico e integrado desse ixodídeo, vislumbrando, assim, um controle sem o uso de pesticidas quí-



Figura 3: *Metarbizium anisopliae* colonizando teleógina *Boophilus microplus* em meio BDA

micos para favorecer a biossegurança do ecossistema.

Partiu-se de linhagens obtidas da Coleção de Cultura de Fungos da Micoteca – URM, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco: a linhagem *M. anisopliae* PL₄₃, isolada de *Mahanarva posticata*, do estado de Alagoas; a *M. flavoviride* BR₁, isolada de *Schistocerca pallens*, do estado do Rio Grande do Norte e a *Beauveria bassiana* CL₁, isolada de *Casnia licus*, do estado de Pernambuco, sob os números de acesso URM-3349, URM-3800 e URM-3447, respectivamente. Para o preparo do inóculo, utilizou-se o substrato arroz quebradiço para o fungo *M. anisopliae*, para o *M. flavoviride*, a ervilha; e para o *B. bassiana*, o arroz parboilizado, seguindo-se a metodologia de Vilas Boas et al. (1996).

Para cada tratamento, foram utilizadas 5 teleóginas e 200 mg de ovos de teleóginas tratadas anteriormente, com *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *B. bassiana*. Foram formados quatro grupos: um controle, um tratado com *M. anisopliae*, outro com *M. flavoviride* e outro com *B. bassiana*.

Para a obtenção do inóculo foi utilizada a metodologia descrita por Vilas Boas et al. (1996), e após quantificação as concentrações foram ajustadas para 0.3031×10^8 conídios/mL para *M. anisopliae*, 0.1114×10^8 conídios/mL para *M. flavoviride* e 0.3051×10^8 conídios/mL para *B. bassiana*. Optando-se por testar uma concentração inferior do fungo *M. flavoviride*, pelo fato do mesmo ainda não haver sido utilizado em bioensaios com carrapatos.

As teleóginas e os ovos foram imersos, por cinco segundos, em 10 mL da suspensão de esporos (Drummond et al., 1973; Green e Connole, 1981). Após a infecção, as teleóginas de *B. microplus*, foram levadas à estufa incubadora (BOD), com umidade relativa de 88% e temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 28 dias. Os ovos e as larvas também permaneceram em BOD por 20 dias. A mortalidade e a ausência de ovoposição, nas teleóginas, foram checadas a cada dois dias. Para se determinar o período de incubação e de eclosão, os ovos eram observados a cada dois dias.

A atividade patogênica dos fungos

Tabela I. Atividade patogênica de *Metarrhizium anisopliae*, *Metarrhizium flavoviride* e *Beauveria bassiana* para fêmeas adultas de *Boophilus microplus* em condições de laboratório

Parâmetros	Controle	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. flavoviride</i>	<i>B. bassiana</i>
Peso da Massa de Ovos (mg)	185.00a	180.00a	115.00b	102.50b
Período de Pré-postura (dias)	4.25a	4.00a	4.00a	4.00a
Período de Postura (dias)	9.75a	3.00b	3.25b	3.00b
Índice de Produção de Ovos (%)	82.19a	64.94ab	46.07b	45.64b
Percentual de Controle (%)		86.10a	90.94a	89.33a

As médias seguidas por letras distintas, por linha, diferem entre si ao nível de significância de 5%

Tabela II. Atividade patogênica de *Metarrhizium anisopliae*, *Metarrhizium flavoviride* e *Beauveria bassiana* para ovos de teleóginas de *Boophilus microplus* pré-infectadas em condições de laboratório

Parâmetros	Controle	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. flavoviride</i>	<i>B. bassiana</i>
Período de Incubação (dias)	34.00c	37.00b	40.00a	22.25d
Período de Eclosão (dias)	6.00c	11.00b	15.00a	10.75b
Percentual de Eclosão (%)	99.00a	17.50b	13.75b	16.25b

As médias seguidas por letras distintas, por linha, diferem entre si ao nível de significância de 5%

Tabela III. Atividade patogênica de *Metarrhizium anisopliae*, *Metarrhizium flavoviride* e *Beauveria bassiana* para ovos de teleóginas de *Boophilus microplus* infectados em condições de laboratório

Parâmetros	Controle	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. flavoviride</i>	<i>B. bassiana</i>
Período de Incubação	33.75c	45.50b	50.35a	30.50d
Período de Eclosão	7.00d	13.00b	15.00a	9.50c
Percentual de Eclosão	95.75a	9.75b	10.00b	7.75b

As médias seguidas por letras distintas, por linha, diferem entre si ao nível de significância de 5%

estudados foi demonstrada através da diferença, estatisticamente significativa, observada entre o grupo controle e os tratamentos com as linhagens usadas. O experimento seguiu um modelo composto por 3 repetições (linhagens) e 5 indivíduos em cada repetição. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

A ação dos fungos *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *B. bassiana* sobre fêmeas adultas de *B. microplus* está sumariamente demonstrada na Tabela I. Ao se analisarem os dados expostos, observou-se uma diminuição no peso da massa de ovos, onde os grupos tratados com *M. flavoviride* (Figura 1) e *B. bassiana* (Figura 2) diferiram significativamente do controle, o que não ocorreu com o grupo tratado pelo *M. anisopliae*, embora tenha-se observado fêmeas infectadas (Figura 3), diferindo dos resultados encontrados por Monteiro *et al.* (1998).

**Figura 4:** *Beauveria bassiana* colonizando ovos de teleóquina de *Boophilus microplus* em meio BDA

Quanto ao período de pré-postura não houve diferença significativa entre os grupos, o que difere assim dos dados de Monteiro *et al.* (1998), quando estudou a ação do *M. anisopliae* sobre teleóginas de *B. microplus*; o

período de postura diminuiu nos grupos tratados; o índice de produção de ovos foi baixo nos grupos tratados com *M. flavoviride* e *B. bassiana* e o grupo tratado com o *M. anisopliae* não diferiu do controle, resultado que não corrobora com os de Monteiro *et al.* (1998). Por fim, consegue-se rapidamente constatar a ação efetiva dos fungos principalmente do grupo tratado com o *M. flavoviride*, o qual apresentou um percentual médio de controle de 90.94%.

Com relação à biologia de ovos de teleóginas de *B. microplus* infectadas, a Tabela II mostra com clareza a ação do fungo *M. flavoviride* sobre os demais fungos utilizados, onde o percentual de eclosão foi de apenas 13.75% em relação ao grupo controle, constatando-se, também, efetiva ação do *M. anisopliae* e da *B. bassiana* (Figura 4).

A Tabela III mostra a ação do fungo *M. flavoviride* sobre ovos de teleóginas

de *B. microplus* infectados, aumentando o período de incubação e de eclosão; diminuindo o percentual de eclosão. Observou-se, também, efetiva ação do *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

Diante dos resultados obtidos até o momento com as pesquisas em andamento, concluiu-se que os fungos estudados mostraram atividades biocontroladoras sobre *B. microplus* e aponta o *M. flavoviride* como novo agente a ser explorado no controle do carrapato bovino. A perspectiva da real patogenicidade de fungos entomopatogênicos contra carrapatos e o desenvolvimento de novas tecnologias para a aplicação desses produtos biológicos, vão contribuir para a produção animal e para minimizar os danos ecotóxicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: S.B. ALVES Coord. Controle Microbiano de Insetos São Paulo: Manole, p. 21-37, 1998.
- BELL, J.V. AND HAMALLER, J. Three Fungi tested for control of the cowpea curculionid, *Chalcodermus aeneus*. J. Invertebr. Pathol. 15: 477-450, 1970.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; SOUZA, E. J.; PERALVA, S. L. F. S. E REIS, R. C. S. Eficácia do fungo *Metarbizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 em teste de campo com bovinos infestados por carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE). R. bras. Med. Vet. 21: 78-82, 1999.
- BRADY, B.L. Fungi as parasites of insects and mites. Biocont. N. Inform., 2: 281-29, 1981.
- CUISANCE, D., BARRE, N. AND DE KEKEN, R. Ectoparasites of animals: methods of ecological, biological, genetic and mechanical control. Rev. Sci. Tech. 13: 1305-1356, 1994.
- DRUMMOND, R. O., ERNEST, S. E., TREVINO, J. L., GLADNEY, W. J. AND GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae): Laboratory tests of insecticides. J. Econ. Entomol. 66: 130-133, 1973.
- FARIA, M. R., ALMEIDA, D. O. AND MAGALHÃES, B. P. Food Consumption of *Rhammlocerus schistocercoides* Rehn (Orthoptera: Acrididae) Infected by the Fungus *Metarbizium flavoviride* Gams & Rozsypal. An. Soc. Entomol. Brasil. 28: 91-99, 1999.
- FERNANDEZ-RUVALCABA, M.; CRUZ-VAZQUEZ, C.; SOLANO-VERGARA, J. AND GARCIA-VAZQUEZ, Z. Anti-tick effects of *Stylosanthes humilis* and *Stylosanthes hamata* on plots experimentally infested with *Boophilus microplus* larvae in Morelos, Mexico. Exp. Appl. Acarol. 23: 171-175, 1999.
- FRISCH, J. E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. I. J. Parasitol. 29: 57-71, 1999.
- FUXA, J.R. Ecological considerations for the use of entomophagous in IPM. Ann. Rev. Entomol. 32: 225-251, 1987.
- FUXA, J. R. AND TANADA, Y. Epidemiological concepts applied to insect pathology. In: J.R. FUXA AND Y. TANADA. Epizootiology of Insect Diseases. New York: John Willy & Sons, p.3-22, 1987.
- GARCIA, J. F. E OZAKI, L. S. Perspectivas de controle imunológico de carrapatos parasitos de rebanhos bovinos. A H. Vet. 71: 9-12, 1993.
- GOETTEL, M. S.; JOHNSON, D.L. AND INGLIS, G.D. The role of fungi in the control of grasshoppers. Can. J. Bot. 73: S71-S75, 1995.
- GREEN, P. E. AND CONNOLE, D. M. Screening of fungal metabolites for insecticidal activity against the sheep blowfly *Lucilia cuprina* and the cattle tick *Boophilus microplus*. Gen. Appl. Entomol. 13: 11-14, 1981.
- GRONVOLD, J., HENRIKSEN, S. A., LARSEN, M., NANSEN, P. AND WOLSTRUP, J. Biological control. Aspects of biological control – with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. Vet. Parasitol. 64: 47-64, 1996.
- HOGSETTE, J. A. Management of ectoparasites with biological control organisms. Int. J. Parasitol. 29: 147-151, 1999.
- HORN, S. C. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. Inquérito. Secretaria de Defesa Animal do Ministério da Agricultura, Brasília. 1983.
- KHALAF-ALLAH, S.S. Control of *Boophilus microplus* ticks in cattle calves by immunization with a recombinant Bm86 glucoprotein antigen preparation. DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr. 106: 248-251, 1999.
- KUNZ, S. E. AND KEMP, D. H. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. Rev. Sci. Tech. 13: 1249-1286, 1994.
- LUNA, A. L. Características Citológicas e Genéticas de Linhagens Selvagens, Mutantes e Diplóides de *Metarbizium anisopliae* (Metsc) Sorokin. Rio de Janeiro, 1985. 260f Tese (Doutorado), UFRJ, 1985.
- MONTEIRO, A. C., FIORIN, A. C. AND CORREIA, A. C. B. Pathogenicity of isolates of *Metarbizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. Rev. de Microbiol. 29: 109-112, 1998.
- MOREIRA, M.A.B.; MAGALHÃES, B.P.; VALADARES, M.C.C. AND CHAGS, M.C.M. Occurrence of *Metarbizium flavoviride* Gams and *Rozsypal* (Hyphomycetes) on *schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) in Rio Grande do Norte, Brasil. An. Soc. Entomol. 25: 359-361, 1996.
- NARI, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. Vet. Parasitol. 57: 153-165, 1995.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE LA SALUD. Ordenamiento del medio para la lucha antivegetorial, Série de informes técnicos, No. 649, OMS. Ginebra. 1980.
- RAMIREZ, F. Projeto de estudos de Factibilidade para el control de La garapata en Costa Rica. Salva Animal - IICA. Publicação Científica n. 1, 1982.
- SAMISH, M. AND REHACEK, J. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. Annu. Rev. Entomol. 44: 159-182, 1999.
- WAHARTON, R.H. Enfermedades del ganado transmitidas por las garrapatas y sus vectores. S. Resistência a los acaricidas. World Animal Review, Food and Agriculture Organization (FAO). Roma, 36: 8-15, 1983.
- VAZ JÚNIOR, I.S.; TERMIGNONI, C.; MASUDA, A. E OLIVEIRA, P. Vacina contra Carrapato. Biotec. C. Desenv. 13: 18-23, 2000.
- VILAS BOAS, A. M., ANDRADE, R. M. E OLIVEIRA, J. V. Diversificação de meios de cultura para a produção de fungos entomopatogênicos. Arq. Biol. Tec. 39: 123-128, 1996.
- DRIVER, F.; MILNER, R. F. & TRUEMAN, W. H. A taxonomic revision of *Metarbizium* based on a phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequence data. Mycol. Res., v. 104, p. 134-150, 2000.

ARTIGO ENVIADO

Pathogenicity *in vitro* of *Metarrhizium anisopliae*, *Metarrhizium flavoviride* and *Beauveria bassiana* on *Rhipicephalus sanguineus* females from Paraíba Semi-Arid of Brazil

A. C. R. Athayde¹, U. L. Ferreira², C. A. Barreto¹, E. A. de L. A. Lima²,

¹Department of Veterinary Medicine, Campus VII, Federal University of Paraíba, P. O. Box 64, 58.700-000, Patos, Paraíba, Brazil

²Department of Micology, Federal University of Pernambuco, A.: Nelson Chaves, s/n, 50.670-420 Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil

The fungi *Metarrhizium anisopliae*, *Metarrhizium flavoviride* and *Beauveria bassiana* inoculated under form of suspension conidial in engorged females of *Rhipicephalus sanguineus*, collected directly of the animal and maintained to the ambient temperature they presented biocontrol action on this ixodid, increasing the pre-ovipositional period, shortening the ovipositional period, the weight of the mass of eggs and index of production of eggs, as well as they presented a percentage of control that varied between 79.43% and 93.40% in all the treated groups. For the eggs of the inoculated females increase was observed in the pre-hatch and eclosion periods; and one accentuated reduction in the percentage of eclosion, mainly for the treated group with the *M. flavoviride*. The possibility of the use of those entomopathogens for control of this ixodid species, consequently, will favor to the one better safety to the animal and the environment.

KEY WORDS: *Rhipicephalus sanguineus*; *Metarrhizium anisopliae*; *Metarrhizium flavoviride*; *Beauveria bassiana*; biological control; pathogenicity; ovipositional period; pre-hatch period; eclosion.

INTRODUCTION

The ticks are one of the most important ectoparasites, in agricultural zones, of tropical and sub-tropical areas, and they are responsible for severe economic losses, mainly, in what it concerns the pathogens transmission and toxins, as potential vectors (OMS, 1980). The largest damage, caused by the ticks, is due to its ability in transmitting protozooses, rickettsioses and viroses. The annual losses, in the cattle industry of tropical and sub-tropical areas, due to the damages caused by the ticks, are esteemed in million of dollars (OMS, 1977; Frisch, 1999).

The species *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), considered of African origin, has wide geographical distribution, however, limited to tropical and subtropical areas (Hooker *et al.*, 1912), they have great importance in veterinary medicine, because it causes spoliation, being an important vector of pathogenic agents, mainly *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* (Dongus *et al.*, 1996). It is an ixodid with three hosts, that sponges domestic and wild canideos, as well as, african carnivores

¹ To whom correspondence should be addressed at present address: Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av.: Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil, CEP.:50.670-420

(Hoogstraal, 1985). In Brazil, it is distributed in the whole national territory, although the studies concerning its biology are scarce, causing the most severe infestation pictures (Sartor *et al.*, 1996).

The control of ticks is of great importance for the tropical and sub-tropical areas, mainly for the no environmental aggression. However, the still used methods, and many times in a randomly and indiscriminate way, are restricted to applications of synthetic chemical products often associated with manage ways, which induce the appearance of resistant ticks strains to the active chemical of these drugs (Bittencourt *et al.*, 1994; Cuisance *et al.*, 1994; Kunz and Kemp, 1994; Monteiro *et al.*, 1998).

Several methods were developed for the tick control (Garcia and Ozaki, 1993), however, not all was capable to solve the problem, whose immediate solution always is the use of acaricides, determining, among other damages, environmental pollution and permanence of residues in products of animal origin, turning like this, the search of another alternatives for the control of the tick, a fundamental subject (Garcia and Ozaki, 1993; Kunz and Kemp, 1994). The control of the arthropods populations, should be also accomplished, with the purpose of reducing to its maximum levels of population, always, respecting the integrity of the ecosystem and for this, it comes if executing the biological control, as alternative and promising measure (Gronvold *et al.*, 1996; Hogsette, 1999; Samish and Rehacek, 1999). The research about of the microorganisms use, in the control of the ticks, still is incipient, however, several authors have been dedicating to the study of experimental infections of ticks with bacteria and fungi (Bittencourt *et al.*, 1995; Kaaya *et al.*, 1996) and more specifically in dog's tick (Estrada-Peña *et al.*, 1990; Casasolas, 1991), showing promising results.

The present work has the objective, of determine the pathogenic activity of the fungi *M. anisopliae*, *M. flavoviride* and *B. bassiana* under laboratory conditions, on engorged females of *R. sanguineus*, from naturally infected dogs, in domicile behaviour, of Paraiban Semi-Arid, Northeast of Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Organisms. The strains were obtained from the Fungi Culture Collection, Micoteca (URM), of the Department of Micology at the Federal University of Pernambuco. The *M. anisopliae* PL₄₃, isolated from *Mahanarya posticata*, of the Alagoas state), the *M. flavoviride* BR₁, isolated from *Schistocerca pallens*, of the Rio Grande do Norte state and the *B. bassiana* CL₁, isolated from *Castnia licus*, of the Pernambuco state, under the access numbers URM-3349, URM-3800 and URM-3447; respectively.

Preparation of the inoculum for the conidia production. For the fungus *M. anisopliae*, the substratum brittle rice was used, for the *M. flavoviride*, the pea and for the *B. bassiana*, the rice, being followed the methodology of Villas Boas *et al.* (1996).

Samples of Rhipicephalus sanguineus. For each treatment, five engorged female and 200 mg of ticks eggs treated previously, with *M. anisopliae*, *M. flavoviride* and *B. bassiana* were used.

(Hoogstraal, 1985). In Brazil, it is distributed in the whole national territory, although the studies concerning its biology are scarce, causing the most severe infestation pictures (Sartor *et al.*, 1996).

The control of ticks is of great importance for the tropical and sub-tropical areas, mainly for the no environmental aggression. However, the still used methods, and many times in a randomly and indiscriminate way, are restricted to applications of synthetic chemical products often associated with manage ways, which induce the appearance of resistant ticks strains to the active chemical of these drugs (Bittencourt *et al.*, 1994; Cuisance *et al.*, 1994; Kunz and Kemp, 1994; Monteiro *et al.*, 1998).

Several methods were developed for the tick control (Garcia and Ozaki, 1993), however, not all was capable to solve the problem, whose immediate solution always is the use of acaricides, determining, among other damages, environmental pollution and permanence of residues in products of animal origin, turning like this, the search of another alternatives for the control of the tick, a fundamental subject (Garcia and Ozaki, 1993; Kunz and Kemp, 1994). The control of the arthropods populations, should be also accomplished, with the purpose of reducing to its maximum levels of population, always, respecting the integrity of the ecosystem and for this, it comes if executing the biological control, as alternative and promising measure (Gronvold *et al.*, 1996; Hogsette, 1999; Samish and Rehacek, 1999). The research about of the microorganisms use, in the control of the ticks, still is incipient, however, several authors have been dedicating to the study of experimental infections of ticks with bacteria and fungi (Bittencourt *et al.*, 1995; Kaaya *et al.*, 1996) and more specifically in dog's tick (Estrada-Peña *et al.*, 1990; Casasolas, 1991), showing promising results.

The present work has the objective, of determine the pathogenic activity of the fungi *M. anisopliae*, *M. flavoviride* and *B. bassiana* under laboratory conditions, on engorged females of *R. sanguineus*, from naturally infected dogs, in domicile behaviour, of Paraíba Semi-Arid, Northeast of Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Organisms. The strains were obtained from the Fungi Culture Collection, Micoteca (URM), of the Department of Micology at the Federal University of Pernambuco. The *M. anisopliae* PL₄₃, isolated from *Mahanarya posticata*, of the Alagoas state), the *M. flavoviride* BR₁, isolated from *Schistocerca pallens*, of the Rio Grande do Norte state and the *B. bassiana* CL₁, isolated from *Castnia licus*, of the Pernambuco state, under the access numbers URM-3349, URM-3800 and URM-3447, respectively.

Preparation of the inoculum for the conidia production. For the fungus *M. anisopliae*, the substratum brittle rice was used, for the *M. flavoviride*, the pea and for the *B. bassiana*, the rice, being followed the methodology of Villas Boas *et al.* (1996).

Samples of *Rhipicephalus sanguineus*. For each treatment, five engorged female and 200 mg of ticks eggs treated previously, with *M. anisopliae*, *M. flavoviride* and *B. bassiana* were used.

Groups. Four groups were formed: a control, one that received a treatment with *M. anisopliae*, other with *M. flavoviride* and another with *B. bassiana*.

Concentration of spores used. For preparation of the suspension the methodology of Villas Boas *et al.* (1996) was proceeded, and after quantification, the concentrations were adjusted to 7.85×10^6 conidia/ml for *M. anisopliae*, 2.54×10^6 conidia/ml for *M. flavoviride* and 1.54×10^6 conidia/ml for *B. bassiana*.

Infection of engorged females of Rhipicephalus sanguineus. The ticks were immersed, for five seconds, in 10 ml of the spores suspensions (Drummond *et al.*, 1973; Green and Connole 1981).

Evaluation of the isolates. After the infection, the females of *R. sanguineus*, were kept in a room to RH 88% and $27 \pm 1^\circ\text{C}$ for 28 days. The eggs, also, stayed in this room for 21 days. The mortality and the ovipositing absence, in the females, were checked every other day. To determine the prehatch period and the percentage of the eclosion, the eggs were also observed every other day.

Statistical analysis. The pathogenic activity of the entomopathogenic fungi, was demonstrated, through the significant statistical difference, observed between the control group and the treatments with the isolated ones used. The experiment followed a randomized model, composed by 03 treatments (isolates) and 05 individuals in each ones. Means were compared by the Tukey test at 5% level of significance.

RESULTS

The pathogenic activity of *M. anisopliae*, *M. flavoviride* and *B. bassiana*, on engorged females of *R. sanguineus*, was illustrated in Table 1. Where could be observed, pre-ovipositional period, ovipositional period, egg mass weight, production index of eggs and control percentage. When analyzing the exposed data, it is easy to verify, the effective action of the fungi, mainly of *B. bassiana*.

Table 1
Pathogenic activity of *Metarrhizium anisopliae*, *Metarrhizium flavoviride* and *Beauveria bassiana* on engorged females of *Rhipicephalus sanguineus* under laboratory conditions

Parameters	Control	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. flavoviride</i>	<i>B. bassiana</i>
Pre-ovipositional period (days)	5.00c	6.00b	4.80c	8.00a
Ovipositional period (days)	12.00a	7.00b	11.40a	5.00c
Egg mass weight (mg)	100.26a	52.67bc	68.00b	40.22c
Production index of eggs (%)	76.96a	40.28bc	51.30b	29.77c
Control Percentage (%)		79.43b	90.41a	93.90a

Values followed by the different letters for line differ to each other at the level of 5%

In relation to the biology of eggs of infected engorged females of *R. sanguineus*, the Table 2 display with clarity the surprising action of the fungus *M. flavoviride* on the other used fungi, although, it was verified the action of *M. anisopliae* and *B. bassiana*.

Table 2

Pathogenic activity of *Metarrhizium anisopliae*, *Metarrhizium flavoviride* and *Beauveria bassiana* on eggs of infected engorged females of *Rhipicephalus sanguineus* under laboratory conditions

Parameters	Control	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. flavoviride</i>	<i>B. bassiana</i>
Prehatch period (days)	12.00d	15.00c	17.60b	20.00a
Eclosion (days)	11.00c	16.00b	5.60d	19.00a
Percentage of eclosion (%)	99.80a	39.80b	17.00d	20.80c

Values followed by the different letters for line differ to each other at the level of 5%

DISCUSSION

Although it has not observed mortality rate in the treated groups, probably due to the used dose, it was pointed out the effective action of the fungi on the diverse phases of the biology of the *R. sanguineus*. The average ovipositional period, it was increased in the treated groups in relation to the control, data registered by Bittencourt *et al.* (1994), for *Boophilus microplus* treated with *M. anisopliae*, with exception for the *M. flavoviride* group. The average ovipositional period in the treated groups, it diminished to seven and five days in the treated groups with *M. anisopliae* and *B. bassiana*, respectively, likely to that happened with ticks groups submitted at the stress in the works of Singh and Chhabra (1991) and Bittencourt *et al.* (1994), for the species *B. microplus*, however, the treated group with *M. flavoviride* differed of the control. The weight of the eggs mass, almost reduced a half in the treated groups in relation to the control, mainly with the group treated with *B. bassiana* where there was a reduction of approximately 60%.

The production index of eggs, was of 40.28%; 51.30%; 29.77% and 76.96%, for the treated groups with *M. anisopliae*, *M. flavoviride*, *B. bassiana* and the control, respectively.

The control percentage in the treated group with the *M. anisopliae* and *M. flavoviride*, was 79.43%; 90.41% and of 93.40% for the group treated with *B. bassiana*.

The prehatch medium period in the treated groups, in relation to the control presented a discreet increase, although, the found data are considered normal for the species (Dipeolu, 1991; Belatto and Daemon, 1997). The observed data, are in agreement with obtained by Bittencourt *et al.* (1994), for the species *B. microplus*, infected with *M. anisopliae* and by Monteiro *et al.* (1998), for *R. sanguineus*, infected with *M. anisopliae* and *B. bassiana*. In this way, also, it happened with the average

eclosion period, that showed in the treated groups, but in the group treated with *M. flavoviride* presented shorts periods. The percentage of medium eclosion, it was indeed reduced in the treated groups, data that corroborate Bittencourt *et al.* (1994) for *B. microplus* infected with *M. anisopliae* and Kaaya *et al.* (1996), for *Rhipicephalus apendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, infected with *B. bassiana* and *M. anisopliae*. The smallest percentage was observed in the group infected with *M. flavoviride*, that only reached 17%.

Summarizing, the data obtained in this study suggests that the fungus *M. anisopliae* and *B. bassiana*, are effective, even in the concentrations of 10^6 and at natural temperature for ticks of the genus *Rhipicephalus* from semi-arid of Paraíba, northeast of Brazil. And that *M. flavoviride* shaws good potential action on this tick, shimmering in this sorts a new alternative for the control of this ixodid.

REFERENCES

- Belatto, V. and Daemon, E. 1997. Efeitos de três temperaturas sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 6, 21-27.
- Bittencourt, V. R. E. P. , Massard, C. L. and Lima, A. F. 1994. Ação do fungo *Metarrhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. *Rev. da Univers. R. Série Ciência da Vida* 16, 49-55.
- Bittencourt, V. R. E. P. , Peralva, S. L. F. da S. , and Viegas, E. de C. 1995. Eficácia "in vitro" dos isolados 747 e 986 do fungo *Beauveria bassiana* no carrapato *Boophilus microplus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 4, 86 (Supl.).
- Casasolas-Oliver, A. 1991. Pathogenicity of *Rhizopus thailandensis* on engorged females of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks. Host-pathogen interaction. *Rev. Iberoamericana. Micol.* 8, 75-78.
- Cuisance, D. , Barre, N. , and de Deken, R. 1994. Ectoparasites of animals: methods of ecological, biological, genetic and mechanical control. *Rev. Sci. Tech.* 13, 1305-1356.
- Dipeolu, O.O. 1991. Laboratory studies on the oviposition, egg-sizes and shapes and embryonic development of *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma maculatum*. *Acarology*. 32, 233-244.
- Dongus, H. , Zahler, M. , and Gothe, R. 1996. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodidae), in Germany: na epidemiologic study and control measures. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 109, 245-248.

- Drummond, R. O. , Ernest, S. E. , Trevino, J. L. , Gladney, W. J. , and Graham, O H. 1973. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae): Laboratory tests of insecticides. *J. Econ. Entomol.* **66**, 130-133.
- Estrada-Peña, A. , Gonzales, J. , and Casasolas, A. 1990. The activity of *Aspergillus ochraceus* (Fungi) on replete females of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in natural and experimental conditions. *Folia Parasitol.* **37**, 331-336.
- Frisch, J. E. 1999. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. *Int. J. Parasitol.* **29**, 57-71.
- Garcia, J. F. and Ozaki, L. S. 1993. Perspectivas de controle imunológico de carrapatos parasitos de rebanhos bovinos. *A H. Vet.* **71**, 9-12.
- Green, P. E. , and Connole, D. M. 1981. Screening of fungal metabolites for insecticidal activity against the sheep bowfly *Lucilia cuprina* and the cattle tick *Boophilus microplus*. *Gen. Appl. Entomol.* **13**, 11-14.
- Gronvold, J. , Henriksen, S. A. , Larsen, M. , Nansen, P. , and Wolstrup, J. 1996. Biological control. Aspects of biological control – with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Vet. Parasitol.* **64**, 47-64.
- Hogsette, J. A. 1999. Management of ectoparasites with biological control organisms. *Int. J. Parasitol.* **29**, 147-151.
- Hoogstraal, H. 1985 Ticks. In: Gaafar, S. M.; Howard, W. E.; Marsh, R. E., Eds. Parasites, pests and predators. Netherlands: Elsevier. 575p.
- Hooker, W. A. , Bishop, F. C. and Wood, H. P. 1912. The life history and bionomics of some North American ticks. United State Reportment of Agriculture. 239 p.
- Kaaya, G. P. , Mwangi, E. N. , and Ouna, E. A. 1996. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol.* **67**,15-20.
- Kunz, S. E. , and Kemp, D. H. 1994. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Rev. Sci. Tech.* **13**, 1249-1286.
- Monteiro, S. G.; Bittencourt, V. R. E. P.; Daemon, E.; Faccini, J. L. H. 1998. Efeito dos Fungos *Metarrhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em ovos de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Ciência. R.* **28**, 461-466
- Monteiro, A C. , Fiorin, A C. e Correia, A C. B. 1998. Pathogenicity of isolates of *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus*

microplus (Can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Rev. Microbiol.* **29**, 109-112.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE LA SALUD. 1977. Zoonoses Y Enfermedades transmissibles comunes ao hombre Y a los animales por Pedro Acha e Boris Szyfrees, Publicacion cientifica, No. 354, OMS. Washington.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE LA SALUD. 1980. Ordenamiento del medio para la lucha antivectorial, Série de informes técnicos, No. 649, OMS. Ginebra.

Samish, M. , and Rehacek, J. 1999. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annu. Rev. Entomol.* **44**, 159-182.

Sartor, A. A. , Cunha, D. W. da, and Daemon, E. 1996. Aspectos da biologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório: fase parasitária de larvas, ninfas e fêmeas e não parasitária de larvas e ninfas. *Rev. Bras. Med. Vet.* **18**, 14-17.

Singh, S. and Chhabra, M. B. 1991. Ovipositional biology of *Rhipicephalus sanguineus* *Rhipicephalus sanguineus* (Acarina: Ixodidae) in laboratory. *Int. J. Parasitol.* **15**, 57-60.

Vilas Boas, A. M. , Andrade, R. M. and Oliveira, J. V. 1996. Diversificação de meios de cultura para a produção de fungos entomopatogênicos. *Arq. Biol. Tec.* **39**, 123-128.

Table 1

Pathogenic activity of *Metarrhizium anisopliae*, *Metarrhizium flavoviride* and *Beauveria bassiana* on engorged females of *Rhipicephalus sanguineus* under laboratory conditions

Parameters	Control	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. flavoviride</i>	<i>B. bassiana</i>
Pre-ovipositional period (days)	5.00c	6.00b	4.80c	8.00a
Ovipositional period (days)	12.00a	7.00b	11.40a	5.00c
Egg mass weight (mg)	100.26a	52.67bc	68.00b	40.22c
Production index of eggs (%)	76.96a	40.28bc	51.30b	29.77c
Control		79.43b	90.41a	93.90a
Percentage (%)				

Values followed by the different letters for line differ to each other at the level of 5%

Table 2

Pathogenic activity of *Metarrhizium anisopliae*, *Metarrhizium flavoviride* and *Beauveria bassiana* on eggs of infected engorged females of *Rhipicephalus sanguineus* under laboratory conditions

Parameters	Control	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. flavoviride</i>	<i>B. bassiana</i>
Prehatch period (days)	12.00d	15.00c	17.60b	20.00a
Eclosion (days)	11.00c	16.00b	5.60d	19.00a
Percentage of eclosion (%)	99.80a	39.80b	17.00d	20.80c

Values followed by the different letters for line differ to each other at the level of 5%

JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY

Information for Authors

The Journal of Invertebrate Pathology presents articles and notes on all aspects of original research concerned with the causations and manifestations (including immunologic responses) of infectious and noninfectious diseases of invertebrates, the suppression of such diseases in beneficial species, and the use of these diseases in controlling undesirable species such as agricultural pests and vectors of pathogens transmissible to other organisms. In addition, this journal publishes the results of biochemical, physiological, morphological, genetic, and ecological studies as related to the etiologic agents of diseases of invertebrates. The Journal is particularly dedicated to the publication of contributions of a basic and fundamental nature, although it will accept suitable articles pertaining to the applications of invertebrate pathology. The Editor-in-Chief and members of the Editorial Board will examine contributions from any qualified worker in any country of the world. Articles will be published in English.

Submission of manuscripts. Five copies of the manuscript should be submitted to:

Journal of Invertebrate Pathology
Editorial Office
525 B Street Suite 1900
San Diego, California 92101-4495
Telephone: (619) 699-6469
Fax: (619) 699-6859

e-mail: jip@acad.com

Inquiries concerning subscriptions and business matters should be addressed to the Publishers.

Original papers only will be considered. Manuscripts are accepted for review with the understanding that the same work has not been published nor is presently submitted elsewhere, and that its submission for publication has been approved by all of the authors and by the institution where the work was carried out; further, that any person cited as a source of personal communications has approved such citation. Written authorization may be required at the Editor's discretion. Articles and any other material published in the Journal of Invertebrate Pathology represent the opinions of the author(s) and should not be construed to reflect the opinions of the Editor(s) and the Publisher.

Authors submitting a manuscript do so on the understanding that if it is accepted for publication, copyright in the article, including the right to reproduce the article in all forms and media, shall be assigned exclusively to the Publisher. The Publisher will not refuse any reasonable request by the author for permission to reproduce any of his or her contributions to the journal.

Authors are asked to suggest the names, addresses, telephone numbers, and e-mail addresses of three to five potential reviewers.

Form of manuscript. Manuscripts should be typewritten, on good quality bond paper, with wide margins and double or triple spacing throughout. All pages should be numbered consecutively. It is recommended that articles be subdivided into Summary, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussions, Acknowledgments, and References. The manuscript must begin with a Summary. Any reviewing of the literature should be restricted to closely pertinent papers. The typescript should be carefully checked for errors of content and English phraseology before it is submitted. Corrections in proofs in excess of 10% of the cost of composition of the original manuscript will be charged to authors. The manuscript should carry the name and address (including zip code), telephone number and telex or fax number of the person to whom proofs are to be sent, and a shortened version of the paper's title, not exceeding 55 letters and spaces in length, suitable for a running title. When reporting quantitative data, the author should include the number of individual observations, the arithmetic mean value, and the standard deviation (or the standard error of the mean). When reporting differences between means, the level of significance should be indicated.

A useful writing guide is the latest edition of the "CBE Style Manual," 1983, published by the Council of Biology Editors. This Manual should also be used as a guide to most abbreviations employed. Proprietary substances and trade names must be accompanied (at the first mention) by the chemical name.

Key words. Each article must include a list of key words. The key words should include the taxonomic designations of organisms, both host and pathogen(s), mentioned in the text and the major subject matter, e.g., castration, parasitic; biological control; or nuclear polyhedrosis virus, pathogenicity of. The names of enzymes, substrates, and other important compounds should also appear in the list of key words. The key words should be typed double-spaced on a separate sheet of paper. The following is an example of the style to be employed: *Bacillus thuringiensis*; *Plodia interpunctella*; storage moth; biological control; endotoxin, bacterial epizootic.

Figures. Number figures with Arabic numerals in order of appearance in the text. Type all legends consecutively on a separate sheet. Plan all figures to fit the proportions of the printed page (7 1/8 x 9 in.; 18.2 x 23 cm). All illustrations should be in finished form suitable for reproduction and no larger than 8.5 x 11 in. (21.6 x 28 cm). Identify all figures on the back lightly in soft pencil with the author(s) name(s) and figure number; indicate the TOP.

Lettering on drawings should be of professional quality or generated by high-resolution computer graphics and should be large enough (10-12 points) to take a reduction of 50 to 60%. Freehand, penciled, or typewritten lettering is not acceptable.

Drawings should be made in India ink on tracing linen, smooth-surface white paper, or Bristol board. Alternatively, high-quality computer graphics (laser, line drawing, but not dot-matrix) may be acceptable. Symbols used to identify points within a graph should be large enough that they will be easily distinguishable after reduction. Plot graphs on blue coordinate or white paper. Grid lines that are to reproduce must be shown in black. All drawings may be submitted as glossy prints.

Photocopies submitted as original artwork are not acceptable.

Halftone photographs should be on glossy paper and as rich in contrast as possible. Only those parts of the photograph that are necessary to illustrate the matter under discussion should be submitted. Areas that are not essential should be cut off. Providing an overlay that indicates the most critical areas of halftones will aid in ensuring high-quality reproduction. All copies of halftone artwork must be glossy prints or originals; photocopies of halftones do not show sufficient detail to be used for the review process.

Five sets of figures should be submitted: four sets mounted for reviewers' use, and one set unmounted for publication.

Illustrations in color can be accepted only if the authors defray the cost.

Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals in order of appearance in the text and collected at the end of the manuscript. Type each table double-spaced on a separate page with a short descriptive caption typed directly above the table and with any necessary footnotes (indicated by superscript lowercase italic letters) typed directly below the table. Tables should be understandable without reference to the text.

References. Names of the authors should be mentioned in the text, with the year of publication in parentheses. References should be listed alphabetically at the end of the paper according to the form used in a recent number of the Journal. The names of journals should be abbreviated according to Chemical Abstracts Service Source Index, 1985. Note the following styles to be used:

Federici, B. A. 1981. Mosquito control by the fungi *Culicinomyces*, *Lagenidium* and *Coelomomyces*. In "Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980" (H. D. Burges, Ed.), pp. 555-572. Academic Press, New York.

Han, R., Wouts, W. M., and Li, L. 1991. Development and virulence of *Heterorhabditis* spp. strains associated with different *Xenorhabdus luminescens* isolates. *J. Invertebr. Pathol.* 58, 27-32.

Saleuddin, A. S. M., and Wilbur, K. M. 1983. "The Mollusca," Vol. 4, "Physiology," Part 1. Academic Press, New York.

Nomenclature. Binomial Latin names should be used in accordance with International Rules of Nomenclature. The first time a binomial is used it should be fully spelled out. In papers largely taxonomic in nature the names (fully spelled out) of the authors of the scientific names should be used, otherwise the names of authors should be omitted.

Notes. Manuscripts for NOTES should be less than 500 words in length

PUBLICAÇÕES EM CONGRESSOS

Pôsteres

SESSÃO DE PÔSTERES

As sessões de pôsteres trazem, de forma conjunta, os trabalhos inéditos, submetidos pelos pesquisadores, e os trabalhos da 10ª Jornada Nacional de Iniciação Científica, submetidos pelas Instituições, que são identificados pela numeração acima de 10000 no seu código, exemplo: 10002-G.5.3.

16

quarta

10482-C.2.3 (UECE) Lima, I. G. E.; Lima, C. C.; Lima, A. A. M.; Cardoso, J. H. L. - PARTICIPAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA DEPRESSÃO DA CONTRATILIDADE INTESTINAL PROMOVIDA PELA TOXINA A DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE

Bioquímica - C.3

10260-C.3.4 (UNIMEP) Estrela, H. E. G.; Ruggiero, A. C.; Nepomuceno, M. de F. - O SISTEMA ANTIOXIDANTE ENDÓGENO E COMPONENTES ORIUNDOS DA DIETA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE INTENSO INDUZIDO *in vivo*

10455-C.3.4 (UFERS) Roehrig, C.; Costa, F. da; Scheibel, I.; Schweigert, I.; Souza, K. de; Chmitt, L.; Berleze, K.; Perry, M. L. S. - OXIDAÇÃO DE ACETATO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE POTÁSSIO POR CÓRTEX CEREJAL DE RATOS ADULTOS NORMONUTRIDOS E DESNUTRIDOS

2180-C.3.5 (UFMA) Pinheiro, M. T.; Silva, A.; Bezerra, W. C. - EXTRAÇÃO E FRACTIONAMENTO DE COLÁGENOS PISCOSOS: *Cynoscion acoupa*, *Cynoscion leiarchus* E *Atrus parkeri*

2901-C.3.5 (UFPE) Maciel, E. V. M.; Araújo-Filho, V. S. de; Nakazawa, M.; Gomes, Y. de M.; Coelho, L. C. B. R.; Correia, M. L. dos S. - DETERMINAÇÃO DO EFEITO MITOGENICO DA LECTINA DE *Cratylia mollis* (FEIJÃO-CAMARATU) SOBRE LINFOCITOS HUMANOS

5246-C.3.5 (UFC) Sombra, C. M. L.; Marinho, L. S.; Moreno, E. B. M. B.; Castellon, R. E. R.; Benevides, R. G.; Sousa Filho, J. H. de; Nagano, C. S.; Goersch, G. V.; Bloch Junior, C.; Cavada, B. S. - PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DUAS DEFENSINAS (GAMATONINAS) DE SEMENTES DE *Chitoria lanceolata*

5399-C.3.5 (UFC) Gadelha, L. S.; Aragão, K. S.; Sousa Filho, J. H. de; Oliveira, C. C. de; Gadelha, C. A. de A.; Pinto, L. S.; Galvani, F. R.; Teixeira, E. H.; Martins, J. L.; Cavada, B. S. - LECTINA DE GLUTELINA ÁCIDA ISOLADA DE SEMENTES DE *Acacia farnesiana*

5416-C.3.5 (UFC) Bezerra, D. P.; Leite, K. B.; Macedo, N. M. R.; Oliveira, T. M. de; Bezerra, G. A.; Carneiro, V. A.; Gadelha, L. S.; Nunes, E. de P.; Cavada, B. S. - ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICO-QUÍMICA DE UMA LECTINA DE SEMENTES DE *Machaerium acutifolium* (LEGUMINOSAE, PAPILIONOIDEAE-DALBERGIEAE)

5549-C.3.5 (UFC) Bezerra, D. P.; Leite, K. B.; Aragão, K. S.; Nagano, C. S.; Nascimento, K. S. de; Teixeira, E. H.; Goersch, G. V.; Gadelha, C. A. de A.; Nunes, E. de P.; Cavada, B. S. - CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA LECTINA DE SEMENTES DE *Lonchocarpus sericeus*, COMPARADA COM A LECTINA DE *Vatairea macrocarpa*

10719-C.3.5 (USP) Sorgi, C. A.; Lodi, W. R. N. - AS VIAS PROTEOLÍTICAS VASCULARES E PROTEOSSÔMICA DURANTE AS FASES DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR DA BLASTOCULADIELLA EMERSONI

Botânica - C.4

5290-C.4.3 (UFPR) Bröske, J. A.; Ribas, L. L. E. - EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE PRÓBA-ROSA (*Aspidosperma polyneuron* MULL. ARG.)

5794-C.4.3 (UEMA) Santos, M. C. da S.; Nascimento, I. de O.; Dias, V. L. N. - COMPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CLOROFILA NA ESPÉCIE HORTÍCOLA, *Lactuca sativa* CULTIVADAS EM QUATRO HORTAS EM LOCALIZAÇÕES DIFERENTES NO MUNICÍPIO DE IMPERATRIZ/MA

10612-C.4.3 (USP) Cassamassimo, R. E.; Blok, C.; Gonçalves, A. N. - MEDIÇÃO DO USO DE OXIGÊNIO POR RAÍZES POR MÉTODO NÃO DESTRUTIVO

5407-C.4.5 (UFPE) Lima, M. do L. E.; Brasileiro, B. T. R. V.; Lima, E. A. de L. A.; Oliveira, N. T. de - DIFERENCIAÇÃO DE *Metarrhizium* PELA TÉCNICA RAPD

5564-C.4.5 (UFPE) Ferreira, U. L.; Lima, M. do L. E.; Pereira, K. C. A.; Lima, E. A. de L. A.; Athayde, A. C. R. - CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE LINHAGENS DE *Metarrhizium anisopliae* VAR. *acridum*

1208-C.4.6 (UFMA) Caridade, E. de O.; Almeida, I. C. S.; Carvalho, A. P. P.; Ferreira-Correia, M. M. - VARIAÇÃO HORIZONTAL DO FITOPLÂNTON DA COSTA MARANHENSE (ENTRE A BAÍA DE SÃO MARCOS/MA E PARCEL MANOEL LUIS/MA)

1211-C.4.6 (UFMA) Caridade, E. de O.; Almeida, I. C. da S.; Ferreira-Correia, M. M. - TAXONOMIA DE MACROALGAS DOS MANGUEZAIS DA BAÍA DE TURIAQU-MA

1580-C.4.6 (ITEP) Cunha, M. C. C.; Arruda, H. da C.; Molica, R. J. R. - FITOPLÂNTON DE ALGUNS RIOS E RESERVATÓRIOS DO SEMI-ÁRIDO DE PERNAMBUCO

Ecologia - C.5

4505-C.5.2 (UEPB) Dantas, E. W.; Barbosa, I. E. de L. - A COMUNIDADE DE ALGAS PERIFÍTICAS NA BIOINDICAÇÃO E NO MONITORAMENTO DOS IMPACTOS ANTRÓPICOS CAUSADOS NO RIO JAPEROA

4990-C.5.2 (SLPR) Souza Filho, J. E. de.; Silva, A. K. P. da; Soares, C. M. A.; Fernandes, M. L. B. - AMPHIPODA GAMMARÍDEA ACOMPANHANTES EM COMUNIDADE INCRUSTANTES DA ÁREA PORTUÁRIA DE SUAPE, PE, BRASIL

5029-C.5.2 (FFPM) Pedrosa, I. M. de L.; Nery, P. P. C. E.; Fernandes, M. L. B.; Silva, A. K. P. da - ESTUDO PRELIMINAR DA FAUNA INCRUSTANTE DAS PILASTRAS DO PORTO DE SUAPE - PE

10280-C.5.2 (UNIRIO) Silva, E. S. da; Veloso, V. G. - ECOLOGIA TROPICAL DE DUAS PRAIAS ARENOSAS EXPOSTAS DO LITORAL DO RIO DE JANEIRO

10288-C.5.2 (UESC) Tedesco, E. C.; Ribeiro, S. M. M. S. - CARACTERIZAÇÃO ESPÉCIFICA E ECOLÓGICA DO FITOPLÂNTON NO LITORAL SUL DA BAHIA

10479-C.5.2 (UEMA) Souza, R. A. de; Marques, M. M.; Latini, A. O.; Barbosa, F. A. R. - MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS COMO DISCRIMINANTES PARA AS CLASSES DE ÁGUA DOCE PROPOSTAS NA RESOLUÇÃO 02/86 CONAMA

10555-C.5.2 (UESB) Irindade, M. E. de L.; Lucá-Chagas, R. - ECOLOGIA TROPICAL DE *Serrasalminus brandtii* E *Pygocentrus nattereri* (PISCES, CHARACIDAE, SERRASALMINAE) NO RIO DE CONTAS, BA

10792-C.5.2 (UEAD) Cunico, A. M.; Agostinho, A. A. - VARIAÇÕES ESPACIAIS NOS PADRÕES MORFOLÓGICOS DE PLUXES E SUAS RELAÇÕES COM A HIDRODINÂMICA E OS PROCESSOS SUCESSIONAIS EM RESERVATÓRIOS

10936-C.5.2 (PUC/CAMPINAS) Rissato, F. V.; Siro, O. L.; Ferreira, L. L. - ESTUDO DO CICLO REPRODUTIVO DE LEPORINUS OCTOFASCIATUS NO RESERVATÓRIO DE JAGUARI, SP

11022-C.5.2 (UMESP) Jorgin, E.; Santos, A. S.; Neuherger, W. M. M. - CONSERVAÇÃO DAS TARTARUGAS MARINHAS NA BASE PRAIA DO FORTE/BA - RESULTADOS DA TEMPORADA REPRODUTIVA 2001/2002

611-C.5.3 (UNIT) Avelar, J. B.; Araújo, E. D. de - AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO GEOGRÁFICA DE ABELHAS AFRICANIZADAS NO BRASIL A PARTIR DE DADOS MORFOMÉTRICOS

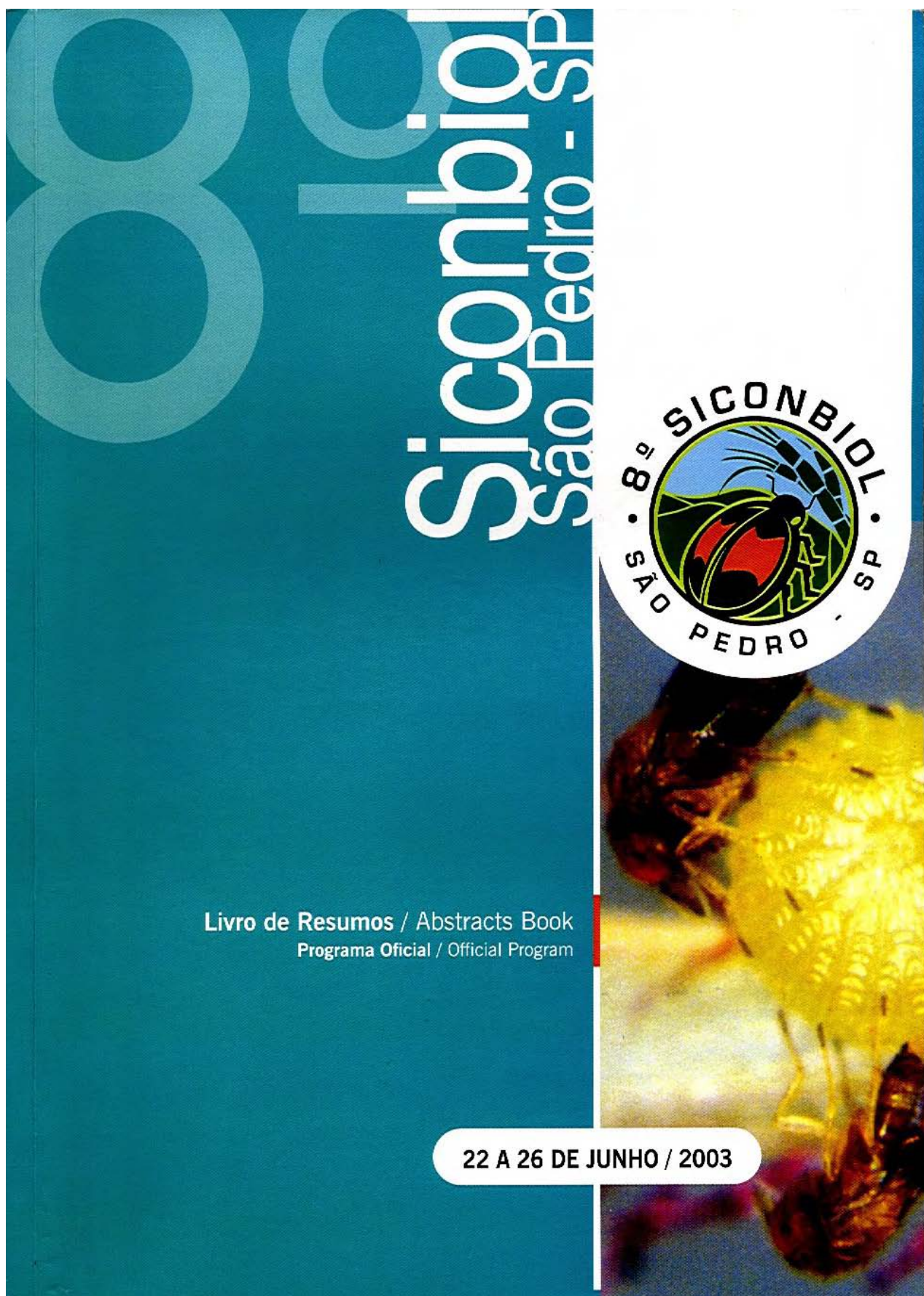
1026-C.5.3 (MPEG) Giarrizzo, T.; Martins, M. B. - ABUNDÂNCIA E COMPOSIÇÃO DE DROSOPHILA NA ESTRATIFICAÇÃO VERTICAL DE UMA FLORESTA TROPICAL DE TERRA FIRM E EM CAXIUANÁ, MELGAÇO, PARÁ, BRASIL

Farmacologia - C.6

3590-C.6.4 (UNICAP) Aguiar, J. dos S.; Costa, M. do C. C. D.; Ribeiro, K. X. F.; Chiappeta, A. de A. - ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN (VERBENACEAE)

3686-C.6.4 (UFC) Moraes, I. M. de; Bezerra, E. C.; Moura, C. T. M.; Costa, F. F. A.; Pinheiro, A. de S.; Capaz, F. R. - DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA AUTOMÁTICO DE BAIXO CUSTO PARA A INALAÇÃO CRÔNICA DE FÁRMACOS

3890-C.6.4 (UECE) Lima, R. de E.; Miranda, A. V. de; Assreuy, A. M. S.; Criddle, D. N. - STÉVIOSSÍDEO INDUZ RELAXAMENTO EM FUNDO DE ESTÔMAGO DE RATO



Controle Microbiano

CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA LIPOLÍTICA DE LINHAGENS DE *Metarrhizium anisopliae* var. *acridum*

U. L. Ferreira¹, A. C. de Albuquerque¹, E. A. de L. Alves-Lima¹, J. C. Almeida²,
¹Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, (50.670-420)
 Recife, PE, ubiranyferreira@hotmail.com

²Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, (50.670-420)
 Recife, PE, cezarioja@bol.com.br

Entre a diversidade de doenças que atacam os insetos, os fungos entomopatogênicos merecem destaque, sendo responsáveis por 80% das mesmas. Dos gêneros com grande importância econômica aqui no Brasil, incluem-se *Metarrhizium*, *Cordyceps* e *Beauveria*, que são amplamente distribuídos na natureza e encontrados nos solos, onde sobrevivem por longo período. A patogenicidade de *Metarrhizium anisopliae* já foi evidenciada em insetos-praga como *Deois flavopicta*, *Solenopsis* sp., *Reticulitermes flavipes*, *Cryptotermes* sp. e outros. *M. flavoviride* está sendo aplicado nos dias atuais como bioinseticida em alguns países africanos. Para que o fungo possa provocar doença se faz necessário que ele penetre na cutícula do inseto, para tal, é necessário a produção de enzimas que vão digerir a cutícula. Algumas pesquisas apontam a existência de uma correlação positiva entre a produção elevada de enzimas "in vitro" e a elevada virulência do fungo. É importante se desenvolver pesquisas para identificar linhagens com alta produção enzimática, que poderá propiciar a seletividade das mesmas, na utilização em programas de controle biológico, sobre uma quantidade maior de pragas agrícolas e veterinárias. Com base em tais informações, este trabalho teve por objetivo determinar a atividade lipolítica produzida por nove linhagens de *M. anisopliae* var. *acridum*, observadas durante 5, 10 e 15 dias em meio basal sólido. Para que se determinasse a atividade lipolítica das linhagens (288, 288A, 291, 291B, 434, 434C, 442, 442D e 439) inoculou-se discos das referidas linhagens em meio basal específico e observou-se a formação de halos de degradação aos 5, 10 e 15 dias após a inoculação, onde a sua mensuração foi realizada com o auxílio de uma régua milimetrada e os seus resultados expressos em cm, com 6 repetições para cada linhagem estudada. As linhagens 288A, 291B, 434C e 442D foram reisoladas de *Boophilus microplus*. Observou-se que aos 5 dias as linhagens 288, 288A, 291, 291B, 434, 434C, 442, 442D e 439 apresentaram os diâmetros de 2,16, 2,39, 1,22, 2,36, 1,96, 2,51, 1,28, 2,18 e 0,87 cm respectivamente. Enquanto que aos 10 dias de observação, as mesmas linhagens apresentaram um diâmetro de halo respectivo de 3,75, 3,35, 2,10, 2,50, 4,40, 2,70, 1,47, 2,52 e 1,34. Resultados superiores foram observados aos 15 dias, onde as linhagens acima citadas apresentaram os seguintes diâmetros: 4,62, 3,91, 2,72, 3,07, 4,95, 3,37, 2,20, 3,47 e 1,48 respectivamente. Conforme os dados obtidos pode-se concluir que: a linhagem 434 demonstrou a maior atividade lipolítica aos 15 dias e a linhagem 439 a menor, e que todas as linhagens estudadas apresentaram atividade lipolítica nas condições estabelecida para este trabalho.

Palavras-chave: Atividade lipolítica, controle biológico, fungo entomopatogênico.

EFEITO DO CONTROLE BIOLÓGICO NATURAL E DO BACULOVÍRUS SOBRE *Spodoptera frugiperda* NA CULTURA DO MILHO
 EFFECT OF NATURAL BIOLOGICAL CONTROL AND BACULOVIRUS ON *Spodoptera frugiperda* ON MAIZE CROP

M. de L. C. Figueiredo¹, A. M. P. M. Dias², I. Cruz¹

¹Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, 35700-970, Sete Lagoas, MG
 lude@cpmns.embrapa.br

² DEBE/UFSCar, Caixa Postal 676, 13565-905 São Carlos -SP

Este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto dos inimigos naturais associados ao Baculovírus ($2,5 \times 10^3$ poliedros/hectare) no controle da lagarta-do-cartucho. O experimento foi conduzido em parcelas do milho BRS 3123 (6 fileiras de 4m) infestadas (15 dias após a germinação) com posturas da praga (uma/m²). O vírus foi aplicado a intervalos de dois dias, iniciando dois dias após a infestação e terminando aos 16 dias. Imediatamente antes de cada aplicação do Baculovírus, procedeu-se a coleta de todos os insetos presentes nas plantas de uma fileira escolhida ao acaso. As plantas foram cobertas por sacos de plástico e removidas para o laboratório. Coletas também foram realizadas 24 e 72 horas após a aplicação do vírus. Os insetos presentes foram catalogados e no caso de *S. frugiperda*, colocados em dieta artificial para o acompanhamento dos fatores de mortalidade. Dezoito dias após a infestação foi avaliado o dano provocado por *S. frugiperda* nas plantas através de notas que variavam de 0 (sem dano) a 5 (planta morta). Não houve diferença significativa no dano ocasionado as plantas em todos os tratamentos, cuja média obtida nas parcelas com aplicação do vírus foi 0,8 e nas parcelas sem aplicação 0,42. Esse resultado indica que outros fatores de mortalidade estavam atuando na área. De fato, o número de lagartas coletadas antes das pulverizações decresceu linearmente com o aumento do intervalo de tempo após a infestação. Houve uma presença significativa do predador *Doru luteipes* e dos parasitoides *Chelonus insularis*, *Ephosoma* sp. e *Camptoplex flavicincta*.

Palavras-chaves: Controle microbiano, predadores, parasitoides.

EFEITO DE *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SOBRE NINFAS DE *Pantala flavescens* (FABRICIUS, 1798) (ODONATA: LIBELLULIDAE).EFFECT OF APPLICATIONS OF *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ON *Pantala flavescens* (FABRICIUS, 1798) (ODONATA: LIBELLULIDAE) NYMPHS.

A. R. Fonseca¹, N. M. Sanches¹, M. C. Fonseca¹, D. M. Quintiliano¹, E. S. da Silva¹.

¹Fundação Educacional de Divinópolis - FUNEDI/UEMG, Centro de Pós-Graduação e Pesquisa, Campus Universitário s/nº, Bairro Jardim Belvedere II, CEP 35500-970, Divinópolis, MG. E-mail alysson@funedi.edu.br.

Várias estações de piscicultura que trabalham com a produção de alevinos ou peixes ornamentais têm apresentado problemas relacionados com a predação de larvas, pós-larvas e alevinos por ninfas de insetos da Ordem Odonata. Por vários anos, o controle desses insetos no Brasil vem sendo realizado através da aplicação de inseticidas químicos do grupo dos organo-fosforados, que embora eficiente, está proibido em vários países por causar a contaminação da água e a morte de parte do zooplâncton. Dessa forma, objetivou-se estudar o efeito de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac, sobre ninfas de *Pantala flavescens* (Fabricius, 1798) (Odonata: Libellulidae). Os experimentos foram conduzidos em sala climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. Ninfas da espécie *P. flavescens* foram individualmente acondicionadas em caixas de isopor com capacidade para dois litros, contendo cada uma 500 ml de água livre de cloro e, estando essas no terceiro, quinto e sétimo instares, foram tratadas com *B. thuringiensis* var. *israelensis*, em formulação granulada. O produto foi aplicado diretamente na água do recipiente de criação, em concentração indicada para o controle de larvas de culicídeos, duas concentrações superiores e duas inferiores a essa, além da testemunha, onde não se aplicou o produto. Nos instares onde se aplicou o inseticida microbiano as ninfas foram alimentadas somente com peixes recém-nascidos da espécie *Poecilia cf. vivipara* Schneider, 1801, sendo que nos demais adicionou-se à essa dieta larvas de dípteros da família Culicidae. As avaliações foram realizadas a 24, 48 e 72 horas após a aplicação do produto, registrando-se o número de insetos mortos em cada tratamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quinze repetições. Observou-se que não houve efeito do produto microbiano sobre a espécie estudada, não sendo observada mortalidade de indivíduos nos tratamentos avaliados.

Palavras-chave: libélula, predação, controle biológico, piscicultura.

BIOLOGICAL CONTROL OF NATIVE CURCULIONID LARVAE (*Aegorhinus superciliosus* Y *Otiiorhynchus sulcatus* COLEOPTERA; CURCULIONIDAE) THROUGH ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES IN CHILE.CONTROL BIOLÓGICO DE LARVAS DE CURCULIONÍDOS (*Aegorhinus superciliosus* Y *Otiiorhynchus sulcatus* COLEOPTERA; CURCULIONIDAE) MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE NEMATÓDOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

A. France¹, M. Gerding¹ y E. Cisternas¹

CRI Quilmapu-INIA, casilla 426, Chillán, Chile.
 afrance@quilmapu.inia.cl

Native curculionid larvae are considered important pests due to the intensive damage in different crops, such as pasture, cereals, and some fruit trees. In the South of Chile the damage has been increasing considerably in the last years, specially in crops such as blueberry and raspberry. Species like *O. sulcatus* and *A. superciliosus*, were detected in these crops causing extensive root damage and killing adult bunches. Three different localities with these affected orchards were selected for entomopathogenic nematode trials, the nematode used was a native isolate (collected in Puerto Cisne, Chile), similar to *Steinernema feltiae*, and named Qu-N820. The nematodes were multiplied in *Galleria mellonella* larvae and applied on the plant surface at rates of 300.000 dauers per square meter. Each trial had adults' traps, in order to detect the emergency after three months. The results indicate that the nematode was effective for each pest, reducing the adults' populations in an average of 70%. These biological control may be suitable for soil dwelling larvae control, in areas where orchards like blueberry are expensive to replace.

Key words: nematode, curculionid larvae, Steinernema, blueberry

III Congresso Brasileiro de Micologia

Micologia: Desenvolvimento e perspectivas para o milênio



**Sociedade Brasileira
de Micologia**

**Centro de Convenções
do Hotel Monte Real
Águas de Lindóia, São Paulo
19 a 23 de agosto de 2001**

III CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA

AG.003

CONSUMO DE O₂, GERMINAÇÃO E VIRULÊNCIA DE *METARRHIZIUM ANISOPLIAE* EM CONÍDIOS ARMAZENADOS. Destéfano, R.H.R. & Messias, C.L. (Dep. Genética e Evolução, IB, UNICAMP)

Metarrhizium anisopliae faz parte de importante grupo de agentes entomopatogênicos utilizados no controle de pragas agrícolas e em saúde pública. Parâmetros fisiológicos visando o armazenamento e a estabilidade do inóculo é de interesse para a formulação de biopesticidas com o intuito de utilização em larga escala. Conídios em glicerol e em pasta aquosa, a temperatura de -200°C por 180 dias foram avaliados quanto à germinação, ao consumo de oxigênio por respirometria diferencial e infectividade, em bioensaios sobre *Panstrongylus megistus*, vetor da doença de Chagas. Até 90 dias de armazenamento, o glicerol utilizado como crioprotetor preservou o poder infectivo dos conídios, onde a DL50 foi de 2,0x10⁷ para conídios formulados em glicerol e de 9,8x10⁷ para os sem glicerol, apesar da viabilidade ter decrescido em torno de 45% contra os 60% de perda para os não formulados, enquanto que o consumo de O₂ sofreu redução de 4 vezes para conídios não formulados. Após 180 dias de armazenamento, os parâmetros fisiológicos atingiram níveis muito baixos, onde os conídios com uma viabilidade de 30% tiveram a capacidade respiratória reduzida em mais de 100 vezes. Os resultados indicam que a atividade fisiológica dos conídios tomada apenas pela capacidade germinativa, não deve ser considerada como parâmetro para orientar sua utilização, uma vez que esta característica isoladamente não expressa o poder entomopatogênico do fungo.

AG.004

ANÁLISE MORFOEPIGENÉTICA DE LINHAGENS SELVAGEM E MUTANTE DE *METARRHIZIUM ANISOPLIAE*. Schneider, D.R.S.¹ & Messias, C.L.² (Dep. Genética e Evolução, IB, UNICAMP)

Fungos filamentosos podem apresentar forma micelial e leveduriforme como requisito da patogenicidade a plantas e animais, exibindo morfologias distintas em cultura submersa. Neste trabalho, análise morfoepigenética em linhagens de *Metarrhizium anisopliae* quanto à variabilidade na ocorrência e desenvolvimento morfológico foi realizada em diferentes meios de cultivos líquidos, à semelhança da hemolinfa/cutícula de insetos e contiveram: licor de milho, ácido láctico e clorídrico, glicose, lecitina de soja, gema de ovo, inositol, aminoácidos, CaCl₂, sulfato amônio, trealose, colágeno, gelatina, quitina, vitaminas, extrato de leveduras, farinha de milho, peptona, testando-se separadamente ou em combinações, sob ar atmosférico ou CO₂, com ou sem agitação. As estruturas morfológicas, medidas de massa micelial, variação de pH, pressão osmótica, pigmentação de conídios, foram avaliados. Por conidiogênese blástica, brotamento, fissão, ou fragmentação, propágulos como: conídios aéreos e submersos fragmentos de hifas, artrosporos, clamidosporos terminais e intercalados foram obtidos preferencialmente em certas

condições de cultivo, à semelhança do processo infectivo, e variou com a linhagem. Os resultados obtidos oferecem importantes informações para estudos de micoses em insetos, quanto ao aspecto genético e melhoramento.

¹CAPES

AG.005

AÇÃO DE *METARRHIZIUM ANISOPLIAE*, *METARRHIZIUM FLAVOVIRIDE* E *BEAUVERIA BASSIANA* SOBRE OVOS DE *BOOPHILUS MICROPLUS* EM TEMPERATURA AMBIENTE. Luna-Alves Lima, E.A.¹; Ferreira, U.L.¹ & Athayde, A.C.R.² (¹Dep. Micologia, UFPE; ²Dep. Medicina Veterinária, UFPB, Patos, PB)

A inclusão de bovinos especializados nos trópicos acentuou a necessidade de se controlar as infestações por carrapatos. No Brasil este controle é voltado para o *Boophilus microplus* com o uso de acaricidas que contribuem para o aparecimento de cepas resistentes e comprometem a integridade do ecossistema. Para o controle de carrapatos, o uso de fungos entomopatogênicos têm se mostrado mais promissor e biologicamente seguro. O trabalho avaliou a patogenicidade *in vitro* de *Metarrhizium anisopliae*, *Metarrhizium flavoviride* e *Beauveria bassiana* sobre ovos de *B. microplus*, oriundos de fêmeas selvagens, a temperatura ambiente. Os ovos foram tratados com suspensão fúngica de 10⁸ conídios por mL, para posterior observação de parâmetros biológicos. Os grupos tratados com o *M. anisopliae* mostraram 45,50 dias como período de incubação, 13 dias como período de eclosão e percentual de eclosão de 9,75%; para os grupos tratados com *M. flavoviride* e *B. bassiana* observaram-se os seguintes valores 50,35 dias, 15 dias, 10% e 30,50 dias, 9,50 dias, 7,75% respectivamente. Os resultados confirmam a patogenicidade de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, ressaltando a ação do *M. flavoviride* demonstrando assim, mais uma alternativa para o controle biológico do *B. microplus* (P < 0,05). CAPES

AG.006

COMPATIBILIDADE DE *METARRHIZIUM ANISOPLIAE* COM CARRAPATICIDAS QUÍMICOS. Athayde, A.C.R.¹; Guimarães, A.M.T.²; Queiroz, C.F.² & Luna-Alves Lima, E.A.² (¹Dep. Medicina Veterinária, UFPB, Patos, PB; ²Dep. Micologia, UFPE, Recife, PE)

O carrapato *Boophilus microplus* é um dos principais parasitas que afetam economicamente a bovinocultura. O controle deste parasita tem sido feito com o uso de acaricidas, elevando os custos de produção, estimado em torno de um bilhão de dólares para a pecuária sul-americana. O presente trabalho avaliou a compatibilidade química *in vitro* do fungo *Metarrhizium anisopliae*, linhagem PL43, com os acaricidas: Diclorvos associado a Cipermetrina (DC) e Cipermetrina High Cis associada a Tiazoline (CT), em diferentes concentrações. Foram observados a germinação após dezesseis horas; o crescimento; o percentual de esporulação e de toxicidade. Os resultados obtidos da maior concentração em relação ao grupo controle foram 88,51% para a germi-

III CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA

Os mesoiônicos são betainas heterocíclicas planas de cinco membros com características estruturais que lhes conferem atividades biológicas tais como antibacteriana, antitumoral e antifúngica. O objetivo deste trabalho foi testar a ação do mesoiônico cloreto de 1-(4'-clorofenil)-4-fenil-5(4''-clorofenil)-1,2,4-triazólio-2-tiol no controle de *Curvularia eragrostidis*, *Scytalidium lignicola* e *Corynespora cassiicola*. Discos de 5 mm de diâmetro com estruturas do fungo foram plaqueados em BDA, com o composto nas concentrações 0, 1, 10, e 100 ppm. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com arranjo fatorial constando de 4 repetições para cada concentração, mais testemunha. A avaliação foi realizada 7 dias após, através de medições do crescimento micelial e contagem do número de esporos por placa. No crescimento micelial diferiram estatisticamente da testemunha os isolados *S. lignicola* e *C. cassiicola* na concentração a 100 ppm. Na contagem de esporos todos os isolados diferiram estatisticamente da testemunha na concentração a 100 ppm. Os resultados sugerem teste de compatibilidade do produto com os hospedeiros específicos para verificação de fitotoxidez, já que o mesmo mostrou eficiência no controle dos patógenos.

AG.023

INFLUÊNCIA DE *GIGASPORA MARGARITA* E DE ESPÉCIES DE *TRICHODERMA* SOBRE O CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MANDIOCA CULTIVADAS EM SOLO INFESTADO OU NÃO COM *FUSARIUM SOLANI*. Laranjeira, D.; Maia, L.C. & Menezes, M. (Dep. Agronomia, UFRPE, Recife, PE)

A mandioca é uma das principais fontes de calorias na alimentação humana e animal. Entre as doenças que atacam a cultura, destaca-se a podridão radicular por *F. solani*. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de *G. margarita*, *T. harzianum* e *T. polysporum* no desenvolvimento das plantas e no controle da podridão radicular, em casa de vegetação. Mudanças de mandioca da cv. Izabel de Souza, propagadas por estacas ou enraizamento de brotos, foram inoculadas com *G. margarita* (100 esporos/vaso), enquanto que a infestação do solo com *Trichoderma* e *F. solani* ocorreu após 15 dias, depositando-se 40 ml da suspensão do inóculo (106 conídios/ml) em um sulco distanciado 5 cm do caule da planta. Aos 3 meses foram avaliados: biomassa fresca da parte aérea (BFA) e da raiz (BFR), severidade da doença (SED), esporulação (ESP) e colonização (COL) micorrízica. Os melhores resultados para BFA, BFR e SED ocorreram com plantas que receberam *G. margarita*+*Trichoderma*, enquanto que para ESP o melhor foi o que recebeu apenas *G. margarita*. Quanto a COL não houve diferença entre os tratamentos. Os isolados de *G. margarita*, *T. harzianum* e *T. polysporum* apresentam potencial para o controle da podridão radicular.

AG.024

CRESCIMENTO E VIABILIDADE DE *BEAUVERIA BASSIANA* (CL1), *METARRHIZIUM ANISOPLIAE* (PL43) E *METARRHIZIUM FLAVOVIRIDE* (BR) EM DIFERENTES

SUBSTRATOS. Ferreira, U.L.¹ & Luna-Alves Lima, E.A.¹ (¹Dep. Micologia, UFPE, Recife, PE)

Os fungos entomopatogênicos são considerados substitutos em potencial dos inseticidas químicos. Na busca de se adequar a produção de biomassa desses fungos em laboratório, para uso posterior em campo, se analisou o crescimento e a produção conidial de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *M. flavoviride* em diferentes substratos naturais. As linhagens fúngicas estudadas foram obtidas da coleção de cultura da Micoteca (URM) da UFPE. O crescimento colonial foi avaliado através de medições das colônias durante o período de 3 a 18 dias, em placas de Petri com BDA nas temperaturas: ambiente, 25°C e 28°C; a produção de conídios nos diferentes substratos (ervilha, soja, milho de munguzá, arroz parboilizado e quebradiço) foi avaliada após 15 dias de crescimento à temperatura ambiente por quantificação e, a germinação conidial foi analisada em placas de Petri com BDA. Foi observado que *B. bassiana* e *M. anisopliae* apresentaram o maior crescimento à temperatura ambiente (28±2°C), a maior produção (97,85%) em milho de munguzá e a menor (71,80%) em arroz quebradiço foi atingida por *M. flavoviride*. Concluiu-se que, as linhagens fúngicas estudadas nas condições propostas neste trabalho, demonstraram crescimento, produção e germinação conidial satisfatórias a serem investigadas como pré-inóculo para a produção de biomassa. CNPq

AG.025

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E PATOGENICA DE ISOLADOS DE *COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA*. Lima, M.L.F.¹ & Menezes, M.² (¹Dep. Micologia, CCB, UFPE, Recife, PE, Brasil; ²Fitosanidade, UFRPE, Recife, PE, Brasil)

Foram estudadas as características culturais (crescimento, esporulação e peso seco) e patogenicidade de nove isolados de *Colletotrichum graminicola*, oriundos de diferentes áreas produtoras de milho. Para o estudo, o fungo foi cultivado em quatro meios de cultura (aveia, BDA, milho e V-8), onde discos de micélio de 5mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri com os diferentes meios, sendo incubadas por sete dias a 25°C, sob luz contínua. Foram realizadas medições diárias do diâmetro das colônias e, em seguida, determinou-se a produção de esporos. Para avaliar o peso seco, os isolados foram cultivados nos meios de cultura já mencionados sem a adição do ágar, onde discos de micélio foram retirados de uma cultura jovem e transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 60 mL de meios de cultura e incubados sob luz contínua a 25°C, durante sete dias. O meio de aveia induziu melhor crescimento e esporulação, enquanto os meios líquidos, aveia e V-8, proporcionaram maior peso seco do fitopatógeno. Na investigação sobre a patogenicidade dos isolados, testada em três cultivares de milho, utilizou-se uma concentração de 2,7x10⁴ conídios/mL. Os isolados Cgr 8 e Cgr 9 foram mais patogênicos às três cultivares utilizadas.

III CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA

AG.026

ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR DIFUSÃO EM SUBSTRATOS SÓLIDOS DE ISOLADOS DE *COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA*, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DO MILHO. Lima, M.L.F.¹ & Menezes, M.² (¹Dep. de Micologia, CCB, UFPE, Recife, PE, Brasil; ²Fitossanidade, UFRPE, Recife, PE, Brasil)

Colletotrichum graminicola é referido como importante patógeno causando a doença conhecida como antracnose ou podridão do colmo, em diferentes cereais, principalmente milho e sorgo. Investigou-se a atividade enzimática de nove isolados de *C. graminicola* procedentes de diferentes áreas produtoras de milho. Discos de micélio de cada isolado foram transferidos para placas de Petri contendo meios específicos para detecção da atividade proteolítica, amilolítica, celulolítica e lipolítica, avaliadas através da degradação dos substratos pelas enzimas específicas, utilizando carboidrato, celulose e aminoácidos como fonte de carbono. Os isolados Cgr 4 e Cgr 6 apresentaram maior atividade proteolítica; Cgr 1 e Cgr 9 atividade amilolítica; Cgr 1 e Cgr 3 atividade lipolítica; Cgr 2, Cgr 7, Cgr 8 e Cgr 9 destacaram-se por apresentarem maior atividade celulolítica.

AG.027

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS EM MUDAS DE MARACUJAZEIRO AMARELO INOCULADAS COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMA) E SUBMETIDAS A ESTRESSE HÍDRICO. Cavalcante, U.M.T.¹; Nogueira, R.J.M.C.¹; Maia, L.C.² & Santos, V.F.³ (¹Dep. Biologia, UFRPE; ²Dep. Micologia, UFPE; ³IPA, PE)

O efeito da simbiose entre FMA e o maracujazeiro amarelo, 40 dias após a inoculação e submetido a estresse hídrico por 7 dias, foi estudado em experimento com delineamento inteiramente casualizado e arranjo fatorial, com dois tratamentos hídricos (com e sem estresse), três FMA (*Gigaspora albida*, *G. margarita* e *Glomus etunicatum*), dois níveis de inóculo (200 e 400 esporos/planta) e um tratamento não inoculado, com 4 repetições. Foi usado solo PVA (3 mg de P/dm³ de solo). Altura, área foliar, biomassa seca, resistência difusiva (Rs), transpiração (E) e temperatura foliar (Tf) foram analisados. Nas mudas inoculadas o estresse não afetou o crescimento e as demais não cresceram em ambas as condições hídricas. As mudas associadas aos FMA e submetidas ao estresse tiveram maiores valores de Rs e Tf e menores taxas de E. Mudanças inoculadas com *G. etunicatum* apresentaram menor Rs e E em relação às não inoculadas. A Tf foi mais elevada em mudas inoculadas com *G. albida* e *G. etunicatum*. A micorrização beneficiou as mudas de maracujazeiro promovendo o crescimento mesmo sob estresse hídrico.

CNPq

AG.028

ALTERAÇÕES DO pH EM SUBSTRATO COM SOLO ESTERILIZADO E ADUBADO COM BÍOSSÓLIDO, EM MARACUJAZEIRO INOCULADO COM FUNGOS MICORRÍZICOS

COS ARBUSCULARES (FMA). Silva Neto, J.P.¹; Messias, A.S.² & Cavalcante, U.M.T.³ (¹Mestrando em Agronomia, Ciência de Solo, UFRPE; ²Dep. Química, NPCIAMB, UNICAP; ³Dep. Biologia, UFRPE)

Foi avaliado, em casa de vegetação, o efeito da adubação com biossólido e inoculação com FMA em maracujazeiro amarelo sobre o pH do solo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de 2 [solo esterilizado (SEST) e não esterilizado (SNEST)] 4 [equivalentes a 0, 12, 24 e 36 t ha⁻¹ de biossólido] 3 [inoculado com *Glomus etunicatum*, *Gigaspora margarita* e controle] com determinação do pH em água, aos 45 e 90 dias após o transplante. No SEST não adubado, o pH foi mais elevado (5,64 e 5,76) do que no SNEST (4,95 e 5,53) aos 45 e 90 dias, respectivamente. Quando adubado com 12 t ha⁻¹ o SEST teve pH mais elevado (5,37) do que o SNEST (5,14), aos 90 dias. A interação entre a inoculação com FMA e a esterilização do solo, evidenciou pH mais elevado no SEST (5,21 e 5,36) do que no SNEST (4,73 e 5,2) das plantas inoculadas com *G. etunicatum* aos 45 e 90 dias, respectivamente. O pH do solo foi alterado com a esterilização, com a menor dose de adubação e com a inoculação com *G. etunicatum*, o que não foi verificado quando inoculado com *G. margarita* e aplicadas doses mais elevadas de biossólido.

AG.029

FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS: UMA ALTERNATIVA PARA CONTROLE DO CARRAPATO BOVINO - *BOOPHILUS MICROPLUS* DO MUNICÍPIO DE RIBEIRÃO, PE. Athayde, A. C. R.¹; Ferreira, U. L.²; Luna-Alves Lima, E. A.² (¹Dep. Medicina Veterinária, Univ. Federal da Paraíba; ²Dep. Micologia, UFPE)

Os carrapatos são importantes ectoparasitas em áreas agropecuárias e são responsáveis por severas perdas econômicas. Para se minimizar os danos na bovinocultura e consequente ecotoxicidade, o uso de fungos entomopatogênicos para o controle vêm se consolidando por sua segurança biológica. O trabalho avaliou a ação in vitro dos fungos *Metarrhizium anisopliae*, *Metarrhizium flavoviride* e *Beauveria bassiana* sobre cepas selvagens de *Boophilus microplus* sob temperatura ambiente. As teleóginas foram tratadas com suspensão fúngica de 108 conídios por ml, para posterior observação de parâmetros biológicos. O fungo *B. bassiana* apresentou um índice de produção de ovos de 45,64%, *M. flavoviride* de 46,07% e o *M. anisopliae* de 64,94%; quanto ao percentual de controle, este foi de 86,10%, 90,94% e 89,33% nos grupos tratados respectivamente. Quanto a biologia de ovos oriundos dessas fêmeas infectadas os tratados com o *M. flavoviride* apresentaram maior período de incubação (40 dias) e um menor percentual de eclosão (13,75%). Os resultados confirmaram a patogenicidade dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* e indicam a potencialidade do fungo *M. flavoviride* no controle de carrapatos, ressaltando a sua importância no controle biológico como entomopatogêno efetivamente viável (P < 0.05).

CAPES

AG.030

CONTROLE BIOLÓGICO DA MOSCA BRANCA (*BEMISIA* SP.) PELO FUNGO *METARRHIZIUM ANISOPLIAE*. Freitas, F. M. R.; Ferreira, U. L.; Athayde, A. C. R. & Luna-Alves Lima, E. A. (Dep. Micologia, UFPE)

Por representar atualmente uma das mais sérias pragas da agricultura mundial podendo ocasionar perdas de 40 a 70% da produção, a mosca-branca (*Bemisia* sp.) tem trazido grandes preocupações. Neste trabalho foram realizados estudos básicos para o controle biológico da mosca-branca, onde se buscou utilizar neste experimento o fungo entomopatogênico *Metarrhizium anisopliae* que tem um bom potencial como bioinseticida, foi devidamente utilizado. Após a inoculação do fungo e com as devidas observações foi constatado que o bioinseticida utilizado exerce alguma influência, de forma que 72,60% do total de ninfas, onde o fungo foi inoculado não evoluíram para adulto e ao final do período de observação apresentavam-se inviáveis, enquanto que no grupo de ninfas onde o fungo não foi utilizado, 70,75% do total evoluíram para adulto e as outras 29,25% ao final do período de observação ainda permaneciam viáveis (PIBIC).

