



MARIA DO LIVRAMENTO FERREIRA LIMA

**Caracterização molecular de espécies de
Metarhizium e patogenicidade sobre
*Diatraea saccharalis***

RECIFE-PE
2005

MARIA DO LIVRAMENTO FERREIRA LIMA

**Caracterização molecular de espécies de
Metarhizium e patogenicidade sobre *Diatraea*
*saccharalis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora.

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Elza Áurea de Luna Alves
Lima

CO-ORIENTADORA:

Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira

**RECIFE-PE
2005**

Lima, Maria do Livramento Ferreira
Caracterização molecular de espécies de
Metarhizium* e patogenicidade sobre *Diatraea
***saccharalis* / Maria do Livramento Ferreira Lima. –**
Recife : O Autor, 2005.

89 folhas : il., tab., fig.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCB. Biologia de Fungos, 2005.

Inclui bibliografia.

1. Micologia – Biologia de fungos. 2. Genética de
fungos – Controle biológico de inseto praga. 3.
***Metarhizium* – Caracterização molecular – Marcadores**
moleculares . 4. *Diatraea saccharalis* – Controle
biológico. I. Título.

582.28
579.5

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2005-180

Caracterização molecular de espécies de *Metarhizium* e patogenicidade sobre *Diatraea saccharalis*

MARIA DO LIVRAMENTO FERREIRA LIMA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira

Tese de doutorado aprovada no dia 22 de fevereiro de 2005, pela Banca Examinadora, composta dos seguintes membros:

BANCA EXAMINADORA:



Prof.ª Dr.ª Elza Áurea de Luna Alves Lima (Departamento de Micologia / UFPE)



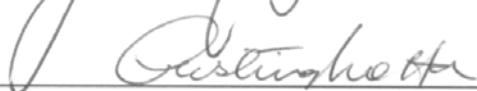
Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo (Departamento de Genética - ESALQ / USP)



Prof.ª Dr.ª Neiva Tinti de Oliveira (Departamento de Micologia / UFPE)



Prof.ª Dr.ª Janete Magali de Araújo (Departamento de Antibióticos / UFPE)



Prof.ª Dr.ª Cristina Maria de Souza Motta (Departamento de Micologia / UFPE)

SUPLENTE:

Prof. Dr. José Ferreira dos Santos (Departamento de Genética / UFPE)

***Confie em Deus sem nenhuma reserva; não se apóie em sua inteligência.
Em todas as suas atitudes, tenha-o presente e Ele dirigirá seus passos.***

Provérbios 3, 5-6

Aos meus pais **Antônio Macêdo Lima** (*In memoriam*) e **Salvina Ferreira de Sousa Lima**, pelo amor, apoio e confiança incondicionais, em todos os momentos de minha vida.

Ofereço

A **Deus**, por sempre me dar forças para continuar.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Pernambuco, pela contribuição na minha formação a nível de pós-graduação;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro e técnico-científico no decorrer deste trabalho.

A chefe do Departamento de Micologia - UFPE, professora Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima, por todo o apoio recebido durante minha passagem por este Departamento.

A coordenação de Pós-graduação em biologia de fungos.

A Profa. Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima, minha Orientadora, pela paciência, apoio, atenção, orientação e amizade demonstrada, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

A minha Co-orientadora, Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira, agradeço pelas sugestões, atenção e estímulo durante o decorrer do curso.

Em especial as minhas amigas, irmãs e companheiras de luta: Bereneuza Valente Brasileiro e Ubirany Lopes Ferreira pelo apoio, intercambio de conhecimentos e amizade constantes, pela presença nos momentos de alegria e tornarem as dificuldades mais amenas.

A Francinete Carla Nunes Cavalcanti pela amizade, solidariedade, cumplicidade e companheirismo constantes.

Aos professores Dr. Edmilson Jacinto Marques e Dr. Ricardo Otaviano Ribeiro de Lima da UFRPE, pelo apoio e orientações para realização do experimento de patogenicidade.

A todos os funcionários da Estação Experimental da Cana-de-açúcar Carpina pela paciência, atenção e fornecimento das larvas de *Diatraea saccharalis*.

Ana Paula Duarte Pires, Francinete Carla Nunes Cavalcanti, Rosimere B. Farias (Lab. de Micorrizas) e Adna Cristina Barbosa de Sousa pela amizade e ajuda.

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico: Ubirany, Amélia Tavares, Welber, Clécio, Francisco Marlon, Ginarajadaça, Auristela, Fabiana, Fábio Marcondes, Lívio, Aurelice, Nicola, Edileuza, Flávio, Francisco Braga, Adnorah e Karla pela convivência harmoniosa.

Ao prof. Msc. Sidney T. Barros pelos momentos de descontração e amizade.

A profa. Dra. Ângela Coimbra pela amizade solidariedade e simplicidade.

A Msc. Eliane Nogueira pelo apoio constante e amizade.

A profa. Dra. Janete Magali de Araújo do Departamento de Antibióticos por disponibilizar o uso de equipamentos para realização da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Marcos Moraes pelos iniciadores cedidos para este trabalho.

A Cassiano Alves Filho, Lusinete Rodrigues e Valda Clêide Alves Silva pela hospitalidade, apoio, dedicação, paciência, carinho, solidariedade e amizade.

A professora Iranise B. B. Torres da Universidade Federal do Piauí, pelo incentivo.

A Welber Eustáquio de Vasconcelos pelos momentos felizes, apoio, dedicação, incentivo e companheirismo.

A Bereneuza Tavares Ramos Valente Brasileiro pela simplicidade, apoio, intercâmbio de conhecimentos e companheirismo. Agradeço por tudo.

A Ubirany Lopes Ferreira pelo apoio e amizade que me fortalece.

A Karla Cristine A. Pereira pela ajuda na grafia do abstract.

Aos amigos João Gustavo, Ana Beatriz e Carlos Vinícius pelos momentos de alegria.

A João Carlos Cavalcanti, Vanilda Maria Cavalcanti, Flávia Carla e Francinete Carla pela amizade, atenção e hospitalidade.

Em especial, a minha mãe Salvina Ferreira de Sousa Lima, aos meus irmãos Francisco Carlos Ferreira Lima, Cristheany Ferreira, Marcos Antônio Ferreira Lima e meus sobrinhos Wanderson, Raissa e Maria Fernanda, por compreenderem minha ausência e torcerem pelo meu sucesso.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização do Curso de Doutorado.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Metarhizium flavoviride</i>	17
2.2 Utilização de <i>Metarhizium</i> spp. para o biocontrole de insetos-praga	20
2.3 Cana-de-açúcar e broca-comum (<i>Diatraea saccharalis</i>)	22
2.4 Marcadores Moleculares	24
2.4.1 PCR (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)	25
2.4.2 ITS (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)	25
2.4.3 <i>INTRON SPLICE SITE PRIMER</i>	28
2.4.4 RAPD	29
2.4.5 MICROSSATÉLITE	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Local de Realização dos Experimentos	33
3.2 Linhagens de <i>Metarhizium</i>	33
3.3 Análise da diversidade genética através do uso de marcadores moleculares	34
3.3.1 Extração do DNA genômico	34
3.3.2 Quantificação do DNA genômico	34
3.3.2.1 Revelação dos géis	35
3.3.3 Amplificação do DNA	35
3.3.3.1 Região ITS do rDNA	36
3.3.3.1.1 Amplificação do DNA da região ITS do rDNA	36
3.3.3.1.2 RFLP - <i>locus</i> ITS1- 5.8S-ITS2 do rDNA	36
3.3.3.2 <i>Intron Splice Site Primer</i>	36
3.3.3.3 RAPD	37

3.3.3.4 Microssatélites	37
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
3.5 TESTE DE PATOGENICIDADE	38
3.5.1 Obtenção dos insetos	38
3.5.2 Produção do Inóculo	39
3.5.3 Bioensaios	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA	40
4.2 REGIÕES ITS DO DNA RIBOSSOMAL	41
4.2.1 Análise dos produtos de amplificação	41
4.2.2 Análise dos fragmentos de restrição	41
4.3 REGIÕES DE <i>INTRON</i>	47
4.4 RAPD	50
4.5 MICROSSATÉLITES	58
4.5.1 Iniciador (GTG) ₅	58
4.5.2 Iniciador - M13	60
4.5.3 Iniciador (GACA) ₄	63
4.6 Teste de Patogenicidade	67
5. CONCLUSÕES	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Estrutura do agregado gênico com representação das regiões ITS1, ITS2 e a subunidade 5.8S do rDNA com os iniciadores ITS5 e ITS4. Adaptado de Fungaro (2000).	27
2 Quantificação de DNA de linhagens de <i>Metarhizium</i> . Nas pistas A, B e C, encontram-se os marcadores do DNA de fagoλ nas concentrações de 100, 150, 250 ng/mL, respectivamente; nas pistas 1 a 15, encontram-se os DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.	40
3 Perfil de amplificação da região ITS do rDNA de linhagens de <i>Metarhizium</i> obtido com os iniciadores ITS5 e ITS4. Na pista M, marcador de peso molecular 100 pb; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4400, 4411, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c, 4415, 3800), respectivamente.	42
4 Perfil de restrição dos fragmentos de DNA da região ITS do rDNA de linhagens de <i>Metarhizium</i> obtido com a enzima <i>MspI</i> . Na pista M, marcador de peso molecular 100 pb; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4400, 4411, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c, 4415, 3800), respectivamente.	43
5 Perfil de restrição dos fragmentos de DNA da região ITS do rDNA de linhagens de <i>Metarhizium</i> obtido com a enzima <i>HaeIII</i> . Na pista M, marcador de peso molecular 100 pb; Nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4400, 4411, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c, 4415, 3800), respectivamente.	43
6 Dendrograma construído pelo método UPGMA, utilizando o coeficiente de Jacard (J) a partir do perfil dos fragmentos de restrição da região ITS do rDNA obtidos de 15 linhagens de <i>Metarhizium</i> com as enzimas de restrição <i>MspI</i> e <i>HaeIII</i> .	44
7 Perfil de <i>intron</i> de linhagens de <i>Metarhizium</i> obtido com o iniciador EI1. Na pista M, marcador de peso molecular de 1 Kb; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.	47
8 Dendrograma construído pelo método UPGMA, utilizando o coeficiente de Jacard (J) a partir do perfil de <i>intron splice site primer</i> obtido de 15 linhagens de <i>Metarhizium</i> .	48

9	Perfil de RAPD de linhagens de <i>Metarhizium</i> obtido com o <i>primer</i> OPA-9. Na pista M, marcador de peso molecular do DNA fago λ clivado com <i>HindIII</i> ; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.	51
10	Perfil de RAPD de linhagens <i>Metarhizium</i> obtido com o iniciador OPA-16. Na pista M, marcador de peso molecular de DNA fago λ clivado com <i>HindIII</i> ; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.	51
11	Perfil de RAPD de linhagens de <i>Metarhizium</i> obtido com o iniciador OPA-20. Na pista M, marcador de peso molecular do DNA fago λ clivado com <i>HindIII</i> ; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.	52
12	Perfil de RAPD de linhagens <i>Metarhizium</i> obtido com o iniciador OPX-6. Na pista M, marcador de peso molecular do DNA fago λ clivado com <i>HindIII</i> ; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.	52
13	Perfil de RAPD de linhagens de <i>Metarhizium</i> obtido com o iniciador OPX-4. Na pista M, marcador de peso molecular do DNA fago λ clivado com <i>HindIII</i> ; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.	53
14	Perfil de RAPD de linhagens de <i>Metarhizium</i> obtido com o iniciador OPW-16. Na pista M, marcador de peso molecular do DNA fago λ clivado com <i>HindIII</i> ; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.	53
15	Perfil de RAPD de linhagens de <i>Metarhizium</i> obtido com o iniciador OPX-11. Na pista M, marcador de peso molecular do DNA fago λ clivado com <i>HindIII</i> ; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.	54
16	Perfil de RAPD de linhagens de <i>Metarhizium</i> obtido com o iniciador OPA-10. Na pista M, marcador de peso molecular do DNA fago λ clivado com <i>HindIII</i> ; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.	54

17	Dendrograma construído pelo método UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir do perfil de RAPD obtidos de 15 linhagens de <i>Metarhizium</i> com os iniciadores OPA-9, OPA-16, OPA-20, OPX-4, OPX-6, OPX-11, OPW-16, OPA-10.	55
18	Perfil de regiões microssatélites de linhagens de <i>Metarhizium</i> obtido com o iniciador (GTG) ₅ . Na pista M, marcador de peso molecular 1 kb; Nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.	58
19	Dendrograma construído pelo método UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir do perfil de microssatélite obtido de 15 linhagens de <i>Metarhizium</i> ..	59
20	Perfil de regiões microssatélites de linhagens de <i>Metarhizium</i> obtido com o iniciador M13. Na pista M, marcador de peso molecular 100 pb; Nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.	60
21	Dendrograma construído pelo método UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir do perfil de microssatélite obtido de 15 linhagens de <i>Metarhizium</i> .	62
22	Perfil de regiões microssatélites de linhagens de <i>Metarhizium</i> obtido com o iniciador (GACA) ₄ . Na pista M, marcador de peso molecular 100 pb; Nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.	63
23	Dendrograma construído pelo método UPGMA, utilizando o coeficiente de Jacard (J) a partir do perfil de microssatélite obtido de 15 linhagens de <i>Metarhizium</i> .	64
24	Larva de <i>Diatraea saccharalis</i> colonizada pela linhagem 4415 de <i>Metarhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> .	69
25	Pupa de <i>Diatraea saccharalis</i> colonizada pela linhagem 4400 de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> .	69

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Linhagens de <i>Metarhizium</i> utilizadas.	33
2	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo.	35
3	Percentual de mortalidade de <i>Diatraea saccharalis</i> e tempo letal (TL ₅₀) após oito dias de inoculação com <i>Metarhizium</i> .	67
4	Frequência percentual acumulada de mortes de <i>Diatraea saccharalis</i> após inoculação com <i>Metarhizium</i> .	68

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *METARHIZIUM* E PATOGENICIDADE SOBRE *DIATRAEA SACCHARALIS*

MARIA DO LIVRAMENTO FERREIRA LIMA

RESUMO

Foram analisadas 15 linhagens de *Metarhizium* isoladas de diferentes regiões e hospedeiros quanto às características genéticas e 7 linhagens quanto a patogenicidade sobre *Diatraea saccharalis*. Os marcadores moleculares ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA, *Intron splice site primer*, RAPD e Microssatélites (SSR-*Simple Sequence Repeats*) foram utilizados para avaliar a diversidade genética entre as linhagens. A análise de agrupamento usando o método UPGMA baseada nas distâncias genéticas dos quatro marcadores moleculares confirmou a diversidade genética reconhecida no gênero *Metarhizium*. As enzimas de restrição, *HaeIII* e *MspI*, evidenciaram a diversidade genética entre as linhagens ao digerirem os produtos de amplificação do locus ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA com os iniciadores ITS4 e ITS5, a enzima *DraI* não apresentou sítios de restrição. Os *introns* do grupo mRNA nuclear discriminaram as linhagens de *Metarhizium* apenas com a utilização do iniciador EI1. As técnicas de RAPD e regiões de Microssatélite foram eficientes em demonstrar a diversidade entre as linhagens. Porém o microssatélite (GACA)₄ foi mais sensível em detectar a variabilidade intra e interespecífica entre as diferentes linhagens de *Metarhizium*. Não houve correlação entre grupos e regiões geográficas. As linhagens 4415, 4400 e 4897 causaram maior percentual de mortalidade das larvas de *Diatraea saccharalis*. Também não houve correlação entre os agrupamentos gerados pelas técnicas moleculares e percentual de mortalidade de larvas de *D. saccharalis*.

Palavras-chave: *Metarhizium*, região ITS-rDNA, *Intron Splice Site Primer*, RAPD, Microssatélite e *Diatraea saccharalis*.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *METARHIZIUM* AND PATHOGENICITY ON *DIATRAEA SACCHARALIS*

MARIA DO LIVRAMENTO FERREIRA LIMA

ABSTRACT

Fifteen *Metarhizium* strains isolated from different areas and hosts were analysed upon genetic characteristics and 7 strains upon the pathogenicity to *Diatraea saccharalis*. The ITS (*Internal Transcribed Spacer*) molecular markers of rDNA, *Intron splice site primer*, RAPD and Microsatellite (SSR-*Simple Sequence Repeats*) were used to evaluate the genetic diversity among strains. The grouping analysis using the UPGMA method, based on the genetic distances of four molecular markers, confirmed the recognized genetic diversity of the genus *Metarhizium*. The restriction enzymes *HaeIII* e *MspI*, presented genetic diversity among the strains when digesting the amplification products of the rDNA *locus* ITS1-5.8S-ITS2 with the ITS4 and ITS5 primers, the enzyme *DraI* did not present restriction sites. The *introns* of nuclear mRNA group were able to discriminate the *Metarhizium* strains only by using the EI1 primer. The RAPD and Microsatellite techniques were efficient to demonstrate the diversity among the strains. However, the microsatellite (GACA)₄ was more sensitive to detect the intra and interspecific variability among different *Metarhizium* strains. There was no correlation among groups and geographic areas. The strains 4415, 4400 and 4897 caused higher percentage of *Diatraea saccharalis* larvae mortality. Moreover, there was no correlation among the grouping generated by molecular techniques and percentage of *D. saccharalis* larvae mortality.

Key Words: *Metarhizium*, region ITS-rDNA, *Intron Splice Site Primer*, RAPD, Microsatellite and *Diatraea saccharalis*.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica e social para o Brasil, ocupando atualmente mais de 5 milhões de hectares plantados, dos quais aproximadamente 1,2 milhões estão na Região Nordeste. Além da produção de açúcar, é matéria prima para produção de álcool, destacando-se como subproduto, o bagaço para a produção de papel, ração animal e mais recentemente para co-geração de energia elétrica (MARQUES et al., 2001).

Muitos fatores são responsáveis pela redução dos rendimentos agro-industriais da cultura, tais como a ação de pragas que causam significativas perdas por unidade de área. Entre essas pragas, destaca-se a broca-comum *Diatraea saccharalis* (Fabr.), pela sua ampla distribuição nos canaviais do Brasil e de outras localidades no continente americano de maneira geral (SILVA et al., 1997).

Entre os agentes causadores de doenças infecciosas em insetos, os fungos ocupam um lugar de destaque, sendo os primeiros agentes de infecção de natureza microbiana identificados (ALVES, 1998). Assim, entre os fungos entomopatogênicos mais conhecidos e estudados, destacam-se *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *M. anisopliae* foi isolado pela primeira vez em 1879, por Metschnikof, de larvas de *Anisopliae austriaca* (LUNA-ALVES LIMA, 1985). É o mais usado no controle biológico das cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata* e *M. fimbriolata*), possuindo a vantagem de ser inócuo ao homem e aos outros animais.

M. anisopliae var. *acridum* Driver & Milner e *M. flavoviride* var. *flavoviride* Rombach estão sendo aplicados no campo como bioinseticidas em alguns países africanos, mas pouco se conhece sobre os aspectos biológicos destes fungos (ALVES, 1998). *Metarhizium flavoviride* Gams & Roszypal é um entomopatógeno com grande potencial para o controle biológico de insetos-praga da agricultura, principalmente de gafanhotos, sendo que o controle dessa praga dá-se principalmente com uso de inseticidas químicos. Uma das alternativas encontradas por vários pesquisadores visando controlar esses insetos é a utilização de agentes naturais. Várias espécies de fungos têm sido testadas para essa finalidade, como *M.*

flavoviride, *M. anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Nomuraea rileyi* (Farlow) Sanson. *M. anisopliae* var. *acridum* tem se mostrado como um dos mais promissores contra os gafanhotos, devido apresentar resistência às altas temperaturas, virulência elevada e facilidade de produção em condições de laboratório (XAVIER-SANTOS et al., 1999a).

No Brasil, estudos genéticos têm sido desenvolvidos visando esclarecer fenômenos biológicos em fungos entomopatogênicos, de modo que já foram obtidos produção e regeneração de protoplastos, como também resistência a fungicidas como Benomyl, Captan, Iprodiona e Procimidona (KUKLISKY-SOBRAI et al., 2004). Análises intra e interespecíficas têm sido aplicadas para a caracterização de linhagens fúngicas, permitindo a identificação e detecção de sua variabilidade. Atualmente técnicas de marcadores genéticos, principalmente de RAPD são muito utilizadas em fungos (DRIVER et al., 2000; HSIANG & WU, 2000; DALZOTO et al., 2003) e muito adequadas para a caracterização de linhagens tanto de uma mesma espécie quanto de espécies diferentes (MANULIS et al., 1994; LEAL, 1996; MARTINS et al., 1999; MAVRIDOU et al., 2000).

Pouco se conhece sobre a variabilidade genética de *M. flavoviride* var. *flavoviride*, tendo em vista que o ciclo parassexual ainda não foi detectado nessa espécie, dificultando o seu estudo genético e consequentemente os mecanismos de recombinação e de patogenicidade. Essas informações também são importantes para serem utilizadas na elaboração de projetos de pesquisas sobre a aplicação do patógeno como biocontrolador de insetos-praga ao nível de campo.

O trabalho teve por objetivo analisar a variabilidade genética de 15 linhagens de *Metarhizium*, procedentes de diferentes localidades, utilizando marcadores moleculares e sua ação patogênica sobre larvas de terceiro instar de *Diatraea saccharalis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviride*

Dentre os gêneros de fungos mais importantes para o controle biológico, encontra-se *Metarhizium*, que se destaca por apresentar eficiência no controle integrado de insetos-praga (ONOFRE et al., 2002). Seu primeiro registro foi feito por Metschnikoff, como *Entomophthora anisopliae*, isolado do besouro *Anisopliae austriaca*, na Rússia, em 1879. O isolado de Metschnikoff foi reclassificado por Sorokin em 1883 que descreveu o gênero, com uma única espécie, *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin, nomenclatura válida até os dias atuais (PETCH, 1931; TULLOCH, 1976; LUNA-ALVES LIMA, 1985; XAVIER-SANTOS, 1999a). Baseando-se na morfologia e na produção de conídios, atualmente são identificadas três espécies: *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *M. album* (Petch) sendo todas, potenciais agentes de controle microbiano de pragas de interesse agrícola e em saúde pública (BRIDGE et al., 1993; RAKOTONIRAINY et al., 1994; ONOFRE et al., 2002).

Para *M. anisopliae*, a princípio, foram descritas duas variedades; *M. anisopliae* var. *anisopliae* com conídios que variam entre 3,5 a 9,0 µm de comprimento e *M. anisopliae* var. *majus* cujos conídios estão entre 9,0 a 18,0 µm de comprimento (TULLOCH, 1976). Entretanto, estudos recentes baseados em seqüências do gene ribossomal 28S e região espaçadora ITS, identificaram duas novas variedades, *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *lepidiotum* (DRIVER et al., 2000). No Brasil, *M. anisopliae* var. *anisopliae* assume grande importância, por ter sido empregada no primeiro projeto de controle biológico com aplicação no campo, para o controle da cigarrinha da folha da cana-de-açúcar *Mahanarva posticata* (Stal), sendo um dos programas mais bem sucedidos no mundo (FERRON, 1981; ALVES, 1998; FARIA & MAGALHÃES, 2001). RIBEIRO (1997) ressaltou a importância dessa espécie por ser inócua aos animais de sangue quente, não acarretando problemas às plantas, ao homem e não interferindo na micro e macrofauna benéficas dos parasitas e predadores.

M. anisopliae caracteriza-se por apresentar abundante esporulação em meios artificiais e no interior de insetos. As condições ambientais ótimas ao crescimento deste fungo, correspondem à temperatura entre 25-30°C, umidade próxima a 92,5%, presença de luz contínua e pH entre 3,5 e 8,5 (AZEVEDO e MESSIAS, 1985; ATHAYDE, 2002).

Alves (1998) também ressaltou a importância de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, mais adaptada às condições climáticas brasileiras, devido à diversidade genética que resulta no aparecimento de muitas linhagens com diferentes níveis de virulência, especificidade, produção de conídios e resistência à radiação ultravioleta, e ao fato de ser patogênica a mais de 200 espécies de insetos, sendo um dos agentes biocontroladores de pragas da agricultura mais estudados e que melhores resultados tem sido demonstrado (OLIVEIRA et al., 1997; PANTOU et al., 2003).

Arthurs & Thomas (2001) estudaram em condições de laboratório, o efeito da temperatura e umidade relativa sobre a esporulação de *M. anisopliae* var. *acridum* em cadáveres do gafanhoto *Schistocerca gregaria*. Observaram que a esporulação foi otimizada a uma umidade relativa superior a 96% e temperatura ótima entre 20 e 30°C. Esta variedade vem sendo empregada em experimento no campo na África e em outros países, visando o controle de gafanhotos, com doses em torno de 10³ conídios/ha com resultados animadores (ALVES, 1998).

Gams & Rozsypal (1973), baseados essencialmente na morfologia e dimensão dos conídios e conidióforos, descreveram a espécie *Metarhizium flavoviride* para um fungo isolado de curculionídeos (*Ceutorrhynchus macula-alba* Herbst e *C. albovittatus* Germar) em 1956 e de solos cultivados em vários países europeus. Por outro lado, Rombach et al. (1986) descreveram uma nova variedade da espécie, *M. flavoviride* var. *minus*, passando a espécie a ter duas variedades: uma denominada de *M. flavoviride* var. *flavoviride* caracterizada pela formação de conidióforos originando fiálides clavadas (9-14 x 3-4,5 µm) e cadeias de conídios elipsóides, em linhagens jovens, (7-9(-11) x 4,5-5,5 µm), conídios cilíndricos, em linhagens velhas, (7-10 x 3-4µm), que foi reconhecida por Driver et al. (2000) e a outra de *M. flavoviride* var. *minus* isolada de gafanhotos que apresentava conidióforos e conídios semelhantes aqueles de *M. flavoviride* descrito por Gams e

Rozsypal diferenciando-se apenas em suas dimensões. As células conidiogênicas eram menores ($8,4 \pm 1,2 \times 2,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$) e os conídios também menores variando de tamanho ($4,5\text{-}7 \times 2\text{-}3 \mu\text{m}$).

Utilizando sequenciamento do gene 28S região ITS e RAPD, Driver et al. (2000) analisaram 123 isolados de espécies identificadas como *M. anisopliae*, *M. flavoviride* ou *M. album*. Os resultados confirmaram a predominância de *M. anisopliae*, embora tenham sido reconhecidos quatro agrupamentos: *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *majus* e dois isolados descritos como variedades novas *M. anisopliae* var. *lepidiotum* e *M. anisopliae* var. *acridum* var. nov. Um outro grupo representado por duas novas variedades, *M. flavoviride* var. *novazealandicum* e *M. flavoviride* var. *pemphigum*. Após a publicação desse trabalho as linhagens brasileiras isoladas de gafanhoto tidas como de *M. flavoviride* passaram a ser denominadas *M. anisopliae* var. *acridum*.

Atualmente *M. anisopliae* var. *acridum* possui maior grau de infectividade e patogenicidade contra gafanhotos, apresentando resultados promissores como biocontrolador destes insetos na África e Austrália (GOETTEL et al., 1995; ALVES, 1998; XAVIER-SANTOS et al., 1999b). As estruturas de duas importantes toxinas contra insetos, a Viridoxina A e Viridoxina B, isolada de *M. flavoviride* foram descritas por Gupta et al. (1993). Segundo Rakotonirainy et al. (1994), esta espécie é de ocorrência e distribuição mais restritas que o *M. anisopliae*.

Braga et al. (2001) estudando a resposta de algumas linhagens de *M. anisopliae* submetidas a UV-B, observaram que a germinação dos conídios e sobrevivência das linhagens foram retardadas, sendo que o decréscimo da germinação foi diretamente proporcional a dosagem, com valores entre 3,3 a 25,9 kJ m⁻². Todavia Onofre et al. (2001) ao estudarem o crescimento e esporulação de *M. flavoviride* var. *flavoviride* em diferentes meios de cultura e regime de luminosidade, observaram que as melhores condições para o crescimento e esporulação foram conseguidas tanto no meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar) quanto no Meio Completo combinados com o regime de luminosidade contínua.

2.2 Utilização de *Metarhizium* spp. para o biocontrole de insetos-praga

O interesse pelo uso de fungos para o controle de pragas da agricultura tem aumentado nos últimos anos, à medida que foram sendo evidenciados os problemas advindos da utilização dos inseticidas químicos. Os fungos patogênicos incluem um grande e heterogêneo grupo de organismos que ocupam posições de grande importância tanto na agricultura quanto nas populações naturais. Eles demonstram uma enorme diversidade no modo pelo qual interagem com seus hospedeiros (ALVES, 1998; BARBIERE & CARVALHO, 2001).

O controle biológico de pragas é uma forma de manter populações de insetos em equilíbrio no ambiente, limitando a rápida multiplicação destes, sem causar danos a outros organismos no ecossistema (ONOFRE et al., 2002). Com o controle químico, o problema de emergência de resistência nos organismos-alvo, tornam os inseticidas ineficazes para os futuros tratamentos (SERAFINI et al., 2001). Devido aos problemas que surgem com o uso de pesticidas aumenta a necessidade de incentivos a um manejo mais racional dos agroecossistemas, com emprego de práticas integradas, incluindo a resistência genética de cultivares, o uso de elementos sadios de propagação vegetal, e o controle biológico natural e aplicado (RESENDE & SILVA, 2001).

Inúmeras espécies de insetos são controladas por *Metarhizium* e *Beauveria*, dentre os quais, destacam-se *Diatraea saccharalis*, *Plutella xylostella*, *Ostrinia nubilalis* e *Cydia pomonella* (ALVES, 1998; HUGHES et al., 2004). *M. anisopliae* possui uma ampla faixa de hospedeiros, por isso é uma das espécies mais utilizadas no controle microbiano de insetos.

Todo o processo de infecção no hospedeiro ocorre em fases sucessivas da adesão dos esporos, germinação, diferenciação da hifa (formação do apressório), penetração, colonização, reprodução e disseminação, para o início de um novo ciclo (PINTO et al., 1997; FRAZZON et al., 2000; BITTENCOURT et al., 2004). O patógeno precisa, antes de tudo, vencer a barreira cuticular do artrópodo, e para isso, a elaboração e combinação de enzimas secretadas pelo fungo são estritamente necessárias para que possa ocorrer a digestão da cutícula do inseto (KENDRICK,

1992; FERREIRA, 2004). Alguns trabalhos têm correlacionado a produção de enzimas *in vitro* com a virulência do patógeno, as proteases e quitinases têm sido relatadas como as mais importantes (KENDRICK, 1992; HARAN et al., 1996; ST. LEGER et al., 1996; SILVA PINTO et al. 2002).

Para Ribeiro et al. (1992) *M. anisopliae* é bastante eficiente no controle microbiano de insetos. Os primeiros trabalhos sobre aplicação de *M. anisopliae*, no controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar no Brasil tiveram início no Nordeste, nos Estados de Pernambuco, Sergipe e Bahia. Marques et al. (2001), afirmaram que foram produzidos pelo Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA/Planalsucar) e demais laboratórios setoriais instalados no Estado de Pernambuco, aproximadamente 40.000 Kg de conídios de *M. anisopliae*, os quais foram aplicados em uma área de 500.000 hectares de cana-de-açúcar infestada por *Mahanarva posticata*. Onofre et al. (2002) ressaltaram a importância da espécie para o controle de importantes insetos-praga tais como: *Anthonomus grandis*, bicudo-do-algodoeiro e formigas do gênero *Atta*. Além disso, há comprovada potencialidade contra insetos de interesse médico como: *Triatoma infestans*, *Glossina morsitans morsitans* (mosca-tsé-tsé), *Aedes aegypti* e *Anopheles stephens*.

M. anisopliae é bastante utilizado no controle de pragas que causam prejuízos às culturas de interesse agrícola em todo o mundo. No continente africano, Maniania et al. (1994) realizaram experimentos no campo, no Quênia, para avaliar o potencial da espécie no biocontrole de *Chilo partellus*, na cultura do milho e observaram que embora o fungo não tenha sido patogênico em massas de ovos com 12 h de idade, houve uma redução significativa no número de larvas de *C. partellus* e no nível de danos às folhas. Na Etiópia, Kassa et al. (2002) verificaram a suscetibilidade de *Sitophilus zeamais* e *Prostephanus truncatus* a *M. anisopliae*, importantes pragas de cereais estocados. Os isolados testados foram virulentos para os insetos, com um percentual de mortalidade entre 92-100%.

Athayde et al. (2001) estudaram a patogenicidade de *M. anisopliae* e *M. flavoviride* contra o carrapato bovino (*Boophilus microplus*) e verificaram que esses fungos influenciaram nas várias etapas do ciclo biológico desse carrapato e constataram ainda que *M. flavoviride* mostrou-se mais eficiente, apresentando um

percentual médio de controle de 90,94%, sendo assim considerado um agente entomopatogênico que poderá ser empregado em futuros programas de controle desses carrapatos. Onofre et al. (2002) avaliaram a eficiência de dois isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. flavoviride* var. *flavoviride* em fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, em experimento de laboratório e de campo, e observaram que *M. flavoviride* var. *flavoviride* mostrou-se mais patogênico

2.3 Cana-de-açúcar e broca-comum (*Diatraea saccharalis*)

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas da região Nordeste do Brasil. Trata-se de uma monocultura extensivamente plantada em grandes áreas nos Estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Sergipe. Possui relevante importância para o Brasil, constitui a principal matéria-prima para a produção de açúcar e álcool combustível, bem como para produção da bebida destilada (cachaça). Como sub-produtos da cana-de-açúcar, destacam-se ainda o bagaço para produção de papel, ração animal e mais recentemente para co-geração de energia elétrica gerando emprego e renda para as regiões onde é cultivada (SILVA et al, 1997; FIGUEIRÊDO, 2001; MARQUES et al, 2001).

Entre os fatores que têm interferido no rendimento agroindustrial da cultura, pode-se destacar os problemas fitossanitários. Dentre as principais pragas, destacam-se a broca comum *D. saccharalis*, as cigarrinhas *Mahanarva posticata* e *M. fimbriolata* e a broca gigante *Castnia licus* (LIMA & MARQUES, 1985). *D. saccharalis*, destaca-se como a mais importante praga desta cultura na maioria das regiões canavieiras do país. É um inseto de grande interesse econômico para a indústria do açúcar e do álcool; cujos adultos colocam os ovos nas folhas da planta e as larvas penetram nos colmos pela abertura de galerias, provocando perda de peso, morte das gemas e "coração morto", que além de reduzir a tonelagem por área, e não raro exige custosos replantes. Ocorrem também consideráveis prejuízos indiretos, pois as aberturas (orifícios e galerias) permitem entrada dos fungos *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium moniliforme* e *Physalospora tucumanensis* que invertem a sacarose em glicose, diminuindo a pureza do caldo e o peso do açúcar (GALLO et

al., 1988; ARRIGONI, 1992; RUVOLO-TAKASUSUKI et al., 2002; FALCO & SILVA-FILHO, 2003). Os prejuízos são avaliados a partir da porcentagem de intensidade de infestação, estima-se que para cada 1% de intensidade de infestação perdem-se 0,14% de cana em peso no campo e 0,48% de açúcar no processo de extração industrial, proporcionando uma diminuição de 0,370 kg de açúcar ou 0,165 L de álcool para cada tonelada de cana processada. O controle químico, é pouco eficiente, atingindo apenas os adultos, sendo necessárias várias aplicações, em intervalos de 15 a 20 dias, com emprego de aeronaves, para pulverizar os produtos a base de carbaril, malation, chlorpirifos, fipronil entre outros. O controle biológico, mais econômico, utilizando *M. anisopliae*, tem demonstrado bons resultados, aplicando-se 100 a 200g de esporos por hectare, em pulverizações em alto volume, na fase inicial do ataque da praga (NOVARETTI et al. 1999; BOTELHO & MACEDO, 2002).

Alves (1998) afirmou que *D. saccharalis* é suscetível a *M. anisopliae* e *B. bassiana*. *M. anisopliae* coloniza naturalmente cerca de 10% das larvas, nas condições climáticas do Nordeste, sendo patogênico para todos os estágios de desenvolvimento da broca. Segundo Pereira et al. (1998), na cana-de-açúcar a incorporação dos restos culturais pode favorecer o desenvolvimento de fungos entomopatogênicos no solo e a manutenção do equilíbrio entre a microbiota, insetos-praga e outros artrópodes existentes nesse ambiente. De acordo com Lima & Marques, (1985) no Nordeste do Brasil o controle biológico das brocas *Diatraea* spp. vem sendo efetuado pela utilização da vespa indiana *Apanteles flavipes*. Falco & Silva-Filho (2003) ressaltaram a importância do inimigo natural *Cotesia flavipes* para o controle dessa praga. Arcas et al., (1999) utilizaram dois isolados de *B. bassiana* para o controle de *D. saccharalis*. Trabalhando com lagartas de *Castnia licus*, Figuerêdo (2001) observou a mortalidade de 43,3 a 80%, causada por *M. anisopliae*.

2.4. Marcadores Moleculares

Os insetos-praga são atacados por microrganismos entomopatogênicos que controlam as pragas que passam a não produzir danos expressivos. Algumas possibilidades de alterações genéticas nesses microrganismos, usados no controle biológico, são o melhoramento genético para o aumento da virulência; da especificidade; da resistência a inibidores como luz ultravioleta solar, esporulação, sobrevivência e viabilidade (AZEVEDO, 1998).

O melhoramento genético de fungos entomopatogênicos pode levar ao melhor aproveitamento de suas potencialidades como agentes de controle biológico de pragas da agricultura. A eficiência do biocontrole com fungos entomopatogênicos pode ser aumentada por manipulação genética, alterando fatores como esporulação, dispersão e tolerância ao estresse por parte dos esporos (OLIVEIRA et al., 1997; FREIRE et al., 2001). Como em todo processo de melhoramento, é essencial que dentro de uma espécie a ser melhorada, exista variabilidade, isto é, formas diferentes que permitam ao melhorista selecionar as mais apropriadas para seus objetivos. Os fungos possuem variabilidade conseguida naturalmente por mutações. O ciclo parassexual tem sido de grande utilidade no melhoramento genético de fungos como: *M. anisopliae*, *B. bassiana* entre outros (AZEVEDO, 2001).

A avaliação da diversidade genética nos Anamorfos (fungos imperfeitos), é uma questão muito importante, pelo fato destes não realizarem a reprodução sexuada. Antes do advento dos marcadores moleculares, a caracterização de isolados fúngicos era restrita, principalmente, aos marcadores morfológicos. A caracterização morfológica, embora útil, é bastante limitada devido ao baixo número de caracteres passíveis de serem analisados e da resposta fisiológica nos meios de cultura. Técnicas moleculares têm contribuído para a exploração da diversidade genética, que compreendem desde a separação isoeletrica de isoenzimas até as técnicas moleculares: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), Microsatélite (SSR / *Simple Sequence Repeats*) entre outras (ALFENAS & MATSUOKA 1987; BIDOCHKA et al., 1994; TIGANO-MILANI et al., 1995; FUNGARO, 2000; DALZOTO et al., 2003).

2.4.1. PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

A reação em cadeia da polimerase é a amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, visando a produção de milhões de cópias desta sequência. Conforme descrita por Saiki et al. (1985), é uma técnica que permite amplificar *in vitro* pequenos segmentos específicos do genoma, flanqueadas por iniciadores (*primers*), através da enzima *Taq* DNA polimerase, sendo possível utilizar métodos simplificados para extração do DNA, pois requer uma quantidade mínima deste para realização da técnica. A principal vantagem da PCR é sua alta sensibilidade, pois a cada ciclo o número de seqüências alvo duplica. Considerando uma única seqüência alvo do DNA molde em uma PCR composta por 35 ciclos espera-se alcançar, após a reação, um número de aproximadamente 34.359.738.368 moléculas (2^{35}). Porém, esta grande sensibilidade pode se transformar em desvantagem em algumas ocasiões, pois qualquer contaminação da amostra do DNA molde pode levar a falsos positivos, sendo necessária a adoção de máximo cuidado no manuseio dos componentes da reação. Um controle absoluto (amostra sem DNA molde) deverá ser incluído em todas as análises (LIMA & ASSUNÇÃO, 2001). Essa técnica causou grande impacto nos estudos genéticos, dando origem a outras classes de marcadores moleculares que têm revolucionado a genética molecular, pois são ferramentas relativamente mais simples, rápidas e seguras para identificação e caracterização de diversos organismos e contribuem para o entendimento de vários processos biológicos, com aplicação na taxonomia e filogenia principalmente em fungos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; LEAL-BERTIOLI, 1998; FUNGARO, 2000). Estes processos têm permitido avanços significativos em áreas aplicadas, dentre as quais a identificação de genótipos, o diagnóstico de doenças, melhoramento genético de plantas, animais e microrganismos (FUNGARO & VIEIRA, 1998; DESTÉFANO, 2003).

2.4.2. ITS (*Internal Transcribed Spacer*)

De acordo com Fungaro, (2000) o DNA que codifica para o RNA ribossomal aparece repetido centenas de vezes no genoma fúngico. O fato desse agregado gênico apresentar algumas regiões altamente conservadas e outras variáveis, tem permitido a

análise de variação de diferentes níveis taxonômicos. O rDNA consiste de uma série repetitiva de três regiões gênicas conservadas, composta pelos genes 16-18, 5,8 e 28S e de duas regiões espaçadoras intergênicas variáveis denominadas: *Internal Transcribed Spacer* (ITS) e *Intergenic Spacer* (IGS). Estas regiões permitem que iniciadores de PCR sejam desenhados e utilizados para uma ampla gama de espécies fúngicas (WHITE et al., 1990). A região 18S é a mais conservada e por isso é utilizada para comparação de organismos distantemente relacionados. A porção 28S é mais variável, sendo apropriada para a comparação de diferentes gêneros ou, em alguns casos, de diferentes espécies. As regiões ITS evoluem rapidamente, por isso são apropriadas para discriminar espécies relacionadas e variedades de uma mesma espécie.

Leal-Bertioli (1998) afirma que informações de seqüências de regiões conservadas permitem a construção de iniciadores para sua amplificação a partir de genomas diversos. As análises podem ser obtidas da presença ou ausência de produto, clivagem dos produtos de PCR, gerando RFLPs, assim como do sequenciamento direto dos mesmos. Os exemplos mais comuns para estes são a amplificação de genes de rRNA, mtRNA, tRNA e microssatélites. O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados, serem relativamente curtas (500 a 800 pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma, permitem que sejam amplificadas e seqüenciadas com facilidade (FUNGARO, 2000). Paul (2001) ressaltava que o DNA ribossomal nuclear é constituído por regiões transcritas e não transcritas. A ITS1 e ITS2 são regiões variáveis e podem ser amplificadas pela técnica PCR usando iniciadores universais ITS5 e ITS4 (Figura 1). O mesmo autor utilizou esta técnica para comparar *Pythium longandrum* sp nov. com espécies correlatas. Sosa-Gómez et al. (1998) sequenciaram o gene 5.8S de *Metarhizium* com as regiões intergênicas (ITS 1 e ITS 2) e a análise filogenética dos dados de sequenciamento mostrou que *M. anisopliae* constitui um grupo monofilético, e *M. flavoviride* e *M. album* representam duas linhas evolucionárias separadas.

Uma ferramenta bastante apropriada para análises de DNA, é a investigação sobre as variações no tamanho dos fragmentos gerados de distintas amostras de DNA clivadas com enzimas de restrição, pela comparação entre o número e tamanho dos

fragmentos produzidos pela digestão do DNA com ou sem uma posterior etapa de hibridização com sondas marcadas (MARQUES et al., 2002). As enzimas de restrição cortam o DNA em sítios, onde cada enzima reconhece uma sequência característica e específica de nucleotídeos. A alteração em ao menos um nucleotídeo pode criar ou destruir um sítio de restrição. Por isso quando existe variação ou polimorfismo entre indivíduos na posição dos sítios de corte e no comprimento de DNA entre eles, ocorrem fragmentos de restrição de diferentes tamanhos (SANTOS, 2001).

Análises de restrição de ITS e 5.8S de ITS tem auxiliado na taxonomia de espécies fúngicas. Nas espécies *Beauveria brongniartii* e *M. anisopliae*, foi observada alta variabilidade intraespecífica, sendo esta região útil para caracterização de isolados destas espécies (NEUVÈGLISE et al., 1994; LEAL, 1996). Pipe et al. (1995) analisaram RFLPs de genes do rRNA em *Metarhizium* observando a homogeneidade dos isolados brasileiros que foram obtidos de cercopídeos, distinguindo-se dos isolados de *M. flavoviride* embora tenham sido obtidos do mesmo hospedeiro, nas Filipinas. Baseados nas sequências do gene ribossomal 28S, Driver et al. (2000) analisaram 123 linhagens de *Metarhizium*, sugerindo duas novas variedades para as espécies *M. anisopliae* e *M. flavoviride*.

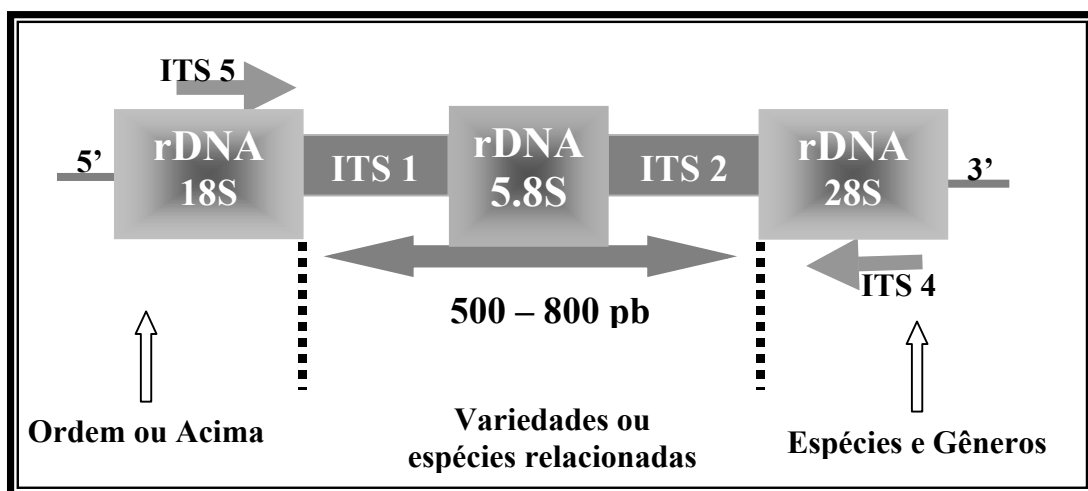


Figura 1. Estrutura do agregado gênico com representação das regiões ITS1, ITS2 e a subunidade 5.8S do rDNA com os iniciadores ITS5 e ITS4. Adaptado de Fungaro (2000).

2.4.3. INTRON SPLICING SITE PRIMER

Nos organismos eucariotos, incluindo o homem, um arquivo do DNA com a mensagem para a síntese de uma cadeia polipeptídica é, geralmente, interrompido por certas porções que não têm função codificante e, portanto, não aparecem representadas na proteína. Tais porções não codificantes são referidas como *introns*, enquanto as regiões com a informação codificada são os *exons* (FARAH, 2000).

Os *introns* foram separados em quatro diferentes categorias de acordo com suas características estruturais e os mecanismos de remoção. Estes *introns* classificam-se em: *intron* do grupo I, *intron* do grupo II, *intron* de mRNA nuclear e *intron* do tRNA nuclear (CECH, 1990; SUGA et al., 2000). Os *introns* do grupo I e do grupo II são classificados de acordo com suas organizações internas e têm uma capacidade intrínseca de auto-remoção por montagem (BRASILEIRO, 2003). Podem ser utilizados como marcadores moleculares, podendo implementar informações valiosas para o estudo das relações taxonômicas e dos estudos de diversidade intra e interspecífica, bem como, estudos de heterogeneidade com *introns* de genes que codificam proteínas, como a β -tubulina (HAN et al. 2002). Em estudo realizado com *M. anisopliae* var. *anisopliae*, foram identificados *introns* do grupo I em espaços na região 28S do rDNA revelando a presença de 5 grupos distintos destas estruturas em diferentes sítios de inserção (MAVRIDOU et al. 2000). Foi detectado alto grau de polimorfismo genético entre linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de destilarias, utilizando o iniciador EI1 da região *intron* grupo I (GUERRA et al., 2001). Pataro et al. (2000) investigaram o polimorfismo genético em linhagens de *S. cerevisiae*, usando leveduras associadas à fermentações espontâneas em três destilarias produtoras de cachaça no Brasil, usando o iniciador EI1. Pires (2002) utilizou o iniciador EI1 para investigar a diversidade genética de vinte linhagens de *B. bassiana*, obtendo cinco grupos distintos.

2.4.4 RAPD

Utilizando-se do princípio da técnica de PCR, dois grupos de pesquisadores desenvolveram uma técnica que recebeu duas denominações distintas: AP-PCR (Arbitrarily Primed - Polymerase Chain Reaction) (WELSH & McCLELLAND, 1990), a qual utiliza iniciadores mais longos (de 20 a 34 nucleotídeos), com temperatura de ligação de 40⁰C e RAPD descrito por Williams et al.(1990) , este método, envolve o uso de um iniciador de dez bases, com a temperatura de ligação ao DNA-alvo em torno de 36-60⁰C. Os produtos de amplificação são analisados diretamente em um gel de agarose corado com brometo de etídio. Cada iniciador (ou conjunto de iniciadores) origina um padrão diferente de produtos de PCR, cada um com potencial de detectar polimorfismos entre linhagens da mesma espécie. Uma das vantagens desse método é a possibilidade de identificação e caracterização, sem o conhecimento prévio de nenhuma sequência do genoma do organismo a ser analisado (WELSH & McCLELLAND, 1991; SOSA-GÓMEZ et al., 1998). Em fungos, em média, cada iniciador gera 10 segmentos amplificados, com peso molecular de aproximadamente 300 a 2500 pb. Ao serem totalizados os fragmentos obtidos com diferentes iniciadores, tem-se desta forma um grande número de locos a serem analisados. A presença de um fragmento amplificado em alguns dos genótipos comparada com a ausência do mesmo em outros genótipos, caracteriza o que se denomina polimorfismo de RAPD (FUNGARO, 2000).

RAPD é extensivamente utilizada para a caracterização de fungos entomopatogênicos, para a avaliação de epizootias causadas após sua aplicação no campo. Exemplos de diferenciação de espécies utilizando essa técnica são diversos (LEAL et al.; 1994; LEAL et al., 1997; LEAL-BERTIOLI, 1998). Bidochka et al. (1994) utilizaram a técnica para diferenciar linhagens de *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *B. bassiana* isoladas de insetos e regiões geográficas diferentes, observaram que os grupos foram muito distintos apesar da proximidade geográfica. Fungaro et al. (1996) realizaram estudo para comparar a variabilidade entre dois grupos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* isolados de *Deois flavopicta* e do solo usando essa técnica e verificaram uma menor diversidade genética entre os isolados

de insetos, sugerindo um certo grau de especificidade em relação ao hospedeiro. Para distinção entre isolados de *M. flavoviride*, Silveira et al. (1998) utilizaram RAPD para analisar um grupo de isolados do Brasil e isolados da África e da Austrália e constaram que os isolados brasileiros foram particularmente homogêneos. Freire et al. (2001) constataram que esta técnica é bastante sensível para detectar diferenças entre linhagem selvagem e mutantes obtidos por radiação gama, ao analisarem mutantes da linhagem selvagem E₉ de *M. anisopliae* var. *anisopliae* quanto ao perfil de DNA pela técnica RAPD. Tigano-Milani et al. (1995) separaram linhagens de diferentes isolados brasileiros de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *majus* e *M. flavoviride* em grupos fenéticos, e verificaram que os genótipos estão mais relacionados às espécies hospedeiras do que à origem geográfica. Tigano & Aljanabi (2000) utilizaram a análise de RAPD para demonstrar a diversidade genética em uma coleção de isolados brasileiros de *Nomuraea rileyi*.

Pantou et al. (2003) ressaltaram a importância do uso de várias abordagens moleculares para detectar polimorfismos em fungos, dentre elas o uso do RAPD como ferramenta adicional para complementar dados em estudos genéticos.

2.4.5. MICROSSATÉLITE

No início dos anos 80, diversos experimentos demonstraram que os genomas eucariotos são densamente povoados por diferentes classes de seqüências repetidas, umas mais complexas (os minissatélites) e outras mais simples (microssatélites). As Seqüências Simples Repetidas, que correspondem aos microssatélites, consistem de pequenas seqüências com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem*. São mais freqüentes nos genomas dos eucariotos, distribuídas ao acaso e formam *loci* genéticos muito mais polimórficos do que os *loci* hipervariáveis constituídos por minissatélites (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998)

Repetições de mononucleotídeos envolvendo as bases A ou T são muito mais freqüentes do que repetições com as bases G ou C. Por outro lado, no caso dos dinucleotídeos, as seqüências repetidas CA e CT são mais comuns do que as repetições de CG. Embora os microssatélites ocorram na maioria das vezes em

posições extragênicas ou dentro de *introns*, seqüências deste tipo também foram descritas em regiões codificadoras dos genes (FARAH, 2000). Os métodos que detectam o polimorfismo nos *loci* de seqüência repetida simples, geram um grande número de alelos detectáveis oferecendo boa reprodutibilidade.

Muitas técnicas de DNA *fingerprinting* tem sido usadas para definir populações fúngicas e com isso tem crescido o interesse pelo uso de marcadores que detectam e caracterizam múltiplos alelos em um determinado *locus* (BARNES et al, 2001; HAN et al., 2002).

Assim como no RAPD, os padrões de fragmentos obtidos pela amplificação também são afetados por parâmetros como o tipo e concentração do iniciador escolhido, concentração e pureza do DNA molde, concentração de magnésio e temperatura para o anelamento. Porém, assim mesmo, é mais reprodutível e confiável que o RAPD, em função da maior estringência de anelamento, maior tamanho do iniciador e alto grau de homologia entre as seqüências usadas como iniciadores e seus sítios de ligação no DNA alvo, se as seqüências estiverem próximas o suficiente para que possam ser amplificadas (SILVA FILHO, 2003). Os microssatélites são muito atrativos para os geneticistas, pois combinam várias vantagens como sua co-dominância, multialelismo e sua alta heterozigosidade. O alto nível de polimorfismo que detecta permite uma discriminação precisa entre indivíduos proximamente relacionados. Além de serem altamente polimórficos, os microssatélites usam quantidades mínimas de DNA, equivalentes as usadas no RAPD. As condições de amplificação e da reação são espécies-específica e a variação na quantidade de produtos amplificados pela PCR é resultado do número de unidades repetidas (BECERRA & PAREDES, 2000).

Marcadores moleculares baseados em microssatélites podem ser obtidos para a discriminação de Taxa, o que é chamado de "*microsatellite fingerprinting*". Este método tem sido testado em vários fungos, detectando polimorfismo inter e intraespecíficos, auxiliando também nos estudos de melhoramento genético de plantas. A utilização da técnica tem auxiliado a identificação e a caracterização de fungos (LEAL-BERTIOLI, 1998).

Segundo Gupta et al. (1994), os iniciadores de microssatélites com motivos de (AT)_n, (CA)_n, (CT)_n, (GT)_n, (TG)_n, (ACA)_n, (ACC)_n, (ACG)_n, (ACT)_n, (AGC)_n, (AGG)_n, (AGT)_n, (ATC)_n, (GAC)_n, (GTG)_n, (GACA)_n, (GATA)_n, (TGTC)_n são usualmente utilizados para amplificação de inter-regiões repetidas. Esta ferramenta produz padrão de amplificação que revela o possível polimorfismo de DNA na sequência de nucleotídeo entre os dois sites de microssatélites no genoma de fungos, gerando o perfil ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*).

Os iniciadores (GACA)₄ e M13 foram utilizados por Bidochka et al. (1994) para diferenciar linhagens dos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Realização dos Experimentos

O trabalho foi executado no Laboratório de Genética Molecular de Fungos e Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

3.2 Linhagens de *Metarhizium*

As linhagens de *Metarhizium* foram fornecidas pela Coleção de culturas - Micoteca URM (Universidade de Recife - Micologia) do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (Tabela 1). Os mutantes foram obtidos por Kuklinsk-Sobral (1999).

Tabela 1. Linhagens de *Metarhizium* utilizadas.

Nº de acesso (Micoteca URM)	Espécie	Hospedeiro	Origem
URM 4412	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	<i>Austracnis guttulosa</i>	Austrália
URM 4413	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	<i>Mahanarva posticata</i>	Brasil
URM 4410	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	<i>Schistocerca pallens</i>	Brasil
URM 4415	<i>Metarhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i>	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	França
URM 4400	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	<i>Schistocerca pallens</i>	Brasil
URM 4411	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	<i>Zonocerus elegans</i>	Tanzânia
URM 3800	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	<i>Schistocerca pallens</i>	Brasil
URM 3996*	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	Mutante	Brasil
URM 3997*	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	Mutante	Brasil
URM 3998	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	<i>Ornithacris cavroise</i>	Nigéria
URM 4413c**	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	<i>Mahanarva posticata</i>	Brasil
URM 4920	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Mahanarva posticata</i>	Brasil
URM 4921	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Mahanarva posticata</i>	Brasil
URM 4922	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Mahanarva posticata</i>	Brasil
URM 4923	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Mahanarva posticata</i>	Brasil

* mutante obtido por radiação UV

** reisolado de *Boophilus microplus*

3.3 Análise da diversidade genética através do uso de marcadores moleculares

Os fungos, obtidos de culturas monospóricas, foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio Czapeck líquido (LACAZ, 1991) sob agitação de 250 rpm, por 96 horas a 28°C. Após este período, o micélio foi coletado por filtração a vácuo, lavado com água destilada autoclavada, determinada a massa úmida e estocado a -20° C para posterior extração do DNA.

3.3.1 Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA das linhagens de *Metarhizium*, seguiu-se a técnica descrita por Raeder & Broda (1985). A massa micelial foi triturada com nitrogênio líquido, em seguida transferida para microtubos, aos quais foi adicionado 800 µL do tampão de extração (Tris-HCl 200mM pH 8,0; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; Dodecil Sulfato de Sódio 1%), homogeneizado sob leve agitação manual, incubados a 65°C por 15 minutos. Posteriormente, foram realizadas as extrações com fenol saturado (Invitrogen Life Technologies), um volume de clorofane (fenol e clorofil misturados na proporção de 1:1) e um volume de clorofil (clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1), em seguida, para cada etapa, foram realizadas centrifugações a 12.000 rpm por 15 minutos. Retirou-se o sobrenadante ao qual foram adicionados NaCl 0,3M e 2 volumes de etanol absoluto resfriados a -20°C, para precipitação do DNA. O precipitado foi lavado com Etanol a 70% centrifugado por 15 minutos, seco à temperatura ambiente, ressuspendido em tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 1M e EDTA 0,5M) e preservado sob refrigeração a 4°C.

3.3.2 Quantificação do DNA genômico

A concentração do DNA foi estimada através da eletroforese em gel de agarose 0,8% a 3 V/cm de distância entre os eletrodos, utilizando tampão de corrida Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, por comparação com marcador de peso molecular DNA de fago λ (Invitrogen Life Technologies).

3.3.2.1. Revelação dos géis

O gel, após a migração eletroforética, foi corado em solução de brometo de etídio (TBE 1X / EtBr 0,5 µg/mL - SAMBROOK et al., 1989) por 30 minutos, observado em transiluminador ultravioleta e fotografado usando filme Polaróide 667.

3.3.3 Amplificação do DNA

As amostras de DNA foram submetidas a PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores listados na Tabela 2, usando Termociclador MJ Research.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo.

<i>PRIMER</i>	SEQUÊNCIA(5'-3')	MARCADOR MOLECULAR	REFERÊNCIA / FORNECEDOR
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS	White et al. (1990)
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAA	ITS	White et al. (1990)
(GTG ₅)	GTGGTGGTGGTG	SSR	Lieckfeld et al. (1993)
(GACA ₄)	GACAGACAGACAGACA	SSR	Meyer & Mitchel (1995)
M13	GTAAAACGACGGCCAGT	SSR	Barros Lopes et al. (1996)
EI1	CTGGCTTGGTGTATGT	INTRON	Barros Lopes et al. (1996)
OPA-04	AATCGGGCTG	RAPD	Operon Technol., Inc. (CA)
OPA-09	GGGTAACGCC	RAPD	Operon Technol., Inc. (CA)
OPA-10	GTGATCGCAG	RAPD	Operon Technol., Inc. (CA)
OPA-16	AGCCAGCGAA	RAPD	Operon Technol., Inc. (CA)
OPA-20	GTTGCGATCC	RAPD	Operon Technol., Inc. (CA)
OPX-04	CCGCTACCGA	RAPD	Operon Technol., Inc. (CA)
OPX-06	ACGCCAGAGG	RAPD	Operon Technol., Inc. (CA)
OPX-11	GGAGCCTCAG	RAPD	Operon Technol., Inc. (CA)

3.3.3.1 Região ITS do rDNA

3.3.3.1.1 Amplificação do DNA da região ITS do rDNA

As reações de amplificação foram feitas para um volume final de 25µL: do tampão (Tris-HCl 20mM pH 8,4; KCl 50mM) MgCL₂ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, 12,5 pmols do iniciador, *Taq* DNA polimerase 2U (Invitrogen Life Technologies) e 50 ng do DNA, conforme descrito por White et al. (1990). Para amplificação da região ITS foi utilizado o termociclador (MJ Research) com a seguinte programação: desnaturação inicial a 95⁰C por 4 minutos, 40 ciclos a 92⁰C por 1 min, 55⁰C por 1 min, 72⁰C por 2 minutos e extensão final a 72⁰C por 5 minutos. Os produtos de amplificação do *locus* ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,8%, a 3 V/cm em tampão de corrida 1X TBE (pH 8,0), utilizando-se marcador de peso molecular 100-pb (Invitrogen Life Technologies). Em seguida o gel foi corado de acordo com o item 3.3.2.1.

3.3.3.1.2 RFLP - *locus* ITS1- 5.8S-ITS2 do rDNA

A digestão enzimática foi realizada pela mistura de 4µL dos produtos de PCR das regiões ITS do rDNA com 16 µL do Mix de restrição contendo 0,1U das enzimas de restrição: *Msp*I, *Hae*III e *Dra*I (Invitrogen Life Technologies) em tampão de restrição específico. Após a incubação de duas horas à 37⁰C com cada uma das três enzimas, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,8% utilizando-se o marcador de peso molecular de 100-pb (Invitrogen Life Technologies), a 3 V/cm de distância entre os eletrodos, imerso em tampão de corrida 1X TBE (pH 8,0). Após corrida foi procedida a revelação do gel, item 3.3.2.1.

3.3.3.2 Intron Splice Site Primer

As reações de amplificação foram feitas para um volume final de 25µL: do tampão (Tris-HCl 20Mm pH 8,4; KCl 50Mm) MgCL₂ 3 mM, dNTP 0,25 mM, 25 pmols do iniciador, *Taq* DNA polimerase 0,1U (Invitrogen Life Technologies) e 50 ng do DNA, como descrito por Barros Lopes et al. (1996). Para amplificação foi utilizado o termociclador (MJ Research) com a seguinte programação: desnaturação

inicial 94⁰C por 3 minutos, 40 ciclos a 94⁰C por 1 minuto, 45⁰C por 1 minuto, 74⁰C por 30 segundos e extensão final a 74⁰C por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, a 3 V/cm⁻¹ em tampão de corrida 1X TBE (pH 8,0), utilizando-se marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen Life Technologies). Em seguida o gel foi corado como descrito anteriormente.

3.3.3.3 RAPD

Cinquenta e quatro oligonucleotídeos arbitrários da Operon Technologies, provenientes dos kits OPW, OPA e OPX foram testados com o DNA total da linhagem 4415 *M. flavoviride* var. *flavoviride* para avaliar sua capacidade de amplificação.

As reações de amplificação foram feitas para um volume final de 25µL: do tampão (Tris-HCl 20mM pH 8,4; KCl 50mM), MgCl₂ 3,4mM, dNTP 0,25mM, 0,4 mM dos iniciadores, *Taq* DNA polimerase 2U (Invitrogen Life Technologies) e 25 ng do DNA, conforme descrito por Williams et al. (1990). Os ciclos de amplificação foram programados da seguinte forma: uma etapa de desnaturação inicial a 5 minutos 92⁰C seguidos por 40 ciclos de 1 minuto a 92⁰C, 1 minuto e 30 segundos a 39⁰C e 2 minutos a 72⁰C. Após a migração eletroforética em gel de agarose 1,4%. O gel foi corado, de acordo com o item 3.3.2.1. Utilizou-se o marcador de peso molecular DNA de fago λ clivado com *Hind* III (Invitrogen Life Technologies).

3.3.3.4 Microssatélites

As reações de amplificação foram feitas para um volume final de 25µL: do tampão (Tris-HCl 20mM pH 8,4; KCl 50mM), MgCL₂ 0,75 mM, dNTP 0,25 mM, 0,25µM dos iniciadores, *Taq* DNA polimerase 0,1U (Invitrogen Life Technologies) e 50 ng do DNA. Para amplificação foi utilizado o termociclador (MJ Research) com a seguinte programação: desnaturação inicial 93⁰C por 5 minutos, 40 ciclos a 93⁰C por 20 segundos, 55⁰C por 45 segundos, 72⁰C por 90 segundos e extensão final 72⁰C por 6 minutos). Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, a 3 V/cm em tampão de corrida 1X TBE (pH 8,0), utilizando-se

marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen Life Technologies) para o iniciador (GTG)₅ Lieckfeld et al. (1993) e 100-pb (Invitrogen Life Technologies) para os iniciadores M13 Barros Lopes et al. (1996) e (GACA)₄ Meyer & Mitchel (1995). Em seguida o gel foi corado e fotografado como descrito anteriormente.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos pelos quatro marcadores moleculares foram analisados pelo programa NTSYS-PC (Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs) (ROHLF, 1988). Esses dados foram introduzidos na forma de variáveis binárias, ou seja, o número 1(um) indicando a presença de bandas, e o número 0 (zero), ausência. Desse modo, foi construída uma matriz de similaridade, utilizando-se o coeficiente de JACCARD (J) (FUNGARO, 1994), calculado de acordo com a fórmula:

$$J = A/(P-D) \quad \text{onde: } A = \text{Número de concordâncias positivas, ou seja, de} \\ \text{variáveis presentes;}$$

$$P = \text{Número total de variáveis;}$$

$$D = \text{Número de concordâncias negativas, ou seja, de} \\ \text{variáveis ausentes.}$$

A partir da construção da matriz de similaridade foi gerado um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (*Umweighted Pair Group Method With Arithmetical Average*).

3.5- TESTE DE PATOGENICIDADE

3.5.1 Obtenção dos insetos

Larvas de terceiro instar de *Diatraea saccharalis*, provenientes da Estação Experimental da Cana-de-Açúcar de Carpina, foram transportadas para o Laboratório e acomodadas em recipientes plásticos.

3.5.2 Produção do Inóculo

A produção do inóculo das linhagens selecionadas para os biosensaio, 4415, 4922, 4400, 4410, 3998, 4412 e 3997 foi realizada conforme a metodologia descrita por Vilas Boas et al. (1996) e a quantificação foi realizada segundo ALVES e MORAES (1998).

A concentração de conídios foi ajustada para 1×10^8 conídios/mL.

3.5.3 Bioensaios

As larvas de tamanho variando entre 30 e 50mm foram inoculadas por aspersão dos conídios na concentração 1×10^8 conídios/mL. A pulverização foi efetuada com um mini pulverizador manual De Vilbiss nº 15, sendo 3 mL das suspensões utilizadas por repetição. Para a testemunha utilizou-se apenas água destilada autoclavada (ADA) + espalhante adesivo (Tween 80). As lagartas inoculadas foram individualizadas em caixas plásticas contendo uma porção de colmo de milho com aproximadamente 2cm de comprimento (FIGUEIRÊDO et al., 2002).

O experimento foi conduzido em condições de laboratório, em delineamento inteiramente casualizado, com 8 tratamentos e três repetições, cada parcela apresentando 10 lagartas.

A eficiência das linhagens foi avaliada através da porcentagem da mortalidade das larvas utilizando-se o programa SANEST versão 3.0 para o cálculo da análise de variância e comparação das médias pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Foram obtidas distribuições absolutas e percentuais acumulados do número de insetos mortos por linhagem e cálculo da TL_{50} . Para o cálculo da TL_{50} , os valores das mortalidades acumuladas foram submetidos à análise de Probit. Os cálculos estatísticos foram obtidos através do programa SAS (Statistical Analysis System) versão 8.0 (ZAR, 1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A Figura 2 mostra que todas as linhagens de *Metarhizium* deram origem a fragmentos de alto peso molecular. As quantidades de DNA genômico variaram de 100 a 300 ng/ μ L.



Figura 2. Quantificação de DNA de linhagens de *Metarhizium*. Nas pistas A, B e C, encontram-se os marcadores do DNA de fago λ nas concentrações de 100, 150, 250 ng/mL, respectivamente; nas pistas 1 a 15, encontram-se os DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.

4.2 REGIÕES ITS DO DNA RIBOSSOMAL

4.2.1 Análise dos produtos de amplificação

O produto de amplificação do *locus* ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA utilizando os iniciadores ITS4 e ITS5, apresentou fragmentos em torno de 610pb para as linhagens 4412, 4413, 4410, 4400, 4411 de *M. anisopliae* var. *acridum* e 620pb foi observado para 4920, 4921, 4922, 4923 de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, 3996, 3997, 3998, 4413c, 3800 de *M. anisopliae* var. *acridum* e 4415 de *M. flavoviride* var. *flavoviride* (Figura 3).

Destéfano (2003) realizou análises de polimorfismo do gene 18S para separar espécies de *Metarhizium*, obtendo sucesso dependendo da enzima de restrição utilizada. Entretanto, este marcador é mais indicado para diferenciação de gênero. No presente estudo, os produtos amplificados, correspondentes as regiões espaçadoras ITS1-5.8S-ITS2, mostraram variação no tamanho entre as espécies de *Metarhizium* analisadas.

4.2.2 Análise dos fragmentos de restrição

Não foi observada a digestão dos amplicons com a enzima *DraI*, enquanto a enzima *MspI* (Figura 4) gerou quatro fragmentos distintos em tamanho (180, 120, 110 e 90pb), para as linhagens 4413 de *M. anisopliae* var. *acridum* e 4415 de *M. flavoviride* var. *flavoviride*. A restrição dos amplicons com a enzima *HaeIII* (Figura 5) gerou fragmentos de 480 e 130pb para as linhagens 4412, 3996, 3997, 3998, 4413C, 3800, fragmentos de 460 e 75pb para 4413 e 4415, e fragmentos de 460 e 130pb para 4410, U4400, 4411, 4920, 4921, 4922, 4923. A variação no tamanho dos produtos de amplificação tem sido apontada como um bom marcador molecular para muitas espécies de fungos (COATES et al., 2002; FOULY et al., 1997). A análise de agrupamento, em conjunto, dos produtos de amplificação com as enzimas *MspI* e *HaeIII*, permitiu a construção de um dendrograma que definiu dois grupos distintos, evidenciando a similaridade existente entre *M. flavoviride* var. *flavoviride*, *M.*

anisopliae var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae*, não sendo possível também correlacionar os grupos com áreas geográficas e hospedeiros (Figura 6). Os dois grupos reuniram-se com uma distância genética de 63% de similaridade. O primeiro grupo formou três sub-agrupamentos, o primeiro sub-grupo representado pela linhagem 4412 de *M. anisopliae* var. *acridum*, o segundo sub-grupo representado por quatro linhagens (3996, 3997, 3998, 4413c) de *M. anisopliae* var. *acridum* e por quatro linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* 4923, 4922, 4921, 4920 com 100% de similaridade e o terceiro sub-grupo composto pela linhagem selvagem de *M. anisopliae* var. *acridum* 3800 que distanciou-se das linhagens mutantes com 68% de fragmentos em comum. O segundo grupo, com o primeiro sub-agrupamento composto pelas linhagens 4413 de *M. anisopliae* var. *acridum* isolado de *M. posticata* e 4415 de *M. flavoviride* var. *flavoviride* isolado de *Otiorhynchus sulcatus* com 83% de similaridade. As linhagens do segundo sub-grupo 4410, 4400 e 4411 de *M. anisopliae* var. *acridum* agruparam-se com 100% de homologia.

Estes resultados mostram a dificuldade em separar *M. anisopliae* var. *acridum* de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, uma vez que com estes resultados foi

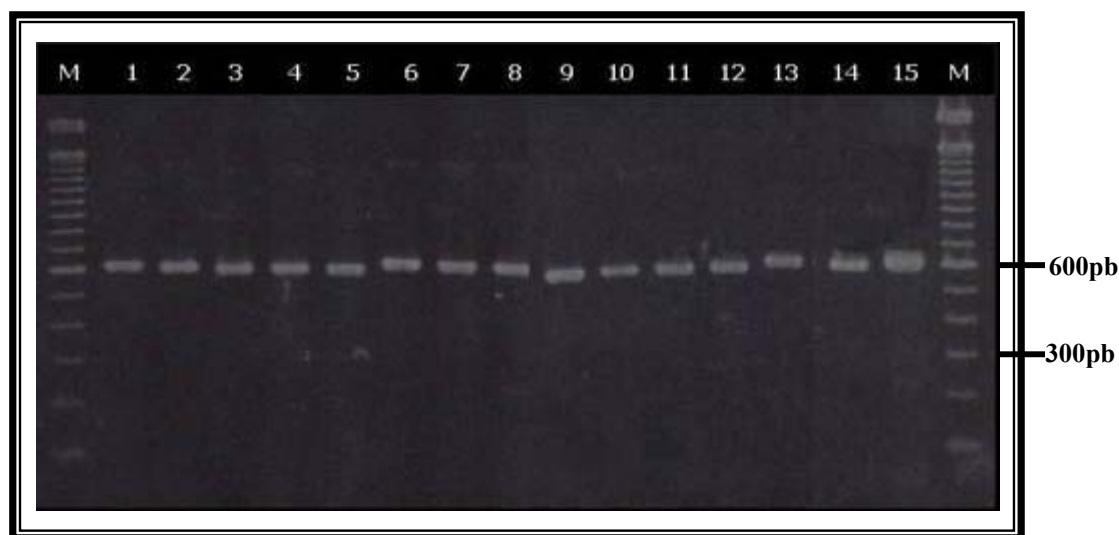


Figura 3. Perfil de amplificação da região ITS do rDNA de linhagens de *Metarhizium* obtido com os iniciadores ITS5 e ITS4. Na pista M, marcador de peso molecular 100 pb; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4400, 4411, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c, 4415, 3800), respectivamente.

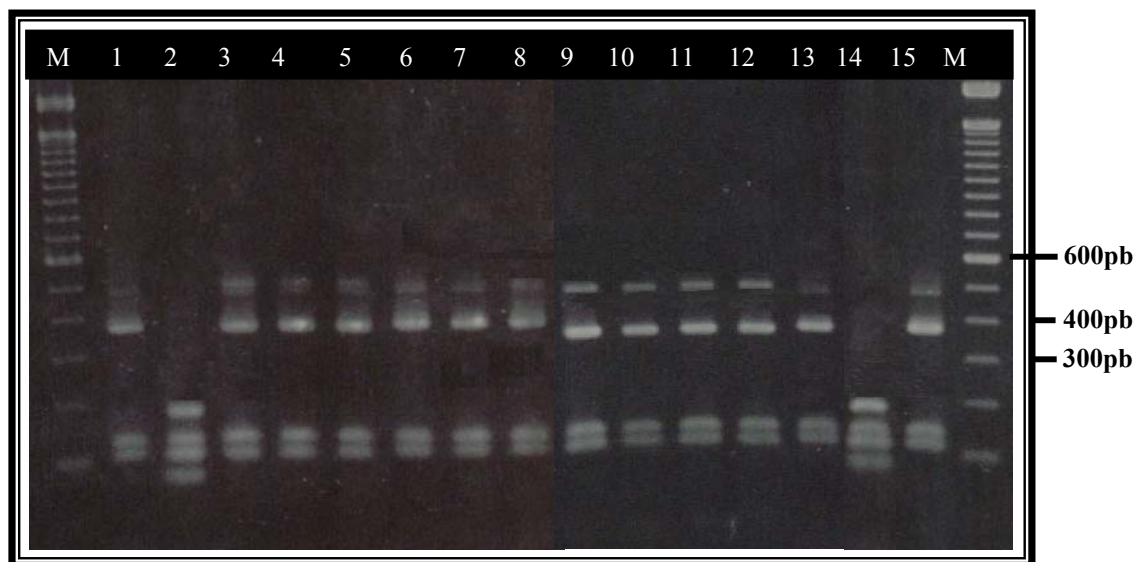


Figura 4. Perfil de restrição dos fragmentos de DNA da região ITS do rDNA de linhagens de *Metarhizium* obtido com a enzima *MspI*. Na pista M, marcador de peso molecular 100 pb; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4400, 4411, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c, 4415, 3800), respectivamente.

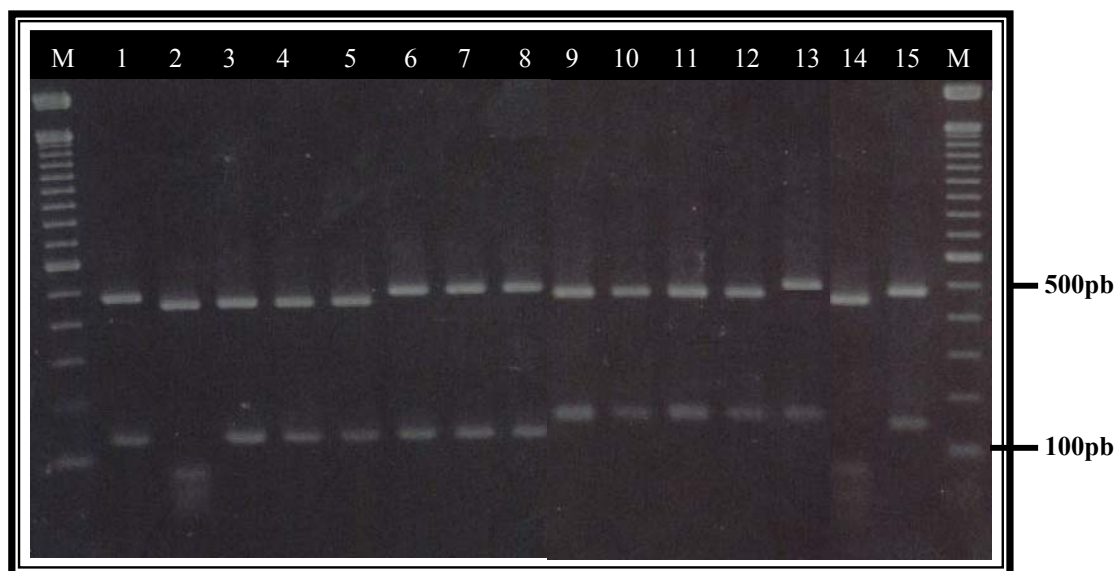


Figura 5. Perfil de restrição dos fragmentos de DNA da região ITS do rDNA de linhagens de *Metarhizium* obtido com a enzima *HaeIII*. Na pista M, marcador de peso molecular 100 pb; Nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4400, 4411, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c, 4415, 3800), respectivamente.

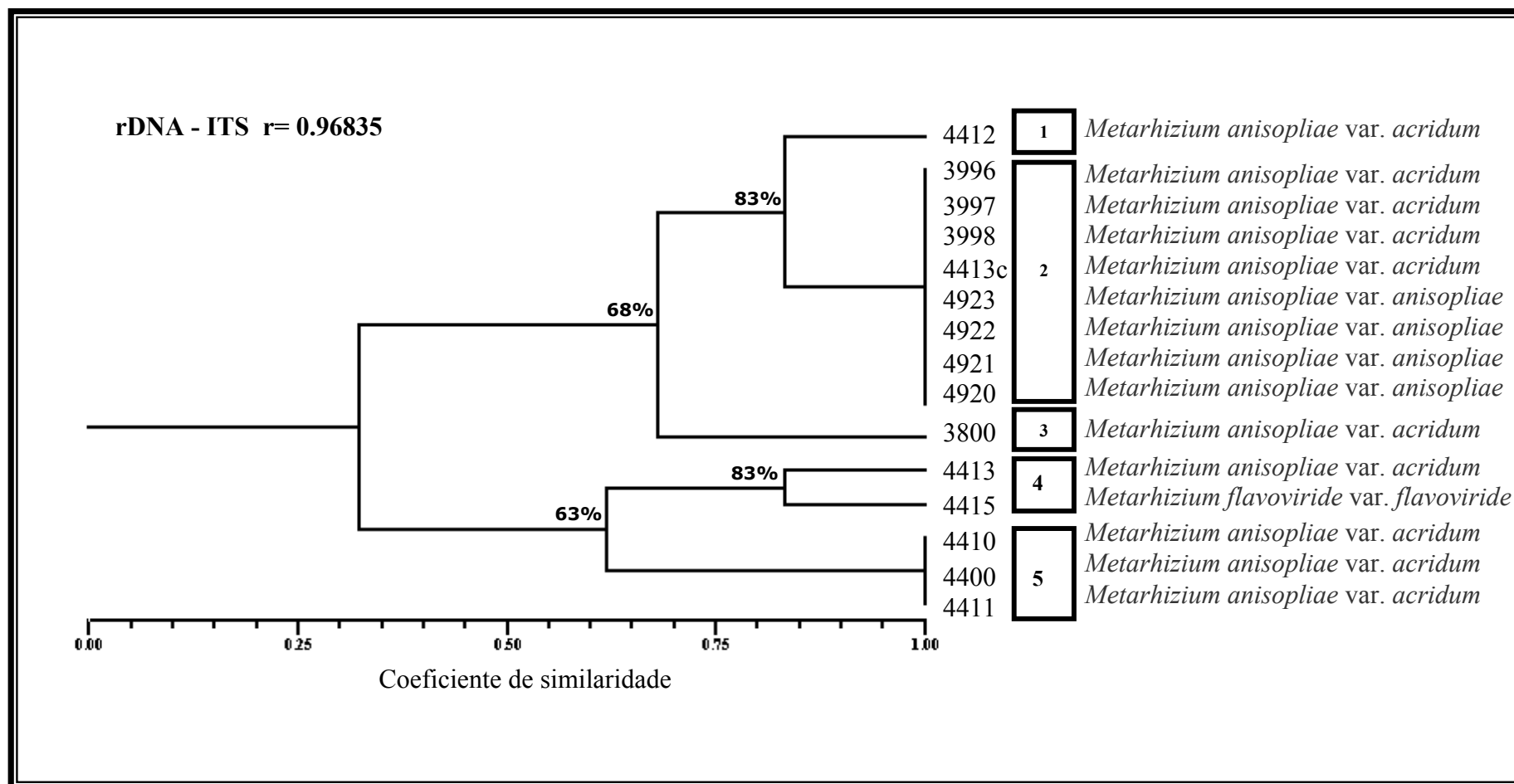


Figura 6. Dendrograma construído pelo método UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir do perfil dos fragmentos de restrição da região ITS do rDNA obtido de 15 linhagens de *Metarhizium* com as enzimas de restrição *MspI* e *HaeIII*.

observado 100% de similaridade entre as linhagens 3996, 3997, 3998, 4413c de *M. anisopliae* var. *acridum* e 4923, 4922, 4921, 4920 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* pertencentes ao primeiro grupo.

Trabalhos semelhantes foram realizados por Inglis et al. (1999) que conseguiram diferenciar linhagens distintas de *M. flavoviride* var. *flavoviride* e *M. anisopliae* var. *acridum* todas isoladas de gafanhotos (Acrididae), usando enzimas de restrição. Os autores sugerem a possibilidade de insucesso na classificação dos isolados usando apenas caracteres morfológicos clássicos, neste trabalho as linhagens brasileiras de *M. anisopliae* var. *acridum* ainda eram reconhecidas como *M. flavoviride* (DRIVER et al. 2000). Estes mesmos autores, não conseguiram detectar relações entre regiões e origem das linhagens brasileiras, não puderam resolver relações entre as linhagens africanas e australianas que agruparam-se com 25% de similaridade através do uso de sonda de consenso telomérico.

Destéfano et al. (2004) utilizaram a análise da região ITS1-5.8S-ITS2 para diferenciar três espécies do gênero *Metarhizium*. A amplificação com os iniciadores universais ITS1 e ITS4 resultou em um fragmento de aproximadamente 540pb para as linhagens brasileiras de *M. anisopliae* var. *anisopliae*; 600pb para uma linhagem de *M. anisopliae* var. *anisopliae* originária da Austrália; 650 pb para as linhagens de *M. album* e de 600pb para a linhagem de *M. flavoviride*. As diferenças detectadas pela PCR-RFLP possibilitaram aos autores desenhar iniciadores específicos desta região, para detecção e identificação de *M. anisopliae*. Os mesmos autores ressaltaram a importância do uso de enzimas de restrição, uma vez que a variação no tamanho dos sítios de restrição nas regiões ITS pode ser usado para diferenciar *M. anisopliae* var. *anisopliae* de *M. album* e *M. flavoviride*. Brasileiro et al. (2004) utilizaram os iniciadores ITS4 e ITS5 obtendo fragmentos de 620pb para dezoito isolados de *Fusarium solani*

Genes ribossomais e suas regiões ITS e IGS têm sido largamente usados para identificação de espécies (MARTÍNEZ-CULEBRAS et al., 2000) na taxonomia (DRIVER et al., 2000), análise filogenética (RAKOTONIRAINY et al., 1994; HAJEK et al. 2003) e diversidade genética (KISS, 1997).

Curran et al. (1994) usaram amplificação e seqüenciamento do gene 5.8S, regiões intergênicas ITS1 e ITS2 e análises filogenéticas, constataram que *M. flavoviride* e *M. album* representam a mesma linha evolucionária, porém diferente de *M. anisopliae* possuindo uma linha monofilética. No ano seguinte, Pipe et al. (1995) através do marcador RFLP em rDNA analisaram diferentes espécies e isolados de *Metarhizium*. Neste estudo não foram detectados sítios de restrição com a enzima *Hind*III para as linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. flavoviride* e *M. anisopliae* var. *majus* havendo sítio de restrição para *M. album*, havendo restrição dos fragmentos apenas com as enzimas *Bam*HI e *Pst*I para *M. flavoviride* e sem sítio de restrição para as linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Estes autores, concluíram que *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. album* e *M. flavoviride* são três espécies distintas do gênero, confirmando a taxonomia sugerida por Rombach et al. (1987), baseado nas características morfológicas.

Bridge et al. (1993) utilizaram a análise de RFLP com a enzima *Hae*III com 11 isolados de *Metarhizium* e observaram que a digestão enzimática mostrou um padrão simples gerando poucos fragmentos e mostrando o alto grau de similaridade entre os diferentes isolados, da mesma forma que no presente trabalho. A restrição dos fragmentos dos isolados de *M. flavoviride* foi consideravelmente mais complexa, embora tenha apresentado fragmentos em comum com as de *M. anisopliae*. Houve um isolado de *M. anisopliae* que apresentou um padrão de fragmentos "complexo" similar aquele de *M. flavoviride*. Estes autores demonstraram a eficiência da análise de parcimônia, no uso das seqüências do rDNA para resolver relações evolucionárias no gênero *Metarhizium*.

4.3 REGIÕES DE *INTRON*

O perfil de amplificação da região de intron, utilizando o iniciador EI1 nas linhagens de *Metarhizium* esta ilustrado na Figura 7.

O dendrograma (Figura 8) evidenciou a formação de três grupos. No primeiro grupo estão as linhagens 4412 e 4413 com 100% de similaridade entre si e com 90% de similaridade com a linhagem 4413c e 62% com a linhagem 4415 de *M. flavoviride* var. *flavoviride*. O segundo grupo é formado pelas linhagens de *M. anisopliae* var. *acridum* 3800 os mutantes 3996 e 3997 com 100% de similaridade entre si e com 73% de fragmentos comuns com a linhagem 3998. O terceiro grupo, sendo o maior, formado pelas linhagens 4400 e 4411 com 100% de similaridade entre si e com 92% de similaridade com a linhagem 4410 e com 73% de similaridade com as quatro linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* 4920, 4921, 4922 e 4923 isoladas de *M. posticata* que apresentam 100% de similaridade entre si.

Neste marcador também não foi detectada correlação entre região geográfica e hospedeiro de origem.

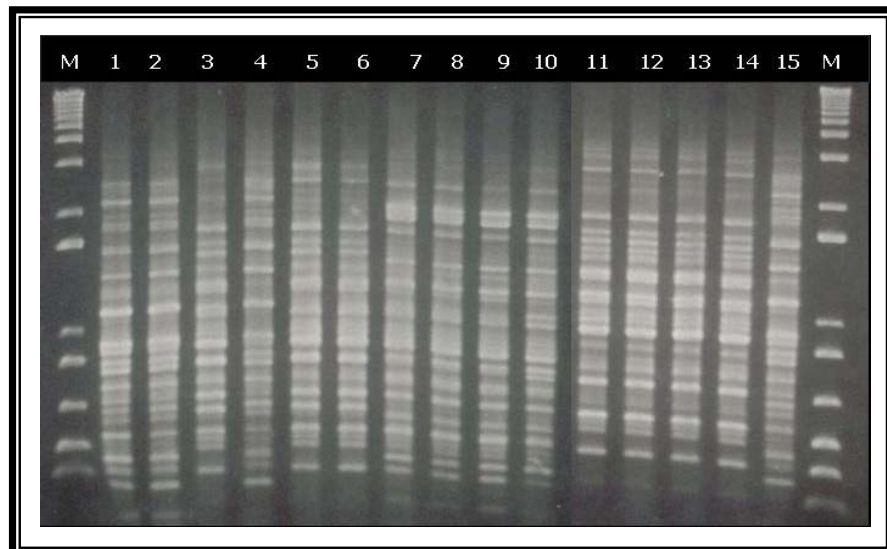


Figura 7 Perfil de *intron* de linhagens de *Metarhizium* obtido com o iniciador EI1. Na pista M, marcador de peso molecular de 1 Kb; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.

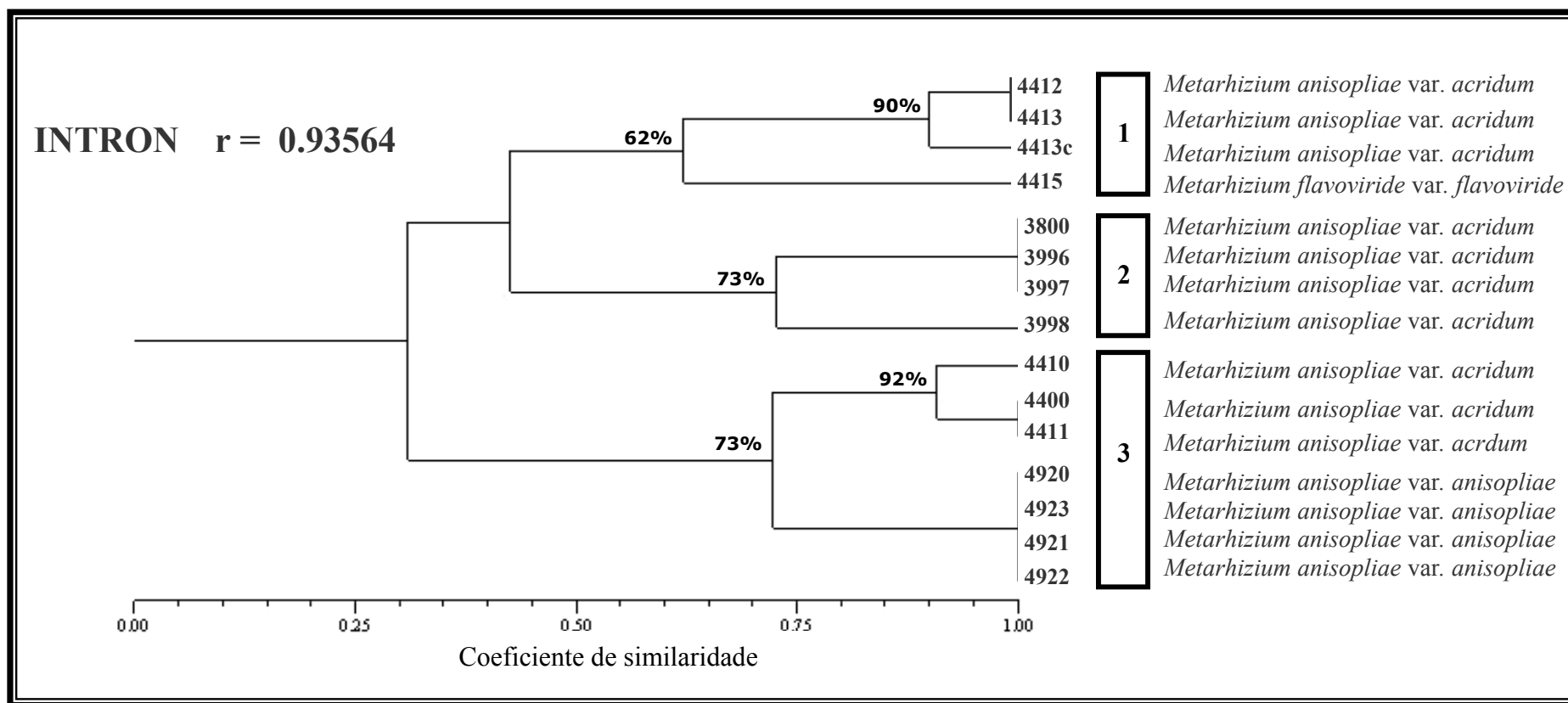


Figura 8. Dendrograma construído pelo método UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir do perfil de *intron splice site primer* obtido de 15 linhagens de *Metarhizium*.

Pela análise do dendrograma pode-se observar que o iniciador de intron EI1 evidenciou maior variabilidade genética do que o iniciador para ITS do rDNA, embora não tenha sido tão sensível em detectar diferenças entre as linhagens de *Metarhizium* como foi evidenciado no estudo sobre as regiões de microssatélites. A diversidade genética encontrada com o iniciador EI1 neste estudo também foi observada em *Beauveria bassiana* (PIRES, 2002) que constatou alta similaridade entre as linhagens isoladas de um mesmo hospedeiro. De forma semelhante as linhagens de *Metarhizium* isoladas de *M. posticata* (4920, 4921, 4922 e 4923) utilizadas neste trabalho, se agruparam com 100% de homologia (Figura 8). Mavridou et al. (2000) estudaram o gene 28S do agregado gênico do rRNA de linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e detectaram cinco *introns* do grupo-I em três diferentes sítios de inserção. Barros Lopes et al. (1996) demonstraram o polimorfismo genético, em linhagens de leveduras comerciais utilizando a técnica de PCR, e quatro iniciadores, entre eles o EI1. Da mesma forma, Guerra et al. (2001) detectaram alto polimorfismo em populações de *S. cerevisiae* durante ciclo fermentativo para produção de cachaça, utilizando este iniciador. Brasileiro (2003) detectou alta variabilidade molecular intraespecífica entre linhagens de *Fusarium solani* isolados de diferentes hospedeiros, através do iniciador EI1.

Esses resultados reforçam a eficiência do emprego desse marcador, para demonstrar a diversidade genética entre linhagens de Anamorfos, visto que para muitos desses fungos já foi detectada a parassexualidade (AZEVEDO, 1998) a exemplo de *M. anisopliae* que teve o ciclo parassexual descrito em 1980 (MESSIAS & AZEVEDO 1980) e *B. bassiana* em 1991 (PACOLA-MEIRELES & AZEVEDO 1991)

4.4 RAPD

Cinquenta e quatro oligonucleotídeos arbitrários da Operon Technologies, provenientes dos kits OPW, OPA e OPX foram testados com o DNA total da linhagem 4415, e oito iniciadores foram selecionados por exibirem um grande número de fragmentos de DNA com nitidez e boa reprodutibilidade.

As Figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 ilustram os perfis genéticos de RAPD das 15 linhagens de *Metarhizium* com os iniciadores OPA-9, OPA-16, OPA-20, OPX-6, OPX-4, OPW-16, OPX-11, OPA-10, respectivamente. A análise de agrupamento dos fragmentos de RAPD (Figura 17) com os iniciadores selecionados, evidenciou uma grande variabilidade, sendo possível discriminar todas as linhagens. As quinze linhagens foram separadas em quatro grupos distintos com cerca de 23% de fragmentos comuns entre os mesmos, não havendo coincidência entre grupos e origem geográfica. No grupo I, as linhagens apresentaram 80% de similaridade, sendo composto por *M. flavoviride* var. *flavoviride* (4415) e *M. anisopliae* var. *acridum* (4412, 4413, 4413c), a primeira linhagem originária da França, a segunda da Austrália e as demais brasileiras. No grupo II as linhagens de *M. anisopliae* var. *acridum* 3800, 3998, agruparam-se com os mutantes morfológicos 3996, 3997 que foram obtidos a partir dessas linhagens selvagens. As linhagens do grupo III, todas de *M. anisopliae* var. *acridum* agruparam-se com uma média ponderada de 87% de similaridade. Os resultados exibem concordância com os de Silveira et al. (1998) que aplicaram a técnica de RAPD para analisar cinco linhagens brasileiras de *Metarhizium* e três da África e Austrália. Entre grupos, as linhagens estudadas mostraram uma menor relação genética representada pela alta dissimilaridade de 23-37% e entre linhagens de cada grupo uma baixa dissimilaridade de 80-87%. As quatro linhagens brasileiras isoladas de *Mahanarva posticata* que foram enquadradas no grupo IV, com 100% de similaridade entre si, distanciaram-se do terceiro grupo com 38% de similaridade e apresentaram-se com um conjunto de fragmentos semelhantes, caracterizando o perfil típico da espécie *M. anisopliae* var. *anisopliae* utilizando os oito iniciadores.

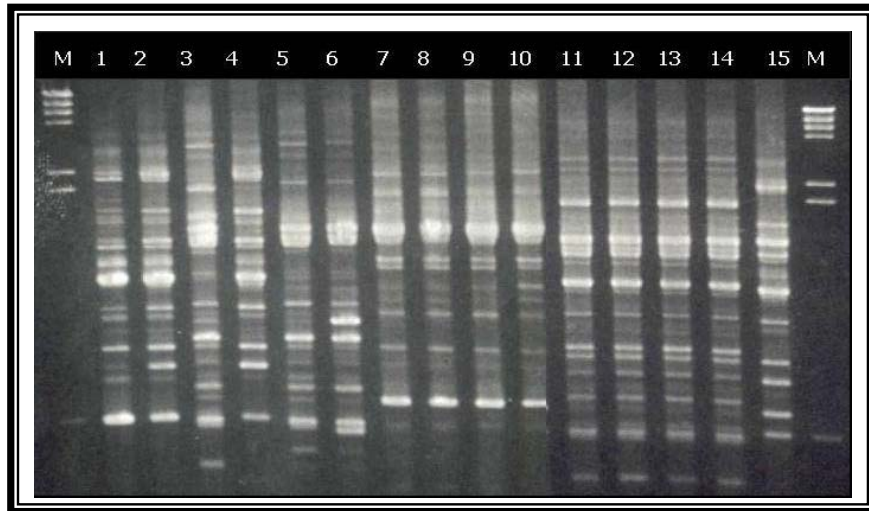


Figura 9. Perfil de RAPD de linhagens de *Metarhizium* obtido com o iniciador OPA-9. Na pista M, marcador de peso molecular do DNA fago λ clivado com *Hind*III; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.

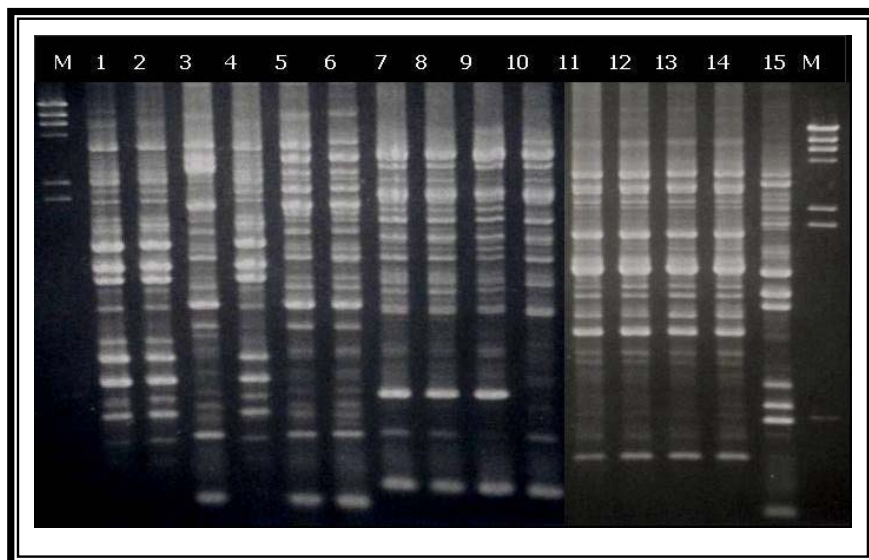


Figura 10. Perfil de RAPD de linhagens *Metarhizium* obtido com o iniciador OPA-16. Na pista M, marcador de peso molecular do DNA fago λ clivado com *Hind*III; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.

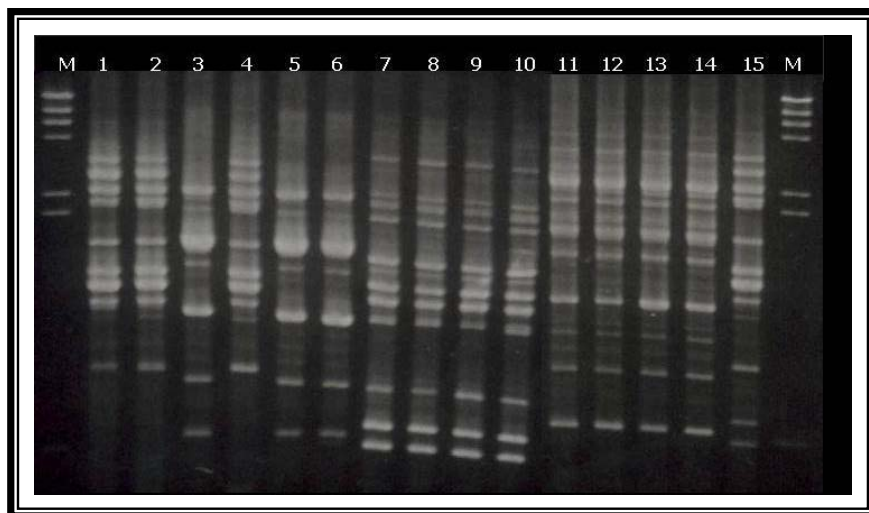


Figura 11. Perfil de RAPD de linhagens de *Metarhizium* obtido com o iniciador OPA-20. Na pista M, marcador de peso molecular do DNA fago λ clivado com *Hind*III; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.

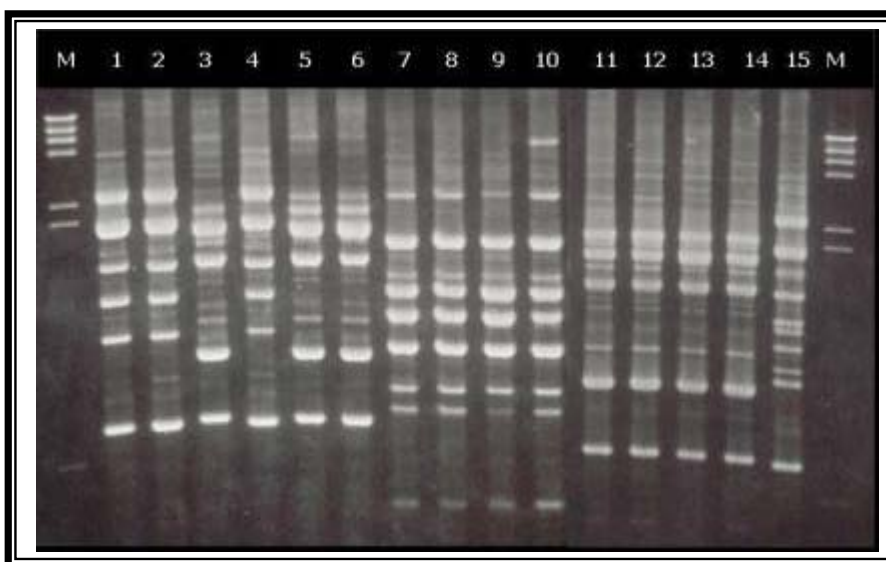


Figura 12. Perfil de RAPD de linhagens *Metarhizium* obtido com o iniciador OPX-6. Na pista M, marcador de peso molecular do DNA fago λ clivado com *Hind*III; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.

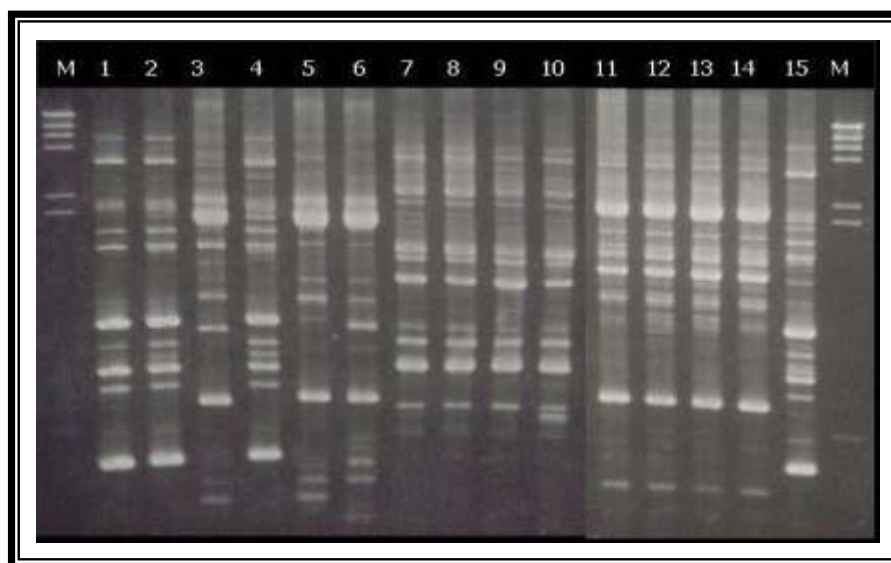


Figura 13. Perfil de RAPD de linhagens de *Metarhizium* obtido com o iniciador OPX-4. Na pista M, marcador de peso molecular do DNA fago λ clivado com *Hind*III; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.

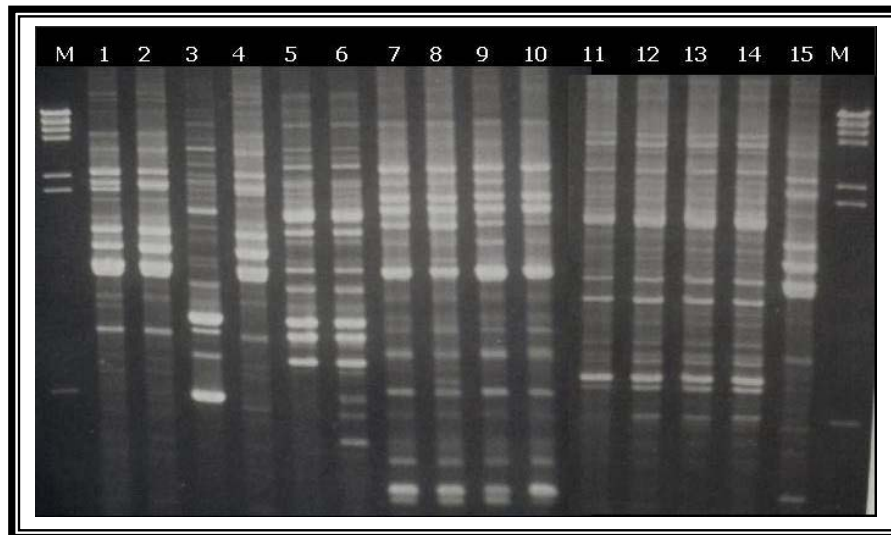


Figura 14. Perfil de RAPD de linhagens de *Metarhizium* obtido com o iniciador OPW-16. Na pista M, marcador de peso molecular do DNA fago λ clivado com *Hind*III; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.

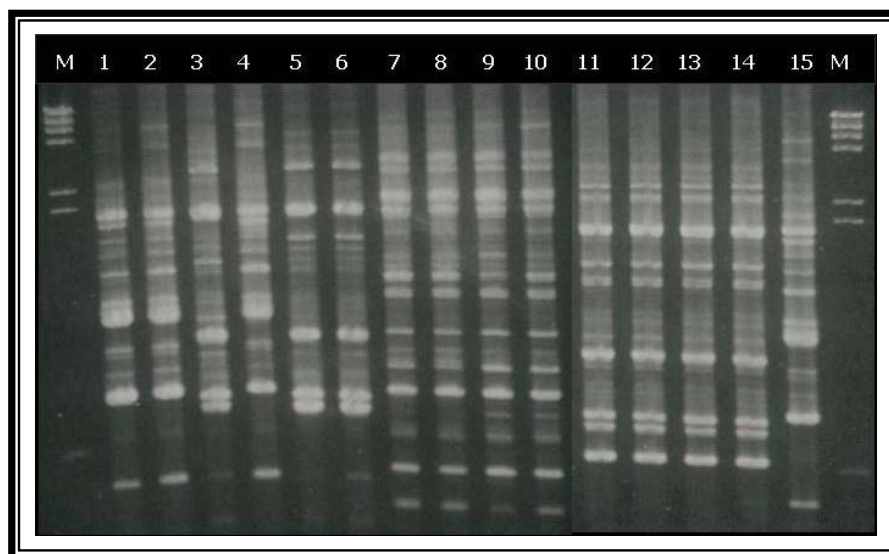


Figura 15. Perfil de RAPD de linhagens de *Metarhizium* obtido com o iniciador OPX-11. Na pista M, marcador de peso molecular do DNA fago λ clivado com *Hind*III; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.

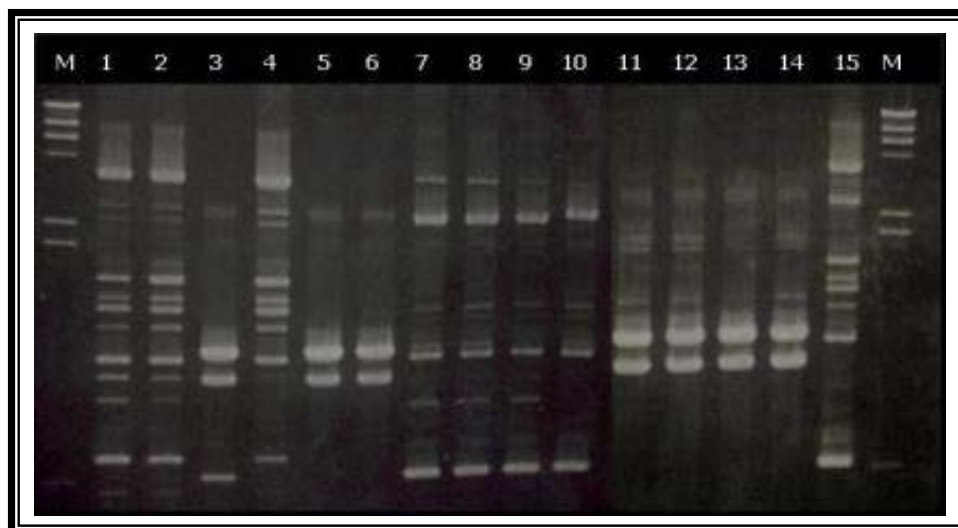


Figura 16. Perfil de RAPD de linhagens de *Metarhizium* obtido com o iniciador OPA-10. Na pista M, marcador de peso molecular do DNA fago λ clivado com *Hind*III; nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.

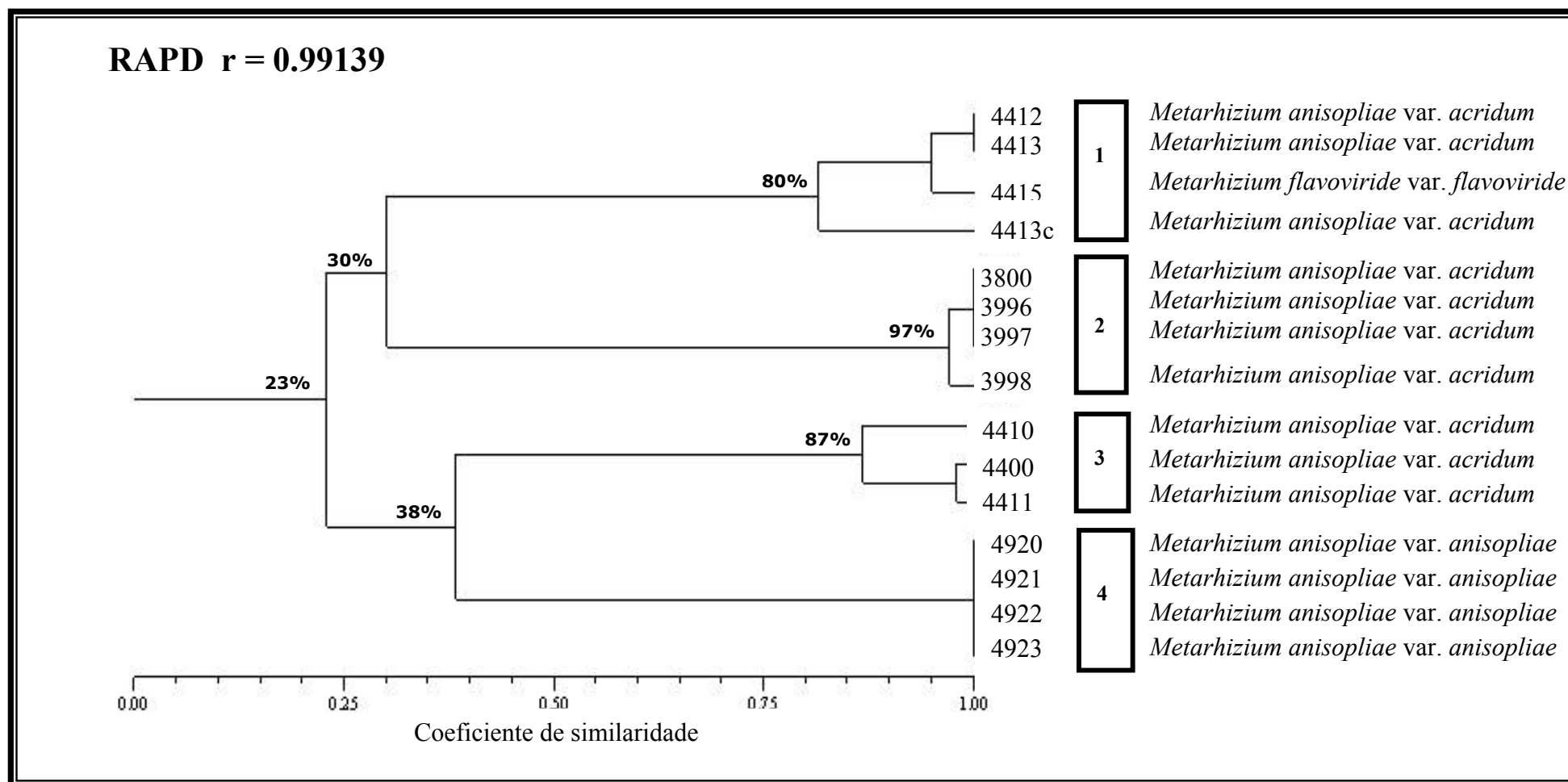


Figura 17. Dendrograma construído pelo método UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir do perfil de RAPD obtido de 15 linhagens de *Metarhizium* com os iniciadores OPA-9, OPA-16, OPA-20, OPX-4, OPX-6, OPX-11, OPW-16, OPA-10.

Neste estudo, constatou-se uma baixa diversidade intraespecífica entre as 15 linhagens de *Metarhizium*, concordando com os resultados obtidos por Bidocka et al. (1994), que avaliaram a variabilidade genética entre 24 isolados de *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *Beauveria bassiana* isoladas de diferentes espécies de hospedeiros e regiões geográficas. Observaram que *M. flavoviride* e *B. bassiana* apresentaram um baixo nível de variabilidade intraespecífica quando comparado a *M. anisopliae*. Fato semelhante foi constatado por Fungaro et al. (1996), ao utilizarem 13 isolados de *Metarhizium anisopliae*, sendo seis isolados de *Deois flavopicta* de diferentes regiões do Brasil e os demais do solo, de uma única região. Estes autores observaram também um grau moderado de similaridade (85%) e uma baixa variabilidade genética entre as linhagens isoladas de *D. flavopicta*, quando comparada com a ampla diversidade encontrada no grupo de linhagens isoladas do solo. Ressaltaram ainda, a importância desta técnica para entendimento da relação patógeno hospedeiro. No mesmo ano, Leal (1996) também confirmou esses dados, quando estudou, através da técnica RAPD, 20 linhagens de *M. anisopliae* oriundas de quatro países (Austrália, Brasil, Finlândia e Filipinas), isoladas de hospedeiros diferentes. Seus resultados confirmam os resultados obtidos neste estudo, e reforçam a indicação de que *M. anisopliae* tem um certo grau de especificidade por hospedeiro. Tigano-Milani et al. (1995) separaram linhagens de diferentes isolados brasileiros de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *majus* e *M. flavoviride* em grupos fenéticos, e verificaram que os genótipos estão mais relacionados às espécies hospedeiras do que à origem geográfica.

Ribeiro (1997) aplicou o marcador RAPD para discriminar linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* isoladas de três hospedeiros, *D. flavopicta*, *M. posticata* e *Triatoma infestans*. Observou que os isolados de *M. posticata* agruparam-se com 100% de similaridade com aqueles de *D. flavopicta*, enquanto que o isolado de *T. infestans* distanciou-se do *M. posticata* com 90% de similaridade e foi 100% similar a um isolado de *D. flavopicta*.

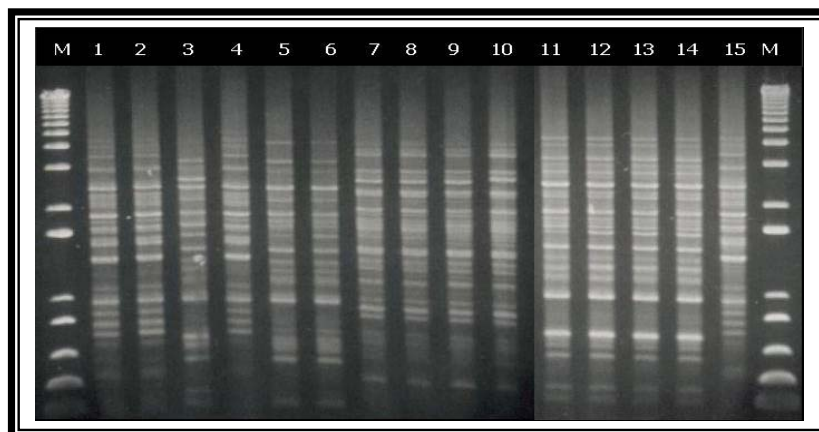
A técnica de RAPD aplicada a outros fungos entomopatogênicos também tem provido dados que indicam isolados com especificidade ao hospedeiro, Tigano & Aljanabi (2000) estudaram a variabilidade genética de linhagens de *N. rileyi*,

isoladas de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*. A análise de agrupamento dos fragmentos de RAPD mostraram que as 28 linhagens foram separadas em dois grupos fenéticos de acordo com o hospedeiro. Sugerindo a existência da adaptação de *N. rileyi* ao hospedeiro. RAPD também tem sido utilizada para avaliar relações genéticas entre diferentes espécies e até mesmo variedades de uma mesma espécie. Magalhães et al. (2003) utilizaram três iniciadores de RAPD para comparar um isolado peruano, um brasileiro e outro australiano de *M. anisopliae* var. *acridum* com um isolado brasileiro de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, observaram que os primeiros apresentaram padrões similares, porém muito distintos dos padrões de *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

4.5 MICROSSATÉLITES

4.5.1 Iniciador (GTG)₅

A Figura 18 ilustra o perfil de amplificação das regiões de SSR com o iniciador (GTG)₅ das linhagens de *Metarhizium*, enquanto a Figura 19 mostra o dendrograma, que evidenciou três grupos com cerca de 18% de fragmentos comuns entre eles, não sendo observada correlação entre os grupos e origem geográfica. O primeiro grupo é composto por quatro linhagens representadas pela 4415 de *M. flavoviride* var. *flavoviride* que agrupou-se com 100% de similaridade com uma linhagem brasileira (4413) e outra Australiana (4412) de *M. anisopliae* var. *acridum*. Estas três linhagens apresentaram uma menor correlação genética com a linhagem 4413c de *M. anisopliae* var. *acridum* com 83% de similaridade. Este grupo se aproximou do segundo com 34% de homologia, o qual está representado pelas linhagens de *M. anisopliae* var. *acridum* 4400 e 4411 com 100% de similaridade e com uma distância genética para a linhagem de *M. anisopliae* var. *acridum* 4410 com apenas 85% de similaridade. As quatro linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentando 100% de similaridade se separaram das demais linhagens desse grupo com cerca de 70% de fragmentos em comum. O terceiro grupo é formado pelas linhagens de *M. anisopliae* var. *acridum* 3998, 3800 e seus respectivos mutantes 3996 e 3997 com 100% de similaridade entre si e 18% de fragmentos comuns entre os demais grupos.



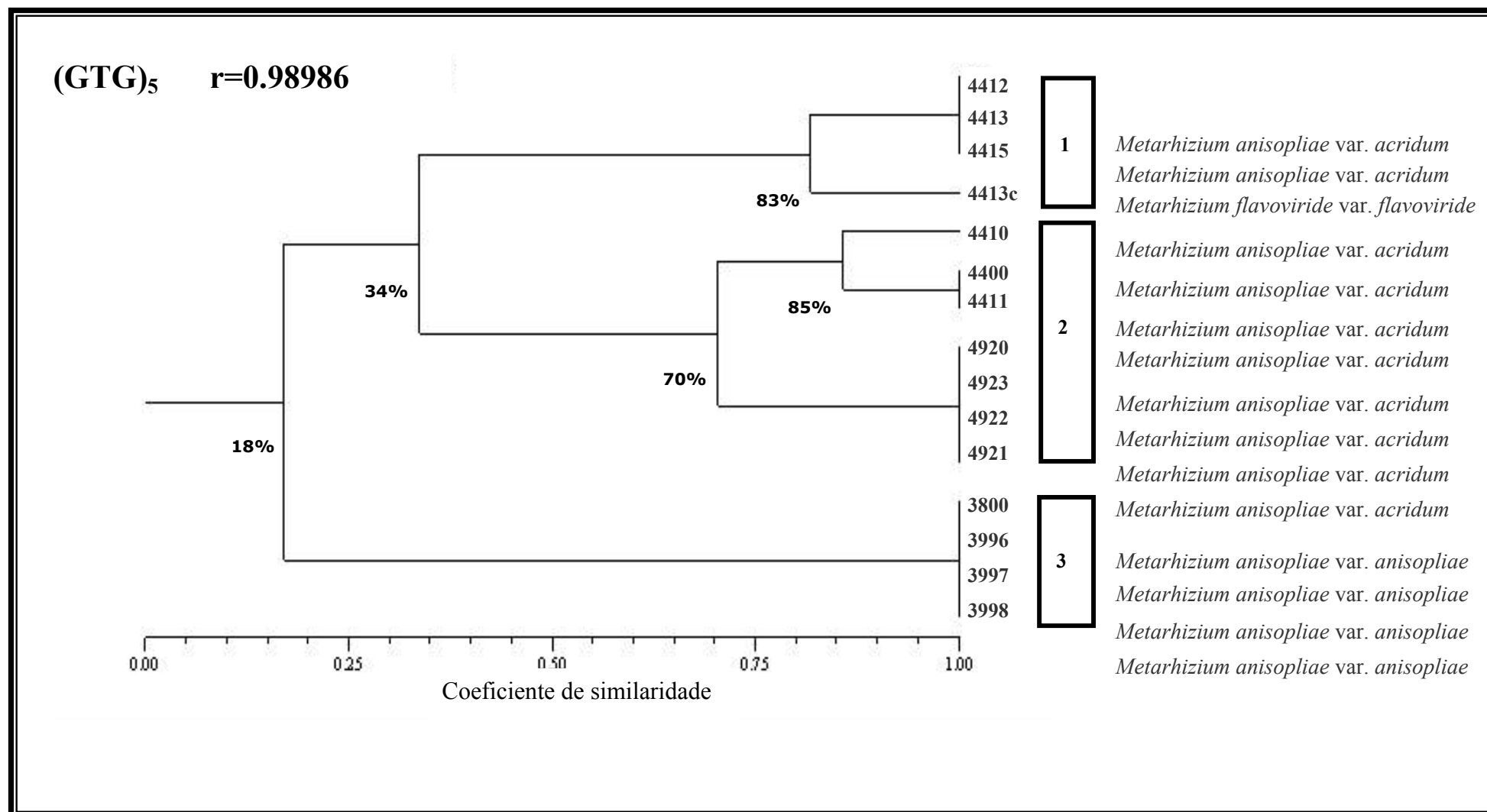


Figura 19. Dendrograma construído pelo método UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir do perfil de microsatélite obtido de 15 linhagens de *Metarhizium*.

4.5.2 Iniciador - M13

A Figura 20 mostra o perfil de amplificação das regiões de SSR com o iniciador M13 das 15 linhagens de *Metarhizium*. Na análise de agrupamento foi evidenciado um menor percentual de similaridade e conseqüentemente menor variação genética, discriminando 11 perfis, que refletem oito grupos distintos com 10% de similaridade (Figura 21). O primeiro grupo composto pela linhagem 4412 de *M. anisopliae* var. *acridum* que agrupou-se com o segundo grupo em torno de 33% de similaridade, este grupo é composto por duas linhagens de *M. anisopliae* var. *acridum* 4413 e 4413c com 100% de similaridade e a linhagem de *M. flavoviride* var. *flavoviride* 4415 originária da França com cerca de 87% de similaridade com as linhagens brasileiras do mesmo grupo. O terceiro grupo representado pela linhagem brasileira de *M. anisopliae* var. *acridum* 4410 com 43% de similaridade com o quarto grupo. O quarto grupo representado pelas linhagens brasileiras 4400 e 4411 com 66% de similaridade entre elas. O quinto grupo composto pelas três linhagens de *M. anisopliae* var. *acridum* 3800, 3998 e o mutante 3997 com 100% de similaridade entre elas. O sexto grupo composto pelo mutante 3996, que se distanciou da linhagem selvagem com 20% de similaridade.



Figura 20. Perfil de regiões microssatélites de linhagens de *Metarhizium* obtido com o iniciador M13. Na pista M, marcador de peso molecular 100 pb; Nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.

Já no sétimo grupo, as linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* 4920 e 4921 se agruparam com 100% de similaridade, mas foi possível detectar variabilidade genética nas linhagens 4922 e 4923 pertencentes ao oitavo grupo, obtendo uma relação genética em torno de 43% de similaridade com as duas linhagens anteriores. Estes dois últimos grupos se distanciaram com aproximadamente 10% de fragmentos em comum com os demais grupos.

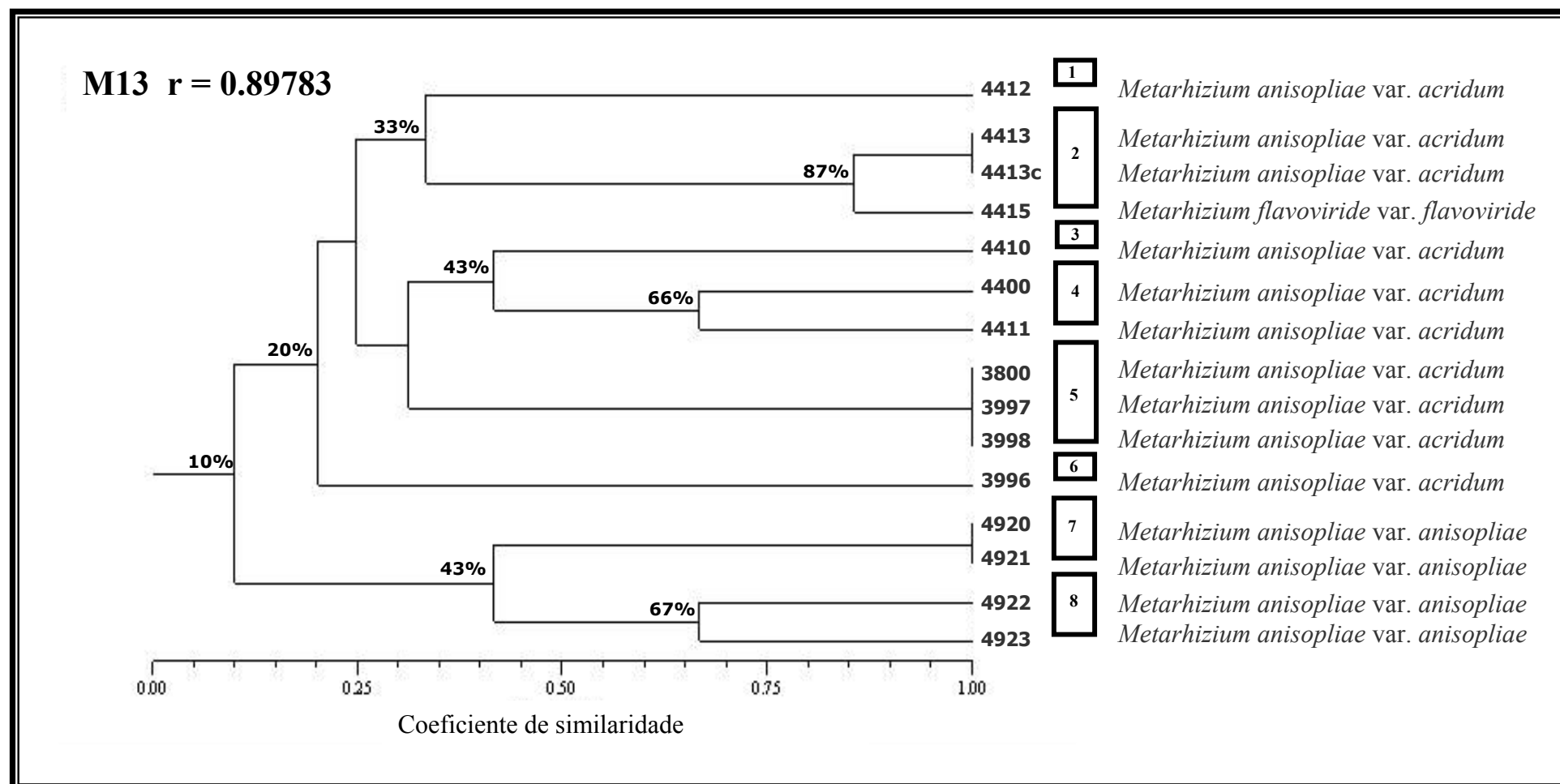


Figura 21. Dendrograma construído pelo método UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir do perfil de microssatélite obtido de 15 linhagens de *Metarhizium*.

4.5.3 Iniciador (GACA)₄

As linhagens de *Metarhizium* amplificadas pelo (GTG)₅ foram discriminadas com o iniciador (GACA)₄ pela amplificação das regiões de SSR (Figura 22). No entanto, a análise de agrupamento evidenciou uma maior variabilidade genética com o iniciador (GACA)₄ do que com a utilização do iniciador (GTG)₅. Pela análise dos dados do dendrograma, foram evidenciados seis grupos distintos em um ponto de ramificação de 12% de similaridade (Figura 23). O primeiro grupo representado pela linhagem 4412 de *M. anisopliae* var. *acridum* com cerca de 40% de fragmentos em comum com o segundo que é composto pela linhagem 3800 *M. anisopliae* var. *acridum*. O terceiro grupo é o maior deles, contendo dois sub-grupos, o primeiro formado pelas linhagens 4415 de *M. flavoviride* var. *flavoviride*, 4413, 4413c, 3996 e 3998 de *M. anisopliae* var. *acridum* com cerca de 65% de similaridade entre eles. O segundo sub-grupo apresentou uma distância genética em torno de 53% com o primeiro sub-grupo, sendo este composto pelas linhagens 4400, 4411, 3997. Já o quarto grupo representado pelas linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* 4920 e

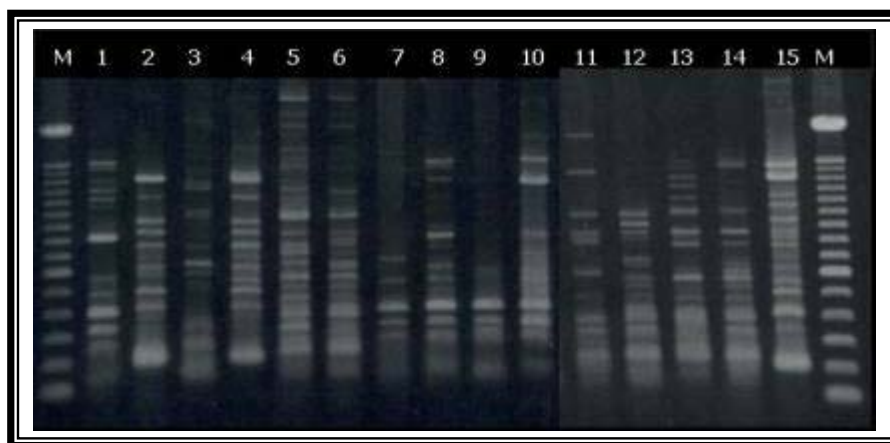


Figura 22. Perfil de regiões microssatélites de linhagens de *Metarhizium* obtido com o iniciador (GACA)₄. Na pista M, marcador de peso molecular 100 pb; Nas pistas de 1 a 15, encontram-se DNAs das linhagens (4412, 4413, 4410, 4415, 4400, 4411, 3800, 3996, 3997, 3998, 4920, 4921, 4922, 4923, 4413c), respectivamente.

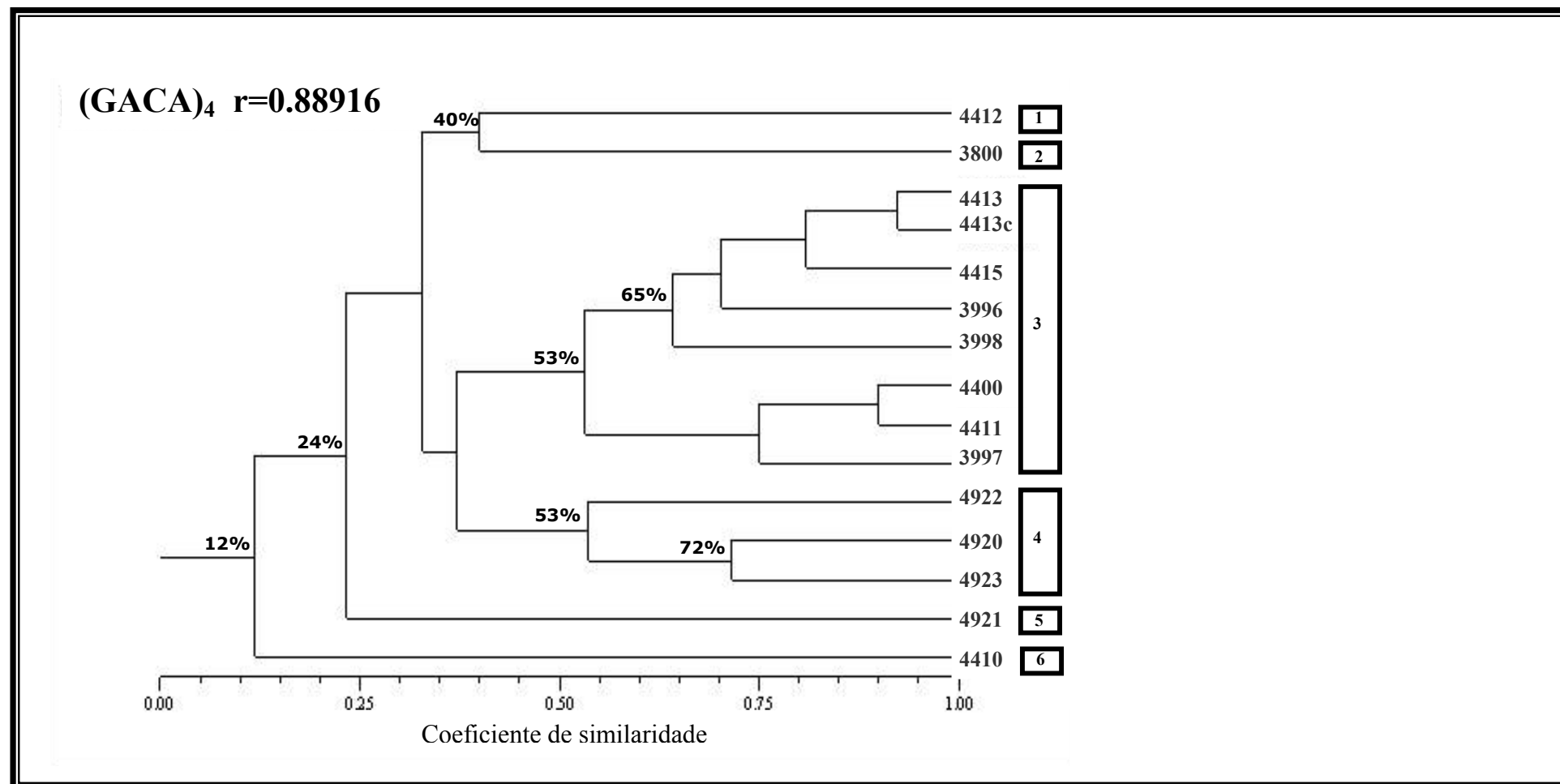


Figura 23. Dendrograma construído pelo método UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir do perfil de microsatélite obtido de 15 linhagens de *Metarhizium*.

4923 com cerca de 72% de similaridade entre elas e a linhagem 4922 com cerca de 53% de similaridade com o seu sub-grupo. O quinto grupo formado pela linhagem 4921 que apresentou uma distancia genética em torno de 24% de similaridade com os quatro grupos anteriores. No sexto grupo, a única linhagem 4410 de *M. anisopliae* var. *acridum* foi a mais distinta com cerca de 12%, mostrando uma alta dissimilaridade em relação aos demais grupos através da análise das distâncias genéticas pelo método de agrupamento UPGMA. Foi possível observar uma variação genética muito maior com o iniciador (GACA)₄, refletida na discriminação de todas as quinze linhagens, do que na análise de todas as técnicas anteriores utilizadas.

Bidochka et al. (1994) utilizaram os iniciadores (GACA)₄ e M13 em linhagens de *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *Beauveria bassiana*. Com base no padrão dos fragmentos amplificados as três espécies foram diferenciadas, (GACA)₄ produziu 34 fragmentos enquanto o M13 produziu 23. Os maiores fragmentos foram gerados pelas linhagens de *M. flavoviride*. Os isolados morfológicamente caracterizados como *M. anisopliae* apresentaram um padrão de bandas heterogêneo. Da mesma forma que no presente trabalho, não foi possível correlacionar a similaridade entre as linhagens com a origem geográfica. Pois as linhagens de *M. flavoviride* originárias do oeste da África, Galápagos e Austrália, evidenciaram um padrão de bandas similar, embora sendo originárias de três continentes. Não foi possível, também, evidenciar nenhum agrupamento de acordo com o hospedeiro. Concluíram que as linhagens *M. anisopliae* e *M. flavoviride* estão mais próximas que as de *B. bassiana*.

O iniciador M13 mostrou-se bastante eficiente em detectar variabilidade intraespecífica nas linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Foi possível diferenciar a linhagem mutante 3996 da linhagem selvagem 3998 de *M. anisopliae* var. *acridum*. Fato semelhante foi observado por Freire et al. (2001) quando utilizou iniciadores aleatórios de RAPD em uma linhagem selvagem e cinco mutantes de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, detectando 58.4% de polimorfismo entre as linhagens testadas.

Não há referência na literatura corrente sobre o uso do iniciador (GTG)₅ para analisar a diversidade genética inter- e intraespecífica em linhagens do gênero

Metarhizium. De acordo com Silva Filho (2003) o (GTG)₅ mostra eficiência para discriminar amostras de leveduras isoladas do mosto fermentado em destilarias. Han et al. (2002) utilizaram 12 iniciadores microssatélites para estudar a variabilidade do fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi*, não observaram correlação entre origem geográfica e hospedeiros.

Em geral, a amplificação de microssatélites demonstra que estes são mais variáveis que isoenzimas, RFLP, AFLP e RAPD (BECERRA & PAREDES, 2000). Visto que os iniciadores de ISSR são maiores do que os de RAPD, podendo-se utilizar uma alta temperatura de anelamento, é um marcador mais estável e reproduzível segundo Han et al. (2002), sendo útil para identificação de espécies e caracterização de linhagens fúngicas.

A análise do dendrograma de (GACA)₄ também permitiu uma melhor avaliação da divergência observada entre as linhagens de *Metarhizium* e mutantes (3996 e 3997) e selvagens (3998 e 3880) exibindo perfis diferentes entre si. Usando as técnicas RAPD e *Intron* só foi possível discriminar a linhagem selvagem 3998 dos demais mutantes. O ITS-rDNA discriminou a linhagem selvagem 3800. Com o microssatélite (GTG)₅ não foi possível discriminar os mutantes das linhagens selvagens e com o M13 apenas a linhagem mutante 3996 das demais. Pode-se observar que entre os marcadores moleculares testados neste trabalho, somente o iniciador (GACA)₄ foi eficiente em mostrar a diversidade genética encontrada nestas quatro linhagens. Este resultado sugere que, esta região do (GACA)₄ é mais variável para estas linhagens de *Metarhizium*.

A linhagem 4415 de *M. flavoviride* var. *flavoviride* através dos marcadores moleculares utilizados mostrou ter uma relação genética mais próxima com as linhagens de *M. anisopliae* var. *acridum*. Já as linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* isoladas de *M. posticata* ficaram sempre próximas pela análise com os diferentes marcadores.

4.6 Teste de Patogenicidade

De um modo geral, todas as linhagens de *Metarhizium* apresentaram infectividade sobre as larvas de *D. saccharalis*, variando no entanto quanto ao grau de agressividade (Tabela 3). A linhagem 4415 de *M. flavoviride* var. *flavoviride* proporcionou 26,6% de mortalidade das larvas com TL₅₀ de 6,13 dias, 4922 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* causou 23,3% de mortalidade com TL₅₀ de 7,32 dias e 4400 de *M. anisopliae* var. *acridum* 23,3% com TL₅₀ de 7,26 dias. Comportaram-se como as mais agressivas, embora só tenham diferido estatisticamente da linhagem 3997. As linhagens 4410, 3998, 4412 e 3997 de *M. anisopliae* var. *acridum* causaram um menor percentual de mortalidade das larvas de *D. saccharalis* não havendo diferença significativa em relação ao grupo controle. Embora estatisticamente os isolados tenham sido considerados iguais, os valores da mortalidade acumulada são significativos do ponto de vista biológico. Figueirêdo et al. (2002) obtiveram resultados semelhantes ao utilizarem a concentração 10⁸ conídios/mL de *M. anisopliae* em larvas de *Castnia licus*, não observando diferenças significativas entre linhagens de *M. anisopliae* utilizadas no estudo.

Tabela 3. Percentual de mortalidade de *Diatraea saccharalis* e tempo letal (TL₅₀) após oito dias de inoculação com *Metarhizium*.

Tratamento	Mortalidade (%)	TL ₅₀	IC
4400	23,3 a	7,26	6,69 - 7,85
4410	13,3 ab	10,28	9,54 - 11,10
4415	26,6 a	6,13	5,52 - 6,77
3998	13,3 ab	9,68	9,01 - 10,41
3997	3,3 b	10,72	9,92 - 11,62
4412	9,8 ab	10,77	9,97 - 11,68
4922	23,3 a	7,32	6,75 - 7,91
Controle	0,00 b	13,12	11,49 - 14,92

CV= 2,67%

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados para arc sen da raiz de x/100.

TL₅₀=Tempo Letal / IC = Intervalo de Confiança

A Tabela 4 apresenta a frequência percentual acumulada de larvas mortas, de acordo com a linhagem utilizada no período de 1 a 10 dias. Não sendo detectada mortalidade até o quarto dia. A frequência (acumulada) de lagartas mortas (30) ocorreu para as linhagens: 4400 *M. anisopliae* var. *acridum*, 4415 *M. flavoviride* var. *flavoviride* e 4922 de *M. anisopliae* var. *anisopliae*; a menor mortalidade ocorreu para as linhagens 3997, 3998, 4410 e 4412 *M. anisopliae* var. *acridum*. Até o sexto dia a maior frequência de mortalidade foi registrada para 4415, sendo também esta linhagem que causou 100% de mortalidade das larvas até o oitavo dia.

Tabela 4. Frequência percentual acumulada de mortes de *Diatraea saccharalis* após inoculação com *Metarhizium*.

Tempo de Avaliação (Dias)	Linhagem							Controle
	4400	4410	4415	3998	3997	4412	4922	
	%							
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	10,0	0	6,7	0	6,7	0	6,7	0
6	20,0	0	60,0	6,7	6,7	0	13,3	0
7	43,3	0	86,7	16,7	6,7	3,3	46,7	0
8	66,7	26,7	100,0	30,0	10,0	13,3	70,0	0
9	86,7	26,7	-	33,3	13,3	20,0	83,3	0
10	100,0	33,3	-	33,3	16,7	26,7	100,0	0

Os sintomas de infecção nas larvas foram observados pela redução da alimentação e movimentos mais lentos. As larvas mortas permaneceram acondicionadas nos potes plásticos, para observação da exteriorização dos conídios (conidiogênese) no corpo dos insetos colonizados. No início da conidiogênese as larvas apresentaram coloração branca passando a verde nos dias seguintes (Figura 24). Após o décimo dia de inoculação, as larvas sobreviventes passaram para o estágio de pupa. Porém, algumas tornaram-se inviáveis, não sobrevivendo, o que foi constatado posteriormente através da observação da exteriorização do fungo no seu tegumento (Figura 25).

A linhagem 4922 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* causou 23,3% de mortalidade sobre as larvas de *D. saccharalis*. Cézar Filho (2000), também causou mortalidade de 30% com *M. anisopliae* var. *anisopliae* na concentração 10^8 conídios/mL sobre larvas de *Alabama argillacea*. Silva et al. (2003) aplicaram a concentração de 10^8 conídios/mL de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em larvas da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* e constataram que o inseto é mais susceptível ao *M. anisopliae* que a *Beauveria*. As linhagens de *M. anisopliae* var. *acridum*, em sua maioria promoveram um percentual de mortalidade homogêneo, embora não tenha



Figura 24. Larva de *Diatraea saccharalis* colonizada pela linhagem 4415 de *Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride*.

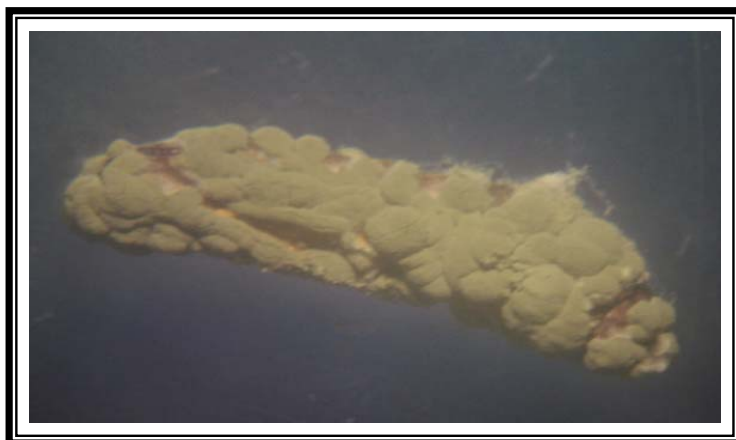


Figura 25. Pupa de *Diatraea saccharalis* colonizada pela linhagem 4400 de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.

diferido estatisticamente daquele de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, com exceção da linhagem mutante 3997 com um percentual de 3,28%. Figueirêdo et al. (2002) utilizaram a linhagem CG 423 de *M. anisopliae* var. *acridum* para o controle de *C. licus* obtendo 56,6% de mortalidade com TL_{50} de 11,80 dias. Resultado que assemelha-se ao obtido nesta pesquisa que obteve um TL_{50} de 10,28, 10,72 e 10,77 para as linhagens 4410, 3997 e 4412 de *M. anisopliae* var. *acridum*, respectivamente.

Lecuona et al. (1996) obtiveram resultados significativos com a utilização de *B. bassiana* para o controle de *D. saccharalis* ao observarem que a mortalidade das lagartas variou de 50 a 90%, com valores de TL_{50} compreendidos entre 2,1 e 8,4 dias.

Não houve relação entre os agrupamentos nos dendrogramas, para os diferentes marcadores moleculares utilizados, com a agressividade das linhagens testadas.

5. CONCLUSÕES

- * Os marcadores moleculares *Intron splice site primer*, SSR e RAPD confirmaram a diversidade genética reconhecida para *Metarhizium*, e ressaltaram a menor variação genética entre as linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* em comparação com as linhagens de *M. anisopliae* var. *acridum*.
- * Não foi observada a existência de relação entre as linhagens de cada grupo, com hospedeiro ou origem geográfica.
- * A análise de RFLP dos amplicons do *locus* ITS com as enzimas *Msp* I e *Hae* III mostrou padrão idêntico para *M. anisopliae* var. *acridum* (4413) e *M. flavoviride* var. *flavoviride* (4415).
- * O marcador M13 foi mais sensível que o (GTG)₅ em demonstrar a diversidade genética das linhagens de *M. anisopliae* var. *acridum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. flavoviride* var. *flavoviride*.
- * SSR (GACA)₄ foi mais eficiente em demonstrar a diversidade genética das linhagens de *M. anisopliae* var. *acridum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. flavoviride* var. *flavoviride*.
- * As linhagens *M. flavoviride* var. *flavoviride* (4415), *M. anisopliae* var. *anisopliae* (4922) e *M. anisopliae* var. *acridum* (4400) foram mais agressivas sobre as larvas de *D. saccharalis*, embora não tenha sido numericamente significativo.
- * *M. flavoviride* var. *flavoviride* foi patogênico a *Diatraea saccharalis*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C.; MATSUOKA, K. Análise genética de padrões isoenzimáticos de isolados de *Phytophthora infestans*. **Fitopatologia Brasileira**. v.12, p.155-158.1987.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S. B.(Coord), **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.289-381, 1998.

ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Coord.). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 765-777. 1998

ARRIGONI, H. B. Moscas e pequenas vespas fazem o controle da broca da cana-de-açúcar. São Paulo, Manual de Controle Biológico Copersucar, 1992. 21p.

ARCAS, J. A.; DÍAZ, B. M.; LECUONA, R. E. Bioinsecticidal activity of conidia and dry mycelium preparations of two isolates of *Beauveria bassiana* against the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. **Journal of Biotechnology**. v.67, p.151-158. 1999.

ARTHURS, S.; THOMAS, M. B. Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.78, p.59-63, 2001.

ATHAYDE, A. C. R.; FERREIRA, U. L.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. Fungos Entomopatogênicos. **Biotechnologia. Ciência & Desenvolvimento**. v.21, p.12-15, 2001.

ATHAYDE, A. C. R. **Patogenicidade de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviride* sobre ovos, larvas e adultos de *Boophilus***

microplus da região semi-árida paraibana. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), UFPE, Recife, 138p, 2002.

AZEVEDO, J. L. O uso dos fungos na biotecnologia. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria.** Guaíba: Livraria e Editora Universitária, p. 297-317, 2001.

AZEVEDO, J. L. **Genética de Microrganismos.** Goiana. Editora URG, 1998, 478p.

AZEVEDO, J. L.; MESSIAS, C. L. Aspectos genéticos do controle biológico de insetos por fungos. In: AZEVEDO, J. L.(Coord.) **Genética de Microrganismos em Biotecnologia e Engenharia Genética.** Piracicaba: FEALQ, p.111-114, 1985.

BARBIERE, R. L.; CARVALHO, F. I. F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrociência.** v.2, p.79-83, 2001.

BARNES, I.; GAUR, A.; BURGESS, T.; ROUX, J.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Microsatellite markers reflect intra-specific relationships between isolates of the vascular wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. **Molecular Plant Pathology.** v.2, p.319-325, 2001.

BARROS LOPES, M.; SODEN, A.; HENSCHKE, P. A.; LANGRIDGE, P. PCR differentiation of commercial yeast using intron splice site primers. **Applied and Environmental Microbiology.** v.62, p.4514-4520, 1996.

BECERRA, V.; PAREDES, M. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. **Agricultura Técnica.** v. 60, p.270-281, 2000.

BIDOCHKA, M. J.; McDONALD, M. A.; St-LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetics.** v.25, p.107-113, 1994.

BITTENCOURT, S. E. T.; CASTRO, L. A.; FARIAS, S. E.; BAO, S. N.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Purification and ultrastructural localization of a copper-zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) from the entomopathogenic and acaricide fungus *Metarhizium anisopliae*. **Research in Microbiology**. v.155, p.681-687, 2004.

BOTELHO, P. S. M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J. R.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores**. São Paulo: Manole, p.409-447, 2002.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.78, p.98-108, 2001.

BRASILEIRO, B. R. T. V. **Variabilidade genética em isolados de *Fusarium solani* detectada com a utilização de marcadores moleculares**. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos), UFPE, Recife, 91p, 2003.

BRASILEIRO, B. T. R. V.; COIMBRA, M. R. M.; MORAIS JR., M. A.; OLIVEIRA, N. T. Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-fingerprinting based on PCR markers. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.35, p.205-210, 2004.

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

CECH, T. R. Self-splicing of group I-introns. **Annual Review of Biochemistry**. v.59, p.543-568, 1990.

CÉZAR FILHO, E. **Patogenicidade de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Para lagartas de *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera, Noctuidae) e o efeito de inseticidas sobre esses entomopatógenos.** Dissertação (Mestrado em Entomologia-Fitossanidade), UFRPE, Recife, 52p, 2000.

COATES, B. S.; HELLMICH, R. L.; LEWIS, L. C. *Beauveria bassiana* haplotype determination based on nuclear rDNA internal transcribed spacer PCR-RFLP. **Mycological Research.** v.106, p.40-50, 2002.

CURRAN, J.; DRIVER, F.; BALLARD, J. W. O.; MILNER, R. J. Phylogeny of *Metarhizium*: Analysis of ribosomal DNA sequence data. **Mycological Research.** v.98, p.547-552, 1994.

DALZOTO, P. R.; GLIENKE-BLANCO, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. RAPD analyses of recombination processes in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Mycological Research.** v.1007, p.1069-1074, 2003.

DESTÉFANO, R. H. R. **Deteção e identificação de *Metarhizium anisopliae* em larvas de *Diatraea saccharalis* por primers específicos.** Tese (Doutorado em Agronomia-Microbiologia Agrícola), ESALQ -USP, Piracicaba, 72p, 2003.

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

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

FALCO, M. C.; SILVA-FILHO, M. C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.41, p.761-766, 2003.

FARAH, S. B. **DNA Segredos & Mistérios**. São Paulo, Sarvier. 2000, 976p.

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil: situação atual e perspectivas. **Biotechnology, Ciência & Desenvolvimento**. v.22, p.18-21, 2001.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Classes de marcadores moleculares para análise genética. In: FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. EMBRAPA, Cenargen, 1998. p.13-68.

FERREIRA, U. L. **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 (Doutorado em Biologia de Fungos), UFPE, Recife, 112p, 2004.

FERRON, P. Pest control by the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium*. In: BURGUES, H. D. **Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980**. Academic Press, 1981. p.465-482.

FIGUEIRÊDO, M. F. S. **Potencial de isolados de *Beauveria bassiana* (bals.) vuill. e *Metarhizium anisopliae* (metsch.) Sorok. para o controle da broca gigante da cana-de-açúcar *Castnia licus* (Drury, 1770) (Lepidoptera: Castniidae)**. (Mestrado em Fitossanidade), UFRPE, Recife, 68p, 2001.

FIGUEIRÊDO, M. F. S.; MARQUES, E. J.; LIMA, R. O. R.; OLIVEIRA, J. V. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae*

(Metsch) Sorokin contra a broca gigante da cana-de-açúcar *Castnia licus* (Drury) (Lepidoptera: Castniidae). **Neotropical Entomology**. v.31, p.397-403, 2002.

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

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

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

FUNGARO, M. H. P. **Uso do RAPD na taxonomia**. Anais IX Encontro de geneticistas do Rio Grande do Sul, Caxias do Sul. 78p. 1994.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. **Letters in Applied Microbiology**. v.22, p.389-392, 1996.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Aplicação da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I. S. ; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. EMBRAPA-CNPA, 1998, p.205-207.

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v.14, p.12-16, 2000.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCHHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D. **Manual de Entomologia Agrícola**. São Paulo: Ed. Ceres, 1988. 649p.

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

GOETTEL, M. S.; JOHNSON, D. L.; INGLIS, G. D. The role of fungi in the control of grasshoppers. **Canadian Journal of Botany**. v.73, p.571-575, 1995.

GUERRA, J. B.; ARAÚJO, R. A. C.; PATARO, C.; FRANCO, G. R.; MOREIRA, E. S. A.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; ROSA, C. A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24h fermentative cycle for the production of the artesanal Brazilian cachaça. **Letters in Applied Microbiology**. v.33, p.106-111, 2001.

GUPTA, S.; KRASNOFF, S. B.; RENWICK, J. A. A.; ROBERTS, D. W. Viridoxins A and B: novel toxins from the fungus *Metarhizium flavoviride*. **Journal Organic Chemistry**. v.58, p.1062-1067. 1993.

GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**. v.89, p.998-1006, 1994.

HAJEK, A. E.; JENSEN, A. B.; THOMSEN, L.; HODGE, K. T.; EILENBERG, J. PCR-RFLP is used to investigate relations among species in the entomopathogenic genera *Eryniopsis* and *Entomophaga*. **Mycologia**. v.95, p.262-268, 2003.

HAN, Q.; INGLIS, G. D.; HAUSNER, G. Phylogenetic Relationships among strains of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea riley*, as revealed by partial β -tubulin

sequences and inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. **Letters in Applied Microbiology**. v.34, p.376-383. 2002.

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

HSIANG, T.; WU, C. Genetic and relationship of pathogenic *Typhula* species assessed by RAPD, ITS-RFLP and its sequencing. **Mycological Research**. v.104, p.16-22, 2000.

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

INGLIS, P. W.; MAGALHÃES, B. P.; VALADARES-INGLIS, M. C. Genetic variability in *Metarhizium flavoviride* revealed by telomeric fingerprinting. **FEMS Microbiology Letters**. v.179, p.49-52, 1999.

KASSA, A. ZIMMERMANN, G.; STEPHANM, D.; VIDAL, S. Susceptibility of *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) to entomopathogenic fungi from Ethiopia. **Biocontrol Science and Technology**. v.12, p.727-736, 2002.

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

KISS, L. Genetic diversity in *Ampelomyces* isolates, hyperparasites of powdery mildew, inferred from RFLP analysis of the rDNA ITS region. **Micological Research**, v.101, p.1073-1080, 1997.

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

KUKLINSK-SOBRAL, J., LUNA-ALVES LIMA, E. A.; ARAÚJO, J. M.; AZEVEDO, J. L. Genetic variability in regenerated *Metarhizium flavoviride* protoplasts. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.47, p.1-6, 2004.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. **Micologia Médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo. Sarvier, 1991, 695p.

LEAL, S.C.M. **Detection and characterization of *Metarhizium anisopliae* using molecular markers**. PhD – University of Nottingham, 215p., 1996.

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

LEAL-BERTIOLI, S. C. M. O enfoque molecular na sistemática de fungos. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M. C.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas. RAPP**.v.6, p.197-230, 1998.

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

LECUONA, R. E.; TIGANO, M. S.; DIAZ, B. M. Characterization and pathogenicity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) in Argentina. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v.25, p.299-307, 1996.

LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BÖRNER, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. **Journal of Basic Microbiology**. v.33, p.413-426, 1993.

LIMA, R. O. R.; MARQUES, E. J. Controle biológico das pragas da cana-de-açúcar no Nordeste. Piracicaba. IAA/Planalsucar. 1985. 8p.

LIMA, G. S. A.; ASSUNÇÃO, I. P. Biologia molecular como ferramenta na detecção de fitopatógenos. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável**. Recife:UFRPE, p. 291-309, 2001.

LUNA-ALVES LIMA, E. A. Características citológicas e genética de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Tese (Doutorado em Biologia: modalidade genética), UFRJ, 260p, 1985.

MAGALHÃES, B. P.; TIGANO, M. S.; MARTINS, I.; FRAZÃO, H.; RAMIREZ, H. G. Characterization of a Peruvian isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, a pathogen of grasshoppers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.38, p.1469-1475, 2003.

MANIANIA, N. K.; OKELLO, R. O.; OLERUCH, R. O.; ODERO, T. A. Potential of entomopathogenic Hyphomycetes (Deuteromycotina) fungi for the control of the stem borer *Chillo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of African Zoology**. v.108, p.529-536, 1994.

MANULIS, S.; KOGAN, N.; REUVEN, M.; BEM-YEPHET, Y. Use of RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* from carnation. **Phytopathology**. v.84, p.98-101, 1994.

MARQUES, E. J.; LIMA, R. O. R.; MARQUES, I. M. R. Atualização na produção de agentes de controle-biológico de pragas da cana-de-açúcar. In: MICHEREFF, S.

J.; BARROS, R. **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável**. Recife, UFRPE, p.351-367, 2001.

MARQUES, E. K.; IKUTA, N.; LUNGE, V. R.; FONSECA, A. S. K. Diagnóstico molecular e biotecnologia. In: SERAFINI, A. M.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria**. Caxias do Sul, EDUCS, p.101-130, 2002.

MARTINS, K. M.; FURNALETO, M. C.; SOSA-GOMEZ, D. R.; FARIA, M. R.; FUNGARO, M. H. P. Double-stranded RNA in the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride*. **Current Genetics**. v.36, p. 94-97. 1999.

MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. V.; BARRIO, E.; GARCÍA, M. D.; QUEROL, A. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry based on the internal transcribed spacers of the ribosomal region. **FEMS Microbiology Letters**. v.189, p.97-101, 2000.

MAVRIDOU, A.; CANNONE, J.; TYPAS, M.A. Identification of group-I introns at three different positions within the 28S rDNA gene of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Fungal Genetics and Biology**. v.31, p. 78-90, 2000.

MEYER, W.; MITCHELL, T. G. Polimerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. **Electrophoresis**. v.16, p.1648-1656, 1995.

MESSIAS, C. L.; AZEVEDO, J. L. Parasexuality in the Deuteromycete *metarhizium anisopliae*. **Transactions of the British Mycological Society**. v.75, p.473-477, 1980.

NEUVÈGLISE, C.; BRYGOO, Y.; VERCAMBRE, B.; RIBA, G. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. **Mycological Research**. v.98, p.322-328, 1994.

NOVARETTI, W. R. T.; PEREIRA, I. J.; SANTOS, A. F.; SILVA, L. A. Controle químico da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, por meio da aplicação aérea do inseticida Fipronil 800 WG. **STAB**. v.18, p.41-44, 1999.

OLIVEIRA, M. G.; OLIVEIRA, N. T.; LUNA- ALVES LIMA, E. A.. Novos biotipos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch) Sorokin com germinação alterada de conídios, obtidos pela exposição à radiação gama. **Arquivo de Biologia e Tecnologia**. v.40, p.586-595, 1997.

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

ONOFRE, S. B.; MINIUK, C. M.; de BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Growth and sporulation of *Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride* on culture media and lighting regimes. **Scientia Agricola**. v.58, p. 613-616, 2001.

PACOLA-MEIRELLES, L. D.; AZEVEDO, J. L. Parasexuality in *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.57, p.172-176, 1991.

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

PATARO, C.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Yeast communities and genetic

polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brasil. **Journal of Applied Microbiology**. v.89, p.24-31, 2000.

PAUL, B. ITS region of the rDNA of *Pythium longandrum*, a new species; its taxonomy and its comparison with related species. **FEMS Microbiology Letters**. v. 202, p.239-242. 2001.

PEREIRA, R. M.; ALVES, S. B.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; MACEDO, N. Utilização de entomopatógenos no manejo integrado de pragas. In: Alves, S. B.(Coord), **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 1097-1118, 1998.

PETCH, T. Notes on entomopatogenous fungi. **Transaction of the British Mycological Society**. v.16, p.55-75, 1931.

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

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

PIRES, A. P. D. **Diversidade genética e caracterização molecular de linhagens de *Beauveria bassiana***. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos), UFPE, Recife, 66p, 2002.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**. v.1, p.17-20, 1985.

RAKOTONIRAINY, M. S.; CARIOU, M. L.; BRYGOO, Y.; RIBA, G. Phylogenetic relationships within the genus *Metarhizium* based on 28S rRNA sequences and isozyme comparison. **Mycological Research**. v.98, p. 225-230. 1994.

RESENDE, L. V.; SILVA, M. M. Biotecnologia e proteção de plantas. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável**. Recife, UFRPE, p. 243-271, 2001.

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

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

ROHLF, F. J. NTSYS- PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. **Applied biostatistics, Inc.** New york, Exeter Publishing, 1988, 218p.

ROMBACH, M. C.; HUMBER, R. A.; EVANS, H. C. *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leaf- and planthoppers of rice. **Transactions of the British Mycological Society**. v.88, p.456-459, 1987.

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

RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; MACHADO, M. F. P. S.; CONTE, H. Esterase-3 polymorphism in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). **Genetics and Molecular Biology**. p.61-64, 2002.

SAIKI, R. K.; SCARF, S.; FALOONA, F. A.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**. v.230, p. 1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor: New York, 1989.

SANTOS, A. M. P. V. **Análise enzimática, da região ITS ("Internal Transcribed Spacer") do DNA ribossomal e da patogenicidade em isolados de *Bipolares sorokiniana***. Tese (Doutorado em Fitotecnia), UFRGS, Porto Alegre, 121p, 2001.

SILVA, J. A. A. ; CAMPOS, A. L.; VEIGA, A. F. S. L.; CARRANO-MOREIRA, A. F.; MARQUES, E. J. Estimativa da suficiência amostral para avaliar intensidade de infestação da *Diatraea* spp. em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.32, p.10-14, 1997.

SERAFINI, L. A. de BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia: princípios e aplicações. In: SERAFINI, L. A. de BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na Agricultura e Agroindústria**. Guaíba: Agropecuária. p.25-74, 2001.

SILVA FILHO, E. A. **Caracterização genética de populações de leveduras de destilarias de álcool combustível para otimização do processo de fermentação**. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos), UFPE, Recife, 107p, 2003.

SILVA PINTO, F. G.; FUNGARO, M. H. P.; FERREIRA, J. M.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FURNALETO, M. C. Genetic variation in the cuticle-degrading protease activity of the entomopathogen *Metarhizium flavoviride*. **Genetics and Molecular Biology**. v.25, p.231-234, 2002.

SILVA, V. C. A.; BARROS, R.; MARQUES, E. J.; TORRES, J. B. Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Neotropical Entomology**. v.32, p.653-658, 2003.

SILVEIRA, E. B.; AL-JANABI, S. M.; MAGALHÃES, B. P.; CARVALHO, L. J. C. B.; TIGANO, M. S. Polymorphism of the grasshopper *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) and its natural pathogen *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal (Hyphomycetes), revealed by RAPD analysis. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v.27, p.91-99, 1998.

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

ST. LEGER, R. J.; LOKESH-JOSHI, M. J.; BIDOCHKA, N. W. R.; 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, 1996.

SUGA, H., HASEGAWA, T., MITSUI, H., KAGEYAMA, K.; HYAKUMACHI, M. Phylogenetic analysis of the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* based on the rDNA-ITS region. **Mycological Research**. v.104, p.1175-1183, 2000.

TIGANO, M. S.; ALJANABI, S. M. RAPD analysis of *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.75, p.240-242, 2000.

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

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

VILLAS 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.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**. v.18, p.7213-7218, 1990.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. **Nucleic Acids Research**. v.19, p.5275-5279, 1991.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H. SNINSKY, J. J. & WHITE, T. J. **PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications**. New York, Academic Press. p. 315-322. 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**. v.18. p.6531-6535, 1990.

XAVIER-SANTOS, S.; MAGALHÃES, B.P.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. Differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* (Hyphomycetes). **Revista de Microbiologia**. v.30, p.47-51, 1999a.

XAVIER-SANTOS, S.; MAGALHÃES, B. P.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. Infectivity of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozspal (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the grasshopper *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera:

Acridade) in the laboratory. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v.28, p.359-363, 1999b.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. New Jersey. Prentice Hall, 1999, 929p.