



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

MARIELE PORTO CARNEIRO LEÃO

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ENVOLVIDOS NA VIRULÊNCIA
DURANTE A GERMINAÇÃO, CONIDIOGENESE E PATOGÊNESE EM
Metarhizium anisopliae var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum***

**RECIFE
Outubro/2011**



MARIELE PORTO CARNEIRO LEÃO

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ENVOLVIDOS NA VIRULÊNCIA
DURANTE A GERMINAÇÃO, CONIDIOGENESE E PATOGENESE EM
Metarhizium anisopliae var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum***

MARIELE PORTO CARNEIRO LEÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte do requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Fungos de interesse agrônômico

Orientadora: Neiva Tinti de Oliveira

Co-orientador: Welington Luiz de Araújo

RECIFE
Outubro/2011

Carneiro Leão, Mariele Porto

Expressão diferencial de genes envolvidos na virulência durante a germinação, conidiogenese e patogênese em *Metarhizium anisoplae* var. *anisoplae* e *Metarhizium anisoplae* var. *acridum* / Mariele Porto Carneiro Leão. – Recife: O Autor, 2011.

93 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Neiva Tinti de Oliveira

Co-orientador: Welington Luiz de Araújo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biologia de Fungos, 2011.

Inclui bibliografia e apêndices

- 1. Fungos entomopatogênicos 2. Genes 3. *Metarhizium anisoplae***
I. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-211

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ENVOLVIDOS NA VIRULÊNCIA
DURANTE A GERMINAÇÃO, CONIDIOGENESE E PATOGENICIDADE DE
Metarhizium anisopliae var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

MARIELE PORTO CARNEIRO LEÃO

Data da defesa: 16/02/2011

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dra. Neiva Tinti de Oliveira (Orientadora)
(Departamento de Micologia/UFPE)

Dra. Elza Aúrea de Luna Alves Lima
(Departamento de Micologia/UFPE)

Dra. Elaine Malosso
(Departamento de Micologia/UFPE)

Dr. Bartolomeu Acioli dos Santos
(Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ)

Dr. Fernando Dini Andreote
(Departamento de Ciências do Solo/ESALQ)

SUPLENTE:

Dr. João Dácio de Azevedo
(Departamento de Genética/ESALQ)

Dra. Janete Magalhães de Araújo
(Departamento de Antibióticos/UFPE)

“Embora os mestres e os livros sejam auxiliares necessários é do esforço próprio, que se consegue os mais completos e brilhantes resultados”.

Garfield

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua infinita graça e seu imenso amor por mim;

Aos meus pais, Nelson Carneiro Leão Neto e Suely Carmo Porto Carneiro Leão, pelo amor, apoio, incentivo, confiança e pela ajuda na escolha do caminho certo;

Aos meus irmãos, Nilton Porto Carneiro Leão e Nelson Carneiro Leão, pelo carinho, união e o contínuo estímulo em todos os momentos;

Ao Sérgio Henrique Freire de Moura, pelo carinho, apoio, paciência, amor e estímulo nas horas de desânimo frente às dificuldades;

À minha orientadora, Dr^a Neiva Tinti de Oliveira, pela confiança e paciência;

Ao meu co-orientador, Dr. Welington Luíz de Araújo por ter me recebido no Laboratório de Genética de Microrganismo da ESALQ, pelas conversas esclarecedoras e sugestões durante o decorrer do trabalho e pelo suporte emocional que me ofereceu durante a minha estada em Piracicaba/SP;

Aos meus colegas dos Laboratórios de Fitopatologia e de Biologia Molecular: Patrícia Vieira, Tiago, Suzane Chang, Alide, Rodrigo de Holanda, Fabíola pela ajuda nos experimentos;

À Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kliner e ao Dr. João Lúcio de Azevedo por terem me recebido com muito carinho no Laboratório de Genética de Microrganismo/ESALQ;

Aos meus colegas do Laboratório de Genética de Microrganismo/ESALQ: Armando Cavalcanti, Fernando Andreote, Manuella Dourado, Laura Assumpção, Carlos Vildoso, Francisco Andreote, Danice Luvizotto, Renata de Assis, Andréa Bogas, Léia Fávaro, Priscilla Rosseto, Maria Carolina, Marise Silva, Fernanda Sebastianes, Fernanda Bernardes, Maria Beatriz, Ana Paula, Anderson Ferreira, Paulo Lacava e José Antônio pela ajuda e convivência harmoniosa.

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

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

RESUMO GERAL

Metarhizium anisopliae é um patógeno de insetos economicamente importante usado em todo o mundo no controle biológico de insetos-praga. Porém, sua utilização é limitada devido ao tempo de mortalidade ser relativamente alto quando comparado aos inseticidas químicos. A análise das expressões de genes envolvidos na virulência é um passo importante na identificação de métodos para aumentar a sua eficácia. Neste trabalho foi investigado pela técnica de RT-qPCR o nível de expressão relativa do gene *cag8* (regulador da sinalização da proteína G) e do *nrr1* (regulador da resposta ao nitrogênio) durante a germinação, conidiogênese e em diferentes fases de patogênese de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e de *M. anisopliae* var. *acridum*. A expressão relativa do gene *pr1A* (codificador da protease subtilisina) foi analisado em *M. anisopliae* var. *anisopliae* e em *M. anisopliae* var. *acridum* durante o crescimento em diferentes meios de cultura e durante a patogênese. Em ambas as variedades, o gene *cag8* foi reprimido durante a germinação e induzido durante a conidiogênese e patogênese, o gene *nrr1* apresentou-se constitutivamente expresso durante a germinação, conidiogênese e patogênese e o gene *pr1A* foi induzido nos diferentes meios de cultura e induzido e reprimido durante as fases de patogênese. Considerando as diferenças entre as duas variedades, *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou maior expressão em todos os genes analisados durante a patogênese, isso pode justificar o fato dessa linhagem ter apresentado maior potencial para o controle de *Diatraea saccharalis* no teste de patogenicidade demonstrando que *M. anisopliae* pode apresentar variações na ativação de genes ligados à virulência para determinados ambientes e hospedeiros.

Palavras-chave: Controle biológico; fungo entomopatogênico; genes de patogenicidade; RT-qPCR

ABSTRACT

Metarhizium anisopliae is an economically important pathogenic fungi used worldwide for biological control of many insect pests. However, its effectiveness is limited due to of the relatively slow rate of kill when compared to chemical pesticides. The analysis of the expression of genes involved in virulence is an important step in identifying methods to increase their effectiveness. In this work were investigated by quantitative RT-PCR assay, the relative expression levels of *cag8* (regulator of G protein signaling) and the *nrr1* (nitrogen response regulator) during germination and conidiogenesis and different stages of pathogenicity in *M. anisopliae* var. *anisopliae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. The relative expression levels of *pr1A* gene (encodes subtilisin-like protease) was analyzed in both *M. anisopliae* var. *anisopliae* and *M. anisopliae anisopliae* var. *acridum* during growth in different culture media and during pathogenicity. In both varieties, the *cag8* gene was differentially repressed during germination and differentially induced during conidiogenesis and pathogenicity, the *nrr1* gene was constitutively induced during germination, conidiogenesis and pathogenicity and the *pr1A* gene was differentially induced in different culture media an differentially expressed during pathogenesis. Considering differences between varieties, the three genes were more expressed in *M. anisopliae* var. *anisopliae*, demonstrating that different varieties of *M. anisopliae* may differ in genes activation linked to virulence for certain environments and hosts.

Key-words: Biological control; entomopathogenic fungi; pathogenicity gene; RT-qPCR

Lista de figuras

Fundamentação Teórica

Pág.

Figura 1. A) Conidióforo ramificado apresentando fiálide (seta) de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> . B) Conidióforo simples de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> Fonte: Carneir-Leão (2004).....	16
Figura 2. Conídios jovens (seta a); conídios maduros (seta b) de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	17
Figura 3. Apressório de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> . Fonte: Carneiro-Leão (2004)..	18
Figura 4. <i>Mahanarva fimbriolata</i> (A); <i>Locusta migratoria</i> (B) infectados pelo fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> . Fonte: Itaforte Bioprodutos.....	19
Figura 5. Ciclo de infecção de <i>Metarhizium anisopliae</i> . Fonte: Alves, 1998.....	26
Figura 6 - Germinação de conídios e diferenciação na cutícula de <i>B. microplus</i> . Micrografia eletrônica de varredura evidenciando a formação de um conídeo (CO) formando um tubo germinativo (GT) na extremidade do qual é formada o apressório (AP). Barra, 2 µm.....	28
Figura 7- Curva de amplificação do PCR em Tempo Real. A amplificação mostra 5 fases distintas: (1) Região da linha basal: linha que está abaixo do limite de detecção da fluorescência ; (2) Limiar (<i>Threshold</i>): é um nível arbitrário de fluorescência escolhido com base na variação do valor basal; (3) Ct (<i>Cycle Threshold</i>) ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial; (4) Fase exponencial: quantidade do produto de PCR dobra a cada ciclo; (5) Fase Platô: não há mais amplificação (Fonte: adaptado de Nocvais & Pires-Alves, 2004).....	36
Figura 8- PCR em tempo real com SYBER Green demonstrando as etapas de desnaturação, anelamento e extensão (Fonte: adaptado de Martins, 2008).....	37
Figura 9 - PCR em tempo real com sonda TaqMan demonstrando as etapas de desnaturação, anelamento e extensão.....	39
Figura 10 - PCR em tempo real com <i>Molecular beacons</i> demonstrando as etapas de desnaturação, anelamento e extensão (Fonte: Center for medical research).....	40

Capítulo 1

Figura 1 - Nível de expressão realtiva do gene <i>cag8</i> durante a germinação, conidiogenese e patogenicidade de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> . ID (inseto morto), ME (micélio emergindo do inseto cadáver), IC (Inseto completamente coberto com conídios). Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, letras minúsculas representam diferenças entre os isolados e letras maiúsculas representam as diferenças entre as horas para cada isolado.....	52
Figura 2 - Nível de expressão relativa do gene <i>nrr1</i> durante a germinação, conidiogenese e patogenicidade. Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade	54
Figura 3 - Nível de expressão relativa do gene <i>nrr1</i> durante a germinação, conidiogenese e patogenicidade em <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e em <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> independente do tempo. Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade	55

Apêndice	Pág.
Figura A1- Curva de desnaturação (<i>Melting curves</i>). Gene <i>cag8</i> e <i>try</i> durante a germinação e conidiogênese de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	89
Figura A2- Curva de desnaturação (<i>Melting curves</i>). Gene <i>cag8</i> e <i>try</i> durante a patogênese de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	89
Figura A3- Curva de desnaturação (<i>Melting curves</i>). Gene <i>nrr1</i> e <i>try</i> durante a germinação e conidiogênese de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	90
Figura A4- Curva de desnaturação (<i>Melting curves</i>). Gene <i>nrr1</i> e <i>try</i> durante a patogênese de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	90
Figura A5- Curva de desnaturação (<i>Melting curves</i>). Gene <i>pr1</i> e <i>try</i> durante o crescimento em diferentes condições de cultivos e durante o porocesso patogênico em <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	91
Figura A6- Curva padrão do gene <i>cag8</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (A) e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> (B).....	92
Figura A7- Curva padrão do gene <i>try</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (C) e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> (D).....	92
Figura A8- Curva padrão do gene <i>nrr1</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (E) e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> (F).....	93
Figura A9- Curva padrão do gene <i>pr1A</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (G) e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> (H).....	93

Lista de tabelas

Capítulo 1	Pág.
Tabela 1 - Seqüência dos <i>primers</i> dos genes estudados e comprimento dos produtos de PCR.....	49
Tabela 2- Valores de E e R ² obtidos a partir das diluições dos genes alvos e de referência de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	51
Capítulo 2	
Tabela 1- Valores de E e R ² obtidos a partir das diluições dos genes alvos e de referência de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	63
Tabela 2- Expressão relativa do gene <i>pr1A</i> em <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> durante o crescimento em diferentes meios de cultura	64
Tabela 3 - Expressão relativa do gene <i>pr1A</i> em <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> durante a patogenicidade de <i>Diatraea saccharalis</i>	64
Tabela 4 - Mortalidade acumulada de <i>Diatraea saccharalis</i> infectadas por <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> durante 10 dias de avaliação	65

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	13
2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1. Aspectos taxonômicos e biológicos de <i>Metarhizium</i>	15
2.2. Utilização de <i>Metarhizium</i> spp. para o biocontrole de insetos praga.....	19
2.3. Mecanismo de infecção de <i>Metarhizium anisopliae</i> em artrópodes	25
2.4. PCR e qPCR(PCR quantitativo).....	34
2.5. RT-PCR em tempo real (RT-PCR quantitativo em tempo real)	41
3. Expressão diferencial de genes envolvidos na entomopatogenicidade de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	45
Resumo	45
Introdução	46
Material e Métodos	47
Resultados e Discussão	51
4. Expressão diferenciada do gene <i>pr1A</i> Durante o crescimento em diferentes condições de cultivo e durante o processo patogênico em <i>Metarhizium</i> <i>anisopliae</i>	57
Resumo.....	57
Introdução	58
Material e Métodos	59
Resultados	63
Discussão	65
5. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
APÊNDICE.....	89

1.INTRODUÇÃO

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados de forma racional e econômica no controle biológico. A maioria dos fungos entomopatogênicos já relatada ocorre no Brasil, sendo que mais de 20 fungos incidem sobre pragas de importância econômica (Alves, 1998; Bittencourt, 2000; Athayde *et al.*, 2001).

Entre os fungos entomopatogênicos mais conhecidos e estudados destaca-se *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, um importante agente microbiano para o controle biológico devido à variabilidade genética que resulta no aparecimento de muitas linhagens com diferentes níveis de virulência, especificidade, produção de conídios e resistência a ultravioleta (Alves, 1998; Azevedo, 1998).

Esse entomopatôgeno apresenta fases de vida como sapróbio, sendo encontrado em diferentes amostras de solo, e como parasita, mostrando especificidade a vários insetos. Os mecanismos morfológicos e citológicos envolvidos nestas fases são bastante conhecidos. No entanto, há falta de maiores informações e conhecimento em relação aos mecanismos genéticos. Neste contexto, genes como *ssga* (atua na estrutura do conídio e na patogenicidade), *nrr1* (regulador de nitrogênio), *pr1* (envolvido na patogenicidade), *cag8* (regula a atividade da GTPase da proteína G, atuando na estrutura do conídio e na patogenicidade) e *chi2* (papel fisiológico no crescimento da hifa) têm sido clonados e caracterizados (St Leger *et al.*, 1996a; Bogo *et al.*, 1998; Joshi & St Leger, 1999; Screen *et al.*, 2001; Baratto *et al.*, 2006).

Diferentes técnicas de biologia molecular como RT-qPCR, *Northern blotting*, hibridização *in situ* e a tecnologia de microarrajios (*microarray*), vêm sendo utilizadas para quantificar a expressão de genes (Dilger *et al.*, 2003; Toyoda *et al.*, 2004). Entre estas técnicas, RT-qPCR destaca-se por apresentar grande sensibilidade, tornando possível se utilizar quantidades mínimas de RNA. Nesta técnica é utilizada a enzima transcriptase reversa para converter a amostra de RNA em cDNA antes da etapa de amplificação por PCR, como também possibilita monitorar a amplificação em tempo real através da emissão de fluorescência (Novais & Pires-Alves, 2004). O RT-qPCR tem sido utilizado frequentemente para analisar expressões de genes em diferentes espécies de fungos e condições ambientais tal como: durante a germinação de *Pyrenophora teres* (Dilger *et al.*, 2003) e *Candida albicans* (Toyoda *et al.*, 2004); durante a produção de aflatoxina em *Aspergillus flavus* (Chang & Yu 2004), genes envolvidos na virulência de *M. anisopliae* (Fang & Bidochka 2006), análise de

transcritos em *Beauveria basiana* crescida em diferentes meios de cultura (Pathan *et al.*, 2007) entre outros.

Estudos detalhados sobre o sincronismo da expressão de genes envolvidos na virulência são cruciais para elucidar suas funções no processo de adaptação do fungo durante a patogenicidade e nos estágios de desenvolvimento em diferentes condições de crescimento e podem contribuir para uma melhor compreensão desses mecanismos, representando uma importante ferramenta para programas de melhoramento genético de linhagens utilizadas no controle biológico de pragas. Nesse contexto, esse trabalho teve por objetivo analisar a expressão dos genes *cag8* (envolvido na conidiogênese), *nrr1* (envolvido na regulação da resposta ao nitrogênio) e *pr1A* (codificador da proteína subtilisina PR1A) durante a germinação, conidiogênese e patogênese em *M. anisopliae* var. *anisopliae* e em *M. anisopliae* var. *acridum* usando a técnica de RT-qPCR.

2. FUNDAMETAÇÃO TEÓRICA

2.1. Aspectos taxonômicos e biológicos de *Metarhizium*.

Metarhizium anisopliae (Metsch) Sorokin

Metarhizium anisopliae foi descrito pela primeira vez 1879, em isolados de larvas do inseto *Anisopliae austriaca*, pelo zoologista e patologista Metschnikoff, recebendo o nome de *Entomophthora anisopliae* (Kendrick, 1971; Luna-Alves Lima, 1985; Alves, 1998; Xavier-Santos *et al.*, 1999a). Em 1883, Sorokin conferiu ao isolado de Metschnikoff a denominação de *M. anisopliae* que passou a ser aceita e utilizada até os dias atuais (Luna-Alves Lima, 1989).

Em estudos que separam os conídios de *M. anisopliae* em forma longa e curta, Tulloch (1976) admitiu para esta espécie duas variedades, as quais foram separadas de acordo com o tamanho dos conídios, onde *M. anisopliae* (Mestch.) Sorokin var. *anisopliae* apresenta conídios que variam de 3,5 – 9,0 µm. e *M. anisopliae* (Mestch.) Sorokin var. *major* Johnston apresenta conídios que variam de 9,0-18,0 µm. Por outro lado, Gams & Rozsypal (1973) descreveram pela primeira vez a espécie de *M. flavoviride* isolada de larvas de pupas de curculionídeos e de solos cultivados na Europa. Os autores empregaram características morfológicas, mensuração de conídios e tipo de fiálide para estabelecer o táxon e diferenciá-lo de *M. anisopliae*. Entretanto, Rombach *et al.* (1986) estenderam este conceito e propuseram uma nova variedade. A partir de então, a taxonomia de *M. flavoviride* passou a ter duas variedades: *M. flavoviride* Gams & Rozsypal var. *flavoviride* e *M. flavoviride* Gams & Rozsypal var. *minus* Rombach Humber e Roberts. Driver *et al.* (2000) reavaliaram a taxonomia de *Metarhizium* baseados nos padrões de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e na sequência ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossômico. Esse estudo permitiu o reconhecimento de quatro clades dentro do grupo *M. anisopliae*, correspondendo a duas variedades já descritas (*M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *majus*) e duas variedades novas (*M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *lepidiotum*). Após a publicação desse estudo as linhagens brasileiras isoladas de gafanhoto tidas com *M. flavoviride* passaram a ser denominadas de *M. anisopliae* var. *acridum*, sendo então aceitas pela comunidade científica (Gillespie *et al.*, 2000; Magalhães *et al.*, 2000; Arthurs & Thomas, 2001; Blanford & Thomas, 2001; Ouedrago *et al.*, 2003; Alburque *et al.*, 2005; Rangel *et al.*, 2005). Recentemente, Dong *et al.* (2007), baseados nos padrões morfológicos, enzimáticos e

filogenéticos descreveram uma nova variedade na China, *M. anisopliae* var. *dcjhyium*, isolada do cupim subterrâneo *Odontotermes formosanus*. Atualmente *M. anisopliae* está classificado no Filo Ascomycota devido ao isolamento do teleomorfo, *Cordyceps brittlebankisoides*, que foi relacionado com o anamorfo *M. anisopliae* var. *majus* (Liu *et al.*, 2001).

O ciclo parassexual foi descrito pela primeira vez a partir das linhagens mutantes, homocarióticas e haplóides. Dos cruzamentos dessas linhagens foram obtidos diplóides que foram confirmados após haploidização utilizando a substância Cloroneb (Messias & Azevedo, 1980). As estruturas reprodutivas em *M. anisopliae* são representadas por conidióforos e conídios. Os conidióforos são estruturas especializadas, hialinas, simples ou ramificadas que dão origem as fiálides, também hialinas, onde ocorre a mitose (Figura 1). Em *M. anisopliae*, a formação dessas estruturas segue o modelo fialídico proposto por Hughes (1953) que culmina com a produção de conídios de coloração esverdeada (Hammil, 1972), de inserção basipetal (Luna-Alves Lima, 1985).

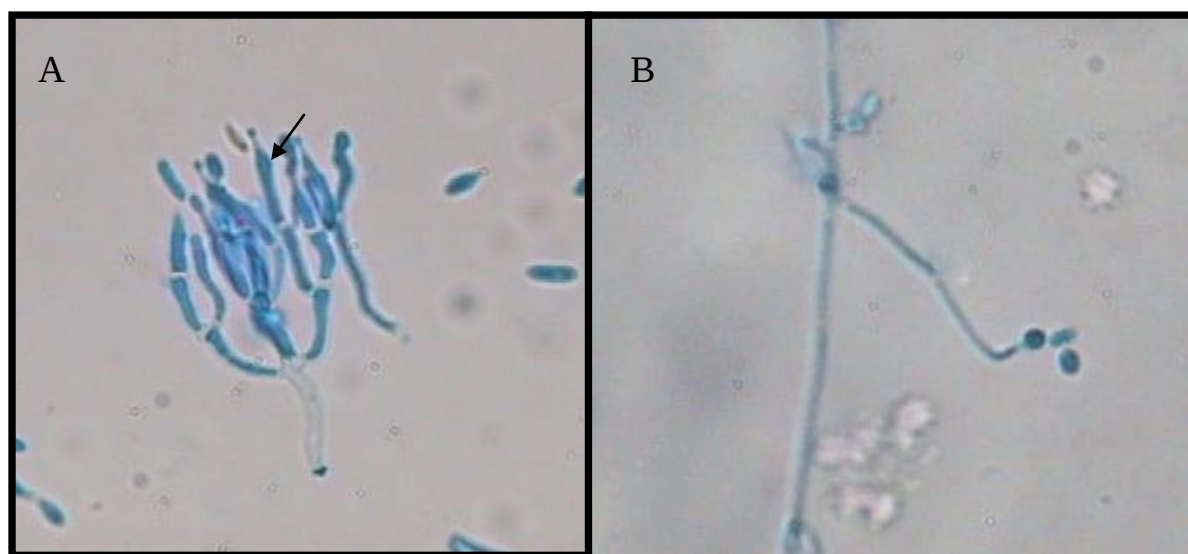


Figura 1. A) Conidióforo ramificado apresentando fiálide (seta) em *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. B). Conidióforo simples em *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Fonte: Carneiro-Leão (2004).

Posteriormente foi demonstrado por meio de estudos citológicos que conídios de *M. anisopliae* apresentavam variação quanto ao número de núcleos, à disseminação e à forma, onde foram observadas formas cilíndricas, globosas, ovóides, elípticas, triangulares, alantoides e hialodídimas, sendo esta última descrita pela primeira vez na literatura (Luna-Alves Lima, 1985). O desenvolvimento vegetativo ocorre normalmente na faixa de temperatura entre 15 e 32°C, sendo a temperatura e pH ótimos entre 24 e 30 °C e 6,9, respectivamente, apesar da tolerância a um intervalo de pH relativamente alto (2,0 a 8,5). (Arruda *et al.*, 2005). Este fungo apresenta estrutura reprodutiva semelhante a um esporodóquio na descrição de outros autores como Monteiro *et al.* (1998). Contudo, essa forma é, na verdade, a justaposição dos conidióforos que se entrelaçam frouxamente devido às intensas ramificações das estruturas hifais, mantendo conidióforos individualizados (Luna-Alves Lima, 1985; Xavier-Santos, 1999b; Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004).

O ciclo biológico de *M. anisopliae* se inicia com a germinação dos conídios e emissão do tubo germinativo que, após diferenciação hifal, forma o micélio formado por hifas de parede delgada, septadas e hialinas. Em determinadas partes o micélio desenvolvem-se os conidióforos que darão origem aos conídios. Os conídios jovens se apresentam de cor branca, tornado-se esverdeados com o amadurecimento da colônia (Ribeiro *et al.*, 1992; Figura 2).

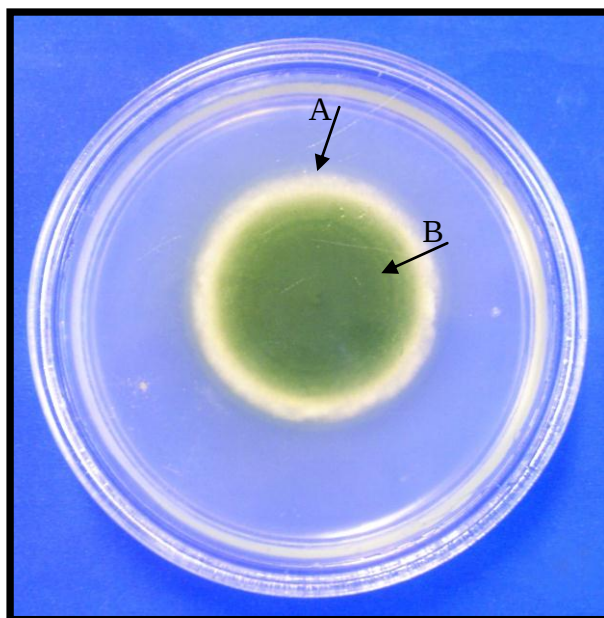


Figura 2. Conídios jovens (seta A); conídios maduros (seta B) de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.

Na fase parasitária, o fungo desenvolve estruturas denominadas apressórios (Ferron, 1978; Figura 3), que facilitam a penetração do mesmo no hospedeiro por meio de processos mecânicos e enzimáticos. Os apressórios penetram no inseto diferenciam-se em estruturas leveduriformes que secretam toxinas, culminando com a morte do inseto. Em seguida, as hifas se exteriorizam formando os conidióforos e conídios, que são dispersos no ambiente, concluindo o ciclo (Zacharuk, 1971; Luna-Alves Lima & Tigano, 1989).

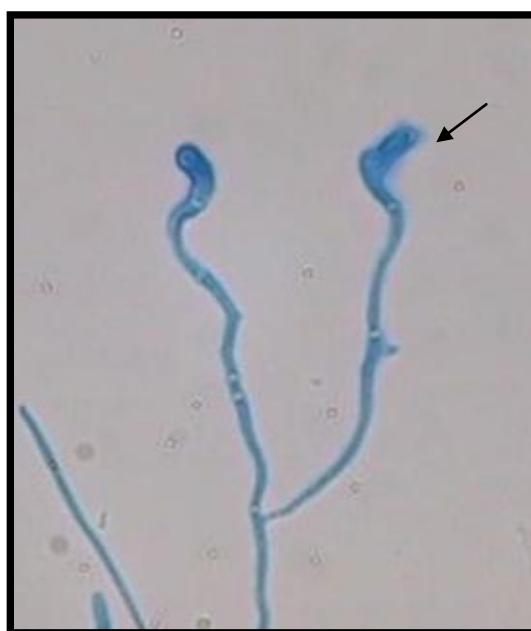


Figura 3. Apressório de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (seta). Fonte: Carneiro-Leão (2004).

A doença causada pelo fungo *M. anisopliae* é conhecida como muscardine verde, pois no final da conidiogênese, os cadáveres apresentam tons de verde entre o claro e o escuro (Wang *et al.*, 2002; Figura 4). Alves (1998) cita que os sintomas causados pela patogenia incluem inquietação, perda da sensibilidade, descoordenação dos movimentos e paralisia, levando-os à morte. O ciclo da relação fungo-hospedeiro de *M. anisopliae* depende de condições ambientais (temperatura, luz, umidade, radiação ultravioleta), condições nutricionais e susceptibilidade do hospedeiro. O fungo também possui conídios com capacidade de disseminação horizontal e pode ser levado por diferentes agentes para lugares distantes (Alves, 1998).

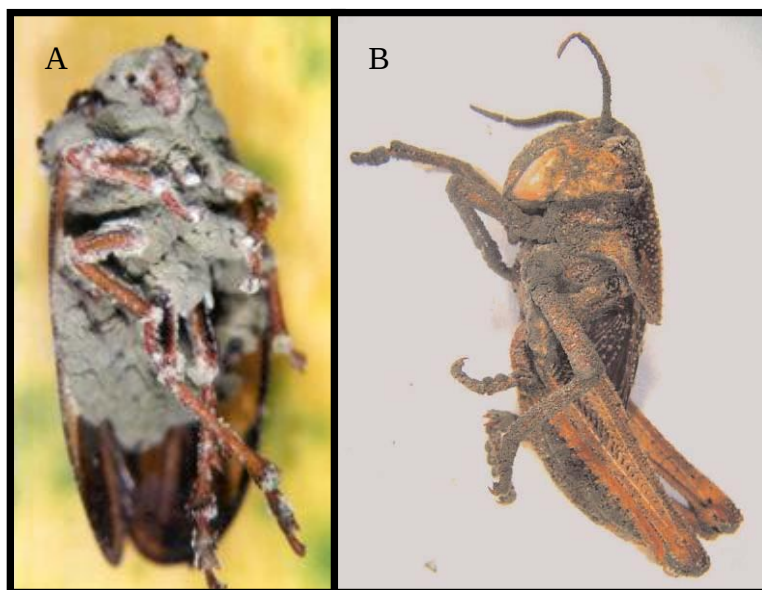


Figura 4. *Mahanarva fimbriolata* (A); *Locusta migratoria* (B) infectados pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. Fonte: Itaforte Bioprodutos (2010)

2.2 Utilização de *Metarhizium* spp. no biocontrole de insetos-praga

Alternativas aos defensivos agrícolas são estudadas em virtude destes produtos químicos representarem grandes custos aos agricultores e pecuaristas e danos ao meio ambiente e à saúde humana, apesar de serem vantajosos em relação à eficiência e rapidez na morte de pragas. No entanto, os defensivos agrícolas causam sérios efeitos negativos no equilíbrio da microbiota do solo, do clima, da fauna e flora, além de favorecerem a seleção de pragas resistentes, resultantes da forte pressão seletiva por eles exercidas. É nesse contexto que o controle biológico de pragas apresenta-se como uma alternativa promissora, pois além de utilizar mecanismos naturais de combate às pragas, apresenta grandes vantagens quanto ao impacto ambiental, aos custos, à especificidade e ao desenvolvimento de resistência (Alves, 1998; Milner, 2000; Shah & Pell, 2003).

O controle microbiano representa um ramo do controle biológico de insetos, que consiste na utilização racional de patógenos visando à manutenção do equilíbrio da população de pragas no ambiente (Alves, 1998). Entre os micro-organismos patogênicos com potenciais aplicações no controle biológico, os fungos entomopatogênicos apresentam vantagens como, por exemplo: possuem uma ampla gama de hospedeiros, se encontram amplamente distribuídos no solo, apresentam uma melhor dispersão de um hospedeiro infectado para outro

não infectado, não são infecciosos para humanos ou qualquer outro animal vertebrado, e também são de fácil manipulação e armazenamento (Milner, 2000; Kamp & Bidochka, 2002; Shah & Pell, 2003; Wang & Powell, 2004). Dentre os fungos utilizados no controle biológico destacam-se espécies dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Isaria*, *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Entomophthora*, *Hirsutella*, *Nomurea*, *Sporothrix* e *Trichoderma*, entre outros. A variabilidade natural desses fungos é uma das suas principais vantagens neste processo, pois, por meio de técnicas laboratoriais aprimoradas, torna possível a separação de isolados com características adequadas (maior produção de conídios, resistência a ultravioleta, especificidade ao hospedeiro) para serem utilizados como inseticidas biológicos (Azevedo, 1998; Azevedo, 2001, Azevedo & Wolff, 2002). *M. anisopliae* foi o primeiro organismo utilizado no controle biológico, testado para o controle de uma praga da beterraba (Alves, 1998). Seu habitat natural é o solo, onde o crescimento sapróbio ocorre geralmente sobre cadáveres de hospedeiros. No entanto, também sobrevive na forma de conídios dormentes que, em condições favoráveis, infectam hospedeiros suscetíveis ao contato (Milner, 2000; Vänninen *et al.*, 2000). Este fungo infecta mais de 300 espécies de insetos, que são pragas importantes da agricultura (Alves, 1998).

Vários estudos são conduzidos visando a seleção de linhagens eficientes de *Metarhizium*, para o controle de diversos insetos-praga (Entz *et al.*, 2008; Anand *et al.*, 2009). No Brasil, *M. anisopliae* assume grande importância por ter sido empregado no primeiro projeto de sucesso no controle biológico, com aplicação no campo, para o controle da cigarrinha da cana-de-açúcar *Mahanarva posticata*, sendo um dos programas mais bem sucedidos no mundo (Ferron, 1981; Alves, 1998; Faria & Magalhães, 2001). Este fungo também vem sendo utilizado contra insetos da ordem Homoptera, da família Cercopideae, conhecidos como cigarrinhas da cana-de-açúcar (*M. fimbriolata*) e das pastagens (*Zulia entreriana* e *Deois flavopicta*) (Alves, 1998; Mendonça, 2005; Pereira *et al.*, 2008). Neste sentido Loureiro *et al.* (2005) também testaram, em condições de laboratório, 79 isolados de *M. anisopliae* em *Mahanarva fimbriolata*, visando o seu controle, e observaram que a maioria dos isolados testados ocasionaram 70% de mortalidade das ninfas desse inseto em seis dias após a pulverização. Sua patogenicidade também foi avaliada em *Diatraea saccharalis* (broca da cana-de-açúcar) por Oliveira *et al.* (2008). Os autores avaliaram seu efeito sobre a mortalidade, duração e viabilidade das fases de larvas, pupa e ovos, como também a fecundidade e longevidade de adultos e observaram que as larvas tratadas com o fungo tiveram menor sobrevivência (56,6%) e que os adultos exibiram redução no desempenho, indicando que *M. anisopliae*, além de patogênico às larvas de *D. saccharalis*, também

interfere negativamente na sua biologia, mostrando potencial de uso contra esta praga. Lima (2005), também avaliou a ação patogênica de *M. anisopliae* contra *D. saccharalis*, além de realizar um estudo de caracterização molecular dessa espécie. A autora analisou 15 linhagens de *Metarhizium* isoladas de diferentes regiões e hospedeiros quanto às características genéticas e sete linhagens quanto à patogenicidade e observou que não houve correlação entre grupos e regiões geográficas. Das sete linhagens analisadas no teste de patogenicidade, a URM 4415, URM 4400 e URM 4897 causaram maior percentual de mortalidade das larvas. Também não houve correlação entre os agrupamentos gerados pelas técnicas moleculares e o percentual de mortalidade de larvas de *D. saccharalis*.

Um estudo sobre a esporulação de *M. anisopliae* var. *acridum* e *Beauveria bassiana* em *Rhammatocerus schistocercoides* (gafanhoto) em ambientes secos e úmidos e inoculados a 30^o e 25^oC respectivamente, observou-se que ambas espécies foram patogênicas ao *R. schistocercoides*, sendo que *M. anisopliae* var. *acridum* produziu mais conídios internamente do que *B. bassiana* a 53% e 75% de umidade relativa, não havendo esporulação externamente nessas mesmas unidades (Magalhães *et al.*, 2000). No mesmo sentido, Faria & Magalhães (2001) demonstraram o uso de *M. anisopliae* var. *acridum* como biorregulador de populações de *R. schistocercoides*. Esse fungo, em condições de campo, apresenta taxa de redução populacional de ninfas superior a 80%. A mesma variedade fúngica vem sendo tratada como micoinseticida no combate ao gafanhoto *Stiphra robusta* que ataca plantações de caju (Vicentini, 1999).

Metarhizium anisopliae também teve sua ação comprovada contra várias espécies de percevejos, tais como: o percevejo-de-renda da mandioca, *Vatiga illudens* (Oliveira *et al.*, 2001) o percevejo *Plautia stali* (Ihara *et al.*, 2001), o percevejo das gramíneas *Blissus antillus* (Samuels *et al.*, 2002), o percevejo-castanho-da-raiz *Scaptocoris carvalhoi* (Xavier & Ávila, 2006), e o percevejo subterrâneo, *Cyrtomenus bergi* (Jaramillo & Borgemeister, 2006). Sua importância também foi reassaltada no controle de importantes pragas como: *Anthonomus grandis*, bicudo-do algodoeiro e espécies de formigas do gênero *Atta* (Onofre *et al.*, 2002).

Isolados de *B. bassiana*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. flavoviride* var. *flavoviride* apresentaram ação contra ovos, larvas e adultos da mosca *Chrysomya albiceps*, sugerindo assim a possibilidade do emprego desses fungos no controle dessa mosca que acarreta prejuízos consideráveis aos rebanhos bovinos, causando infecções denominadas “bicheira” (Feijó, 2004).

A patogenicidade de *Metahizium anisopliae* var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* foi avaliada em larvas da mosca do figo *Zaprionus indianus* utilizando as concentrações 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 conídios/mL, considerando o percentual de emergência de adultos. Os resultados mostraram que a concentração 10^8 conídios/mL apresentou o menor índice de emergência de moscas para ambas as linhagens (13%) se diferenciando significativamente do controle (98%). No ano seguinte, Silva (2007) também avaliou a infectividade de duas linhagens de *M. anisopliae* para essa mesma mosca. O período de pré-pupa e o estágio pupal não sofreram alterações significativas em relação ao grupo controle. Porém, o percentual de emergência de adultos foi significativamente reduzido (3%) na concentração de 10^8 conídios/mL. Após nove dias de infecção, 98% dos adultos morreram na concentração mais elevada. Esses resultados demonstram que estes fungos têm ação patogênica para *Z. indianus*, expressando elevado potencial de infecção e podendo ser utilizado em programa de controle biológico dessa mosca.

Os efeitos de *B. bassiana* e *M. anisopliae* na mortalidade, fecundidade e fertilidade do ácaro do tomateiro (*Tetranychus evansi*) foram avaliados por Wekesa *et al.* (2006) que verificaram que adultos e deutoninfas foram mais suscetíveis aos fungos do que larvas e protoninfas. Observaram ainda, que todas as concentrações testadas ($3,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$ e 1×10^8 conídios/mL) interferiram na fecundidade das fêmeas, mas os resultados entre as concentrações não diferiram entre si, indicando que, mesmo na concentração mais baixa, a fecundidade foi afetada.

Cinco isolados de *Metarhizium anisopliae* (CG 041, CG 144, CG 167, CG 835 4 CG 891) foram analisados visando selecionar um agente promissor para o controle microbiano do percevejo-do-colmo do arroz, *Tibraca limbativentris* (Rampelotti *et al.* 2007). Os resultados deste trabalho demonstraram que ovos, ninfas e adultos de *T. limbativentris* são suscetíveis à infecção pelo isolado CG 891, sendo esse entomopatógeno um promissor agente de controle biológico da praga na cultura do arroz irrigado. A fecundidade e mortalidade larval do besouro da madeira (*Anoplophora glabripennis*) foram analisadas por Hajek *et al.* (2008) em fêmeas sexualmente maduras infectadas com *M. anisopliae*, isolado ARSEF 7234, numa concentração de $2,11 \times 10^8 \pm 4,78 \times 10^6$ conídios cm. Os autores observaram 72,4% de mortalidade para fêmeas expostas ao isolado. Analisaram, também, a fecundidade e longevidade de fêmeas recém-emergidas de *A. glabripennis* com o isolado ARSEF 7711 na concentração $1,30 \times 10^8 \pm 1,48 \times 10^7$ conídios cm. Os resultados mostraram que houve decréscimo na fecundidade.

M. anisopliae é bastante utilizada no controle de pragas que causam prejuízos às culturas de interesse agrícola em outros países. No Quênia, Maniania *et al.* (1994) realizaram experimentos no campo para avaliar o potencial da espécie *M. anisopliae* no controle biológico de *Chilo partellus* na cultura do milho e observaram que, embora o fungo não tenha sido patogênico em massa de ovos, houve uma redução significativa no número de larvas e no nível de danos às folhas. Na Austrália, Milner *et al.* (1996) avaliaram 12 isolados de *M. anisopliae* contra o grilo *Teleogryllus commodus*, uma peste dos pastos, e selecionaram a linhagem FI1099 que induziu uma mortalidade de 40 a 60%, para uso no campo na dosagem de 2 a 4 x 10¹³ conídios/ha 21 dias após a inoculação.

No Reino Unido, Chandler (1997) estudou a patogênicidade de 25 linhagens de *M. anisopliae* contra *Pemphigus bursarius*, uma peste da alface e observaram que somente uma linhagem foi capaz de controlar os afídeos, apresentando uma CL₅₀ de 2,45 x 10⁶ conídios/mL⁻¹ 10 dias após a inoculação. Já na Espanha, Herrera *et al.* (1999) avaliaram 10 isolados de *M. anisopliae* contra ninfas de *Bemisia tabaci* (mosca-branca), uma das principais pragas na cultura mundial podendo ocasionar 40 a 70% de perdas na produção. Os resultados alcançados mostraram que cinco dos 10 isolados testados foram patogênicos para as ninfas. Kanga *et al.* (2003), com o intuito de diminuir as perdas econômicas causadas nas indústrias de mel de abelha, avaliaram o potencial de *M. anisopliae* contra o ácaro de abelha *Varroa destructor*. Os pesquisadores relataram que o tempo necessário para a morte de 90% dos adultos em laboratório foi de 4,16 dias quando utilizada uma concentração de 1,1 x 10³ conídios/mL e a CL₉₀ foi de 7,13x10³ conídios/mL quando aplicados em colméia. Na China, sua ação foi avaliada contra *Lissorhoptrus oryzophilus*, uma praga que causa sérias perdas econômicas na cultura do arroz, por Chen *et al.* (2000) e observou-se uma redução de 92,5% na população de adultos, quando utilizada uma concentração de 10¹⁴ conídios/ha.

A patogenicidade de *M. anisopliae* também vem sendo avaliada em várias espécies de carapatos de grande importância na pecuária e veterinária em todo o mundo. Onofre *et al.* (2001) avaliaram a patogenicidade *in vitro* de quatro linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. flavoviride* var. *flavoviride* em *Boophilus microplus* e concluíram que as linhagens são efetivas como agentes neste controle, sendo *M. flavoviride* var. *flavoviride* a mais efetiva. Os autores sugeriram que a patogenicidade desta linhagem e o desenvolvimento de um método de aplicação deste fungo para o controle de carrapato pode resultar no melhoramento da produtividade e na redução da poluição ambiental através do uso em menor quantidade de inseticidas químicos. No ano seguinte, Onofre *et al.* (2002) também avaliaram a patogenicidade de duas linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e duas linhagens de *M.*

flavoviride var. *flavoviride* em larvas ingurgitadas de *B. microplus* e os resultados demonstraram que *M. anisopliae* var. *anisopliae* foi menos patogênico que *M. flavoviride* var. *flavoviride*. Entretanto, ambas as espécies controlaram este parasita com eficiência.

Athayde (2002) e Athayde *et al.* (2001) realizaram testes de laboratório com *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *B. bassiana* em *B. microplus*. Os resultados demonstraram a eficiência destes fungos e, com base nos resultados alcançados com *M. flavoviride*, sugeriram que este seja explorado como novo agente a ser investigado contra essa praga bovina. Nascimento (2003) avaliou, em condições de laboratório, a ação de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridum* e *B. bassiana* contra *Rhipicephalus sanguineus*, comprovando a patogenicidade desses fungos e sugeriu a sua utilização como possíveis controladores de *R. sanguineus*, o carrapato do cão.

Ferreira (2004), efetuou experimentos *in vitro* com linhagens de *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. flavoviride* var. *flavoviride*, mostrou que todas as linhagens utilizadas apresentaram atividades quitinolítica em substrato com cutícula de carrapatos e exoesqueleto de camarão, sendo que *M. flavoviride* var. *flavoviride* apresentou maior nível de atividade. Os resultados obtidos sugeriram o desenvolvimento de estudo utilizando diferentes exoesqueletos como uma maneira de se detectar os níveis da atividade quitinolítica e produção de quitinase com vista à seleção das linhagens fúngicas mais patogênicas às pragas de interesse veterinário e agroindustrial. Hornbostel *et al.* (2004) analisaram os efeitos subletais de *M. anisopliae* sobre *Ixodes scapularis* e constataram que esse fungo, aplicado na concentração 10^8 conídios/mL, reduziu a fecundidade e a massa corpórea de todos os estágios ativos do carrapato. Os autores discutem que esse impacto na fecundidade pode ser maior do que aquele sugerido pela mortalidade causada pelo fungo devido às conseqüências para o potencial reprodutivo das gerações seguintes.

Ensaio utilizando a capacidade entomopatogênica de *M. anisopliae* também são conduzidos em diversos vetores de doenças humanas como o transmissor do vírus da dengue *Aedes aegypti* (Scholte *et al.*, 2007), o mosquito transmissor da malária *Anopheles gambiae* (Scholte *et al.*, 2006), o vetor da doença de Chagas *Triatoma infestans* (Juarez *et al.*, 2000); moscas tsé-tsé, *Glossina morsitans morsitans* (Kaaya & Munyinyi, 1995), da filariose (*Culex quinquefasciatus*) (Juarez *et al.*, 2000; Scholte *et al.*, 2003) e diversos outros insetos vetores de doenças tropicais.

Os trabalhos relatados demonstram que *M. anisopliae* é bastante eficiente no controle de várias espécies de insetos. Vários inseticidas biológicos a base de *M. anisopliae* são comercializados em diferentes países como Bioblast[®], para o controle de cupins, Biostop[®] e MetaGuard[®], para a proteção de madeira contra cupins, Green-Muscle[®] e GreenGuard[™], para o controle de gafanhotos, BioGreen[™], para o controle de coleópteros de pastagens, BioCane[™], para o controle de coleópteros de cana-de-açúcar, e Tick-EX, para o tratamento contra carrapatos (Quarles, 1995; Cabi Bioscience, 1999; Milner, 2000; Kassa *et al.*, 2004, U.S. Environmental Protection Agency, 2006). No Brasil, existem formulações registradas como Metabiol[®], Biotech[®], Biomax[®], Metaquino[®] e Itaforte[®], utilizadas principalmente para o controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar e das pastagens (Alves, 1998). Porém, ainda existem problemas para a sua aprovação e aceitação no mercado, sendo que o principal deles é o maior tempo necessário entre a aplicação do biopesticida e a morte dos hospedeiros em comparação aos pesticidas químicos. Durante este período, que compreende entre dois ou três dias, as pragas ainda podem causar sérias perdas na produtividade. Desta forma, diversos estudos baseados nos mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos na relação entre o fungo e o hospedeiro, são conduzidos visando o aumento na velocidade de morte dos hospedeiros para melhorar a eficiência do biocontrolador (St. Leger *et al.*, 1996b; Screen *et al.*, 2001; Hu & St. Leger, 2002).

2.3. Mecanismos de infecção de *Metarhizium anisopliae* em artrópodes

O processo de infecção do fungo *M. anisopliae* sobre hospedeiros depende de uma sequência sincronizada de eventos de ordem mecânica e bioquímica. Este processo apresenta as seguintes fases: adesão, germinação, formação de apressórios, formação do grampo de penetração, penetração, colonização, reprodução e disseminação do patógeno (Alves, 1998), (Figura 5). O tempo de infecção e colonização pode variar, dependendo do hospedeiro e das condições ambientais (Hsiao & Ko, 2001; Wang *et al.*, 2002).

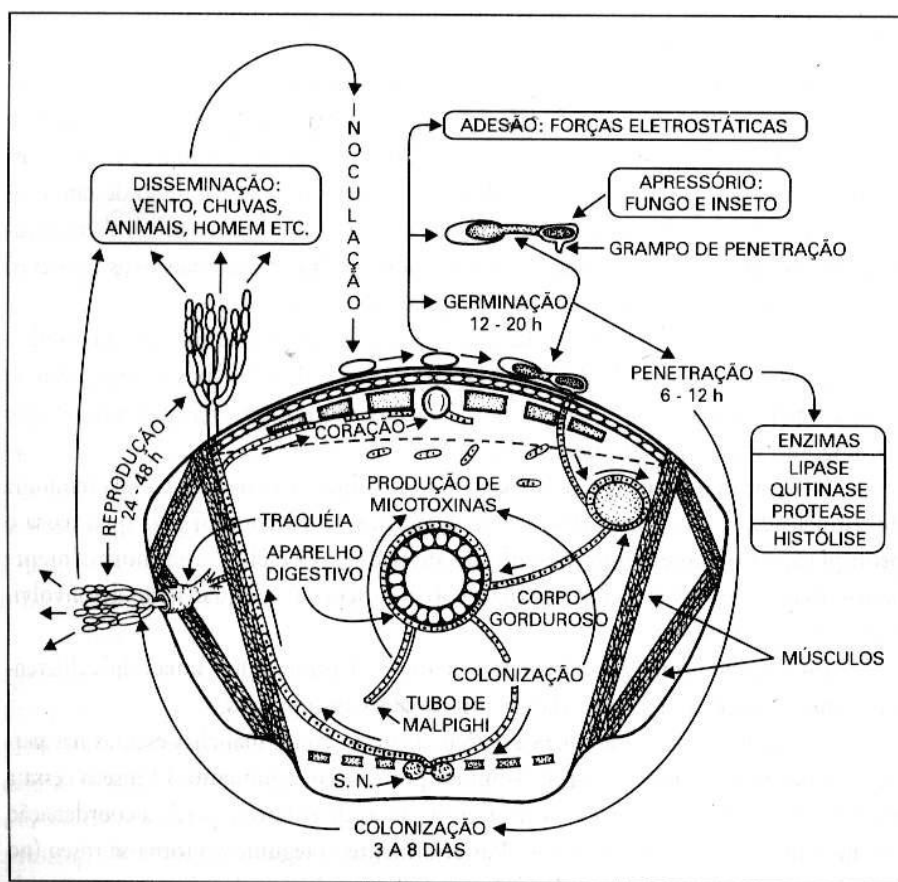


Figura 5. Ciclo de infecção de *Metarhizium anisopliae*. Fonte: Alves (1998).

Os diversos estudos com fungos entomopatogênicos demonstram a importância e aplicabilidade dos conhecimentos da biologia das espécies, para a seleção de isolados que tenham vantagens sobre a virulência ou especificidade ao controle biológico. Em *Metarhizium*, muitos estudos tem se dedicado a descrever, ao nível molecular, o processo de infecção dos hospedeiros, sendo observado que esse processo é complexo e multifatorial. Em especial, as etapas de adesão e de penetração ao hospedeiro através da cutícula são decisivas no estabelecimento da infecção e são muito atraentes do ponto de vista científico. Essas etapas envolvem profundas alterações dos padrões de expressão gênica, em função das alterações drásticas da quantidade disponível de nutrientes no solo e no hospedeiro (Roberts & St. Leger, 2004).

Na penetração da cutícula do inseto o fungo passa por um processo muito pronunciado de diferenciação celular que exige todo um repertório de genes ativadores e reguladores da expressão gênica. Ao penetrar no hospedeiro, novamente, uma readequação do perfil de expressão gênica deve ocorrer para melhor utilização de todo o conteúdo de nutrientes ofertado pelo hospedeiro. Após essa etapa, o fungo deve retornar à superfície onde condições

apropriadas de oferta de oxigênio, principalmente, permitem a formação das estruturas de produção de conídios que poderão, após a dispersão, infectar novos hospedeiros (Arruda *et al.*, 2005, Wag & St Leger, 2006).

A adesão do conídio à superfície da cutícula do artrópode é o primeiro passo no processo de infecção. Sendo pouco conhecido, representa, provavelmente, um evento complexo no qual participam desde fatores químicos, como interações hidrofóbicas, até a atividade de enzimas as quais proporcionam as primeiras fontes de nutrientes para as etapas seguintes (St. Leger *et al.*, 1989a). Durante a adesão, também ocorre o reconhecimento das estruturas mais superficiais da cutícula e, provavelmente, é definida a especificidade de um determinado isolado/hospedeiro. (Lord & Howard, 2004). Como a superfície da cutícula é recoberta por lipídios e ceras, na adesão possivelmente participam enzimas como esterases e lipases que ocorrem na superfície dos conídios não germinados e alteram a superfície do tegumento do hospedeiro, favorecendo a nutrição e a germinação do fungo (St. Leger *et al.*, 1991b).

Alguns autores sugerem que forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e ligações específicas às lectinas possam auxiliar o processo de adesão do conídio à superfície da cutícula (Hegedeus & Khachatourians, 1995; Bidochka *et al.*, 1997). O conídio possui em sua superfície proteínas apolares, conhecidas como hidrofobinas, as quais são responsáveis pela interação com a camada lipídica presente na superfície do hospedeiro permitindo, dessa forma, a adesão (St. Leger *et al.*, 1992; Fang *et al.*, 2007). Por outro lado estudos demonstraram a participação de uma adesina, codificada pelo gene *Mad1* em *M. anisopliae*, na adesão de conídios à cutícula de larvas de *Manduca sexta*. Mutantes nulos deste gene tiveram diminuição da germinação na cutícula do hospedeiro, além da diminuição da virulência (Wang e St. Leger 2007a).

Após a adesão do conídio, inicia-se o processo de penetração, pelo qual haverá transposição da cutícula do hospedeiro. Em condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, O₂ e nutrição, o fungo germina sobre a cutícula, produzindo o tubo germinativo. A germinação pode ser beneficiada pela presença de nutrientes como aminoácidos, esteróis, hexoses, e ser afetada por substâncias químicas existentes na superfície do hospedeiro, como ácidos graxos, lipídios, fenóis e pela microflora saprofítica (Roberts & St. Leger, 2004). De acordo com Silva *et al.* (2005), *M. anisopliae* produz algumas lipases extracelulares, mas pouco se conhece sobre a sua função e participação no reconhecimento do hospedeiro e na participação durante o processo de infecção. Relatos recentes demonstraram que os componentes da camada lipídica, tanto de natureza polar quanto apolar, podem promover a

germinação de conídios de *M. anisopliae* em asas do gafanhoto *Schistocerca gregaria* antes da penetração propriamente dita (Jarrold *et al.*, 2007). Um fato que também promove a germinação em *M. anisopliae* é a possível liberação de pelo menos cinco isoformas de proteases envolvidas na degradação de proteínas na epicutícula (Qazi & Kachatourians, 2007).

A extremidade do tubo germinativo se diferencia em uma estrutura caracterizada pela dilatação da hifa, o apressório, com o conseqüente acúmulo interno de açúcares para a geração de pressão osmótica que auxilia na penetração (Wang & St. Leger, 2007b) (Figura 6).

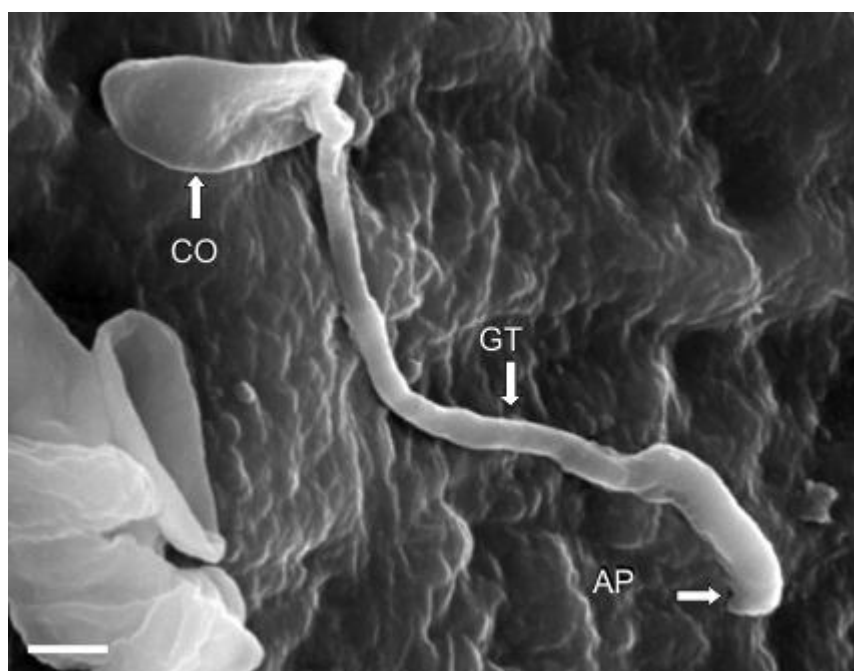


Figura 6: Germinação de conídios e diferenciação na cutícula de *Boophilus microplus*. Micrografia eletrônica de varredura evidenciando a formação de um conídio (CO), formando um tubo germinativo (GT), na extremidade do qual é formada o apressório (AP). Barra, 2 μ m. (Arruda *et al.*, 2005).

Diversos mecanismos controlam a formação de apressórios em *M. anisopliae*. A baixa concentração de nutrientes e a natureza hidrofóbica do suporte sobre o qual se desenvolve o tubo germinativo são fundamentais para a diferenciação da extremidade da hifa em apressório, *in vitro* (St. Leger *et al.*, 1989b). Wang & St. Leger (2007b) elucidaram a relação do gene *Mpl1*, que codifica uma perilipina, na diferenciação dos apressórios em *M. anisopliae*. Perilipinas são proteínas que circundam gotículas de lipídeos no interior da célula como forma de armazenamento. Esses autores observaram, em linhagens mutantes de *M. anisopliae* com o gene *Mpl1* desativado, formação de apressórios com menor nível de

gotículas de lipídios, levando ao menor turgor, menor pressão osmótica e consequentemente deficiências no processo de penetração.

Após a formação do apressório, ocorre o desenvolvimento dos grampos de penetração, que são caracterizadas por uma alteração na parede celular da região do apressório que está em contato com o hospedeiro, sendo esta mais fina e saliente (St. Leger *et al.*, 1991b; Clarkson & Charnley, 1996). Evidências obtidas por microscopia eletrônica e histoquímica sugerem que a etapa de penetração ocorra por uma combinação de pressão mecânica e degradação enzimática (Bittencourt *et al.*, 1999; Arruda *et al.*, 2005), pela produção de enzimas como quitinases, proteases e lipases (Kucera, 1980; St. Leger *et al.*, 1986a, 1986b, 1988, 1991a; Pinto *et al.*, 1997; Alves, 1998; Barreto *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005). Em um período inferior a 24 horas após o início da formação do tubo germinativo, as proteases são detectadas antes das enzimas quitinolíticas. É sugerido que o aparecimento tardio das quitinases ocorra, provavelmente, devido à indução pela quitina existente na cutícula dos artrópodes que só é exposta ao fungo após a digestão das proteínas a ela complexadas. Os principais constituintes da cutícula de artrópodes são as proteínas (55–80%) e, desse modo, as proteases provavelmente tem o papel principal durante a sua degradação (St. Leger *et al.*, 1986b).

Diversos trabalhos relatam a clonagem de genes que codificam proteases degradadoras de cutícula. St. Leger *et al.* (1992) isolaram e caracterizaram o cDNA do gene *pr1* de *M. anisopliae*. A análise da sequência revelou que a estrutura primária de Pr1 é muito similar a serino-endopeptidases da subclasse das subtilisinas e que os resíduos de serina, histidina e aspartato de sítio ativo das subtilisinas estão presentes. Todavia Joshi *et al.* (1997) utilizaram a técnica de DD-RT-PCR (*Differential Display Transcriptase Reversa PCR*) para identificar genes diferencialmente expressos por *M. anisopliae* na presença de cutícula. O gene que codifica uma protease tipo-subtilisina obtido pelos autores foi denominado *pr1B* para diferenciar, do primeiro gene encontrado que passou a ser denominado de *pr1A*. A análise da sequência de aminoácidos revelou que Pr1B apresenta similaridade de 54% com Pr1A e uma análise de cariótipo mostrou que os genes *pr1A* e *pr1B* estão em cromossomos distintos.

Estudo de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* revelou uma grande quantidade de proteases produzidas por ambas as variedades, incluindo subtilisinas, tripsinas, quimiotripsinas, metaloproteases, aspartilproteases, aminopeptidases e carboxipeptidase (Freimoser *et al.*, 2003). Nesse estudo foram encontradas sequências relacionadas a diversos fatores de virulência em ambas as variedades, dentre as quais diversas subtilisinas (11 para *M. anisopliae* var. *anisopliae* e 3

para *M. anisopliae* var. *acridum*), das quais 7 não haviam sido relatadas anteriormente (Pr1C, Pr1D, Pr1G, Pr1H, Pr1I, Pr1J, Pr1G-K). Além das subtilisinas foram caracterizadas proteínas de transporte, sinalização e toxigênicas, que possivelmente participam na defesa contra micro-organismos oportunistas durante o processo de infecção. A análise quantitativa das seqüências expressas por *M. anisopliae* var. *anisopliae* indicou as subtilisinas e tripsinas como as enzimas mais abundantes nas condições de indução. Entretanto foi caracterizado um padrão diferente de seqüências expressas em *M. anisopliae* var. *acridum*. Esta variedade produziu quitinases e proteases tipo subtilisina como enzimas mais abundantes, além da ausência de tripsinas (Freimoser *et al.*, 2003). Mesmo não sendo expressos, os genes de tais proteases foram amplificados por PCR (Bagga *et al.*, 2004), o que sugere que as diferenças nos fatores de patogenicidade entre essas espécies podem existir devido à regulação diferente do mesmo conjunto de genes, ao invés de variações no número e tipos de genes.

Quando relacionadas diretamente como fatores de virulência há demonstração de que linhagens com expressão aumentada da protease Pr1A apresentam maior patogenicidade ao hospedeiro *M. sexta* (St. Leger *et al.*, 1996b). Mutantes espontâneos nulos para o gene *pr1A* de *M. anisopliae* não apresentaram diferenças de virulência para larvas de *Galleria mellonella*, porém, nos ensaios utilizando larvas de *Tenebrio molitor* mostraram redução na capacidade infectiva quando comparado ao tipo-selvagem, sugerindo assim, que linhagens mutantes espontâneas nulas para o gene *pr1A* ainda são capazes de infectar seus respectivos hospedeiros embora com menor virulência. Resultados semelhantes foram obtidos por Franceschini (2005). Linhagens de *M. anisopliae* com expressão aumentada e constitutiva do gene *pr1A* foram mais infectivas, em relação à linhagem selvagem, para larvas da lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis*, ao passo que não foram detectadas diferenças de infectividade quando o hospedeiro era o carrapato *B. microplus*. Desta forma, pode haver secreção de diferentes subtilisinas dependendo do hospedeiro infectado por *M. anisopliae*.

Recentemente foi identificado e clonado o gene *pr1A* de uma linhagem de *M. anisopliae* var *acridum* específica do gafanhoto *Locusta migratoria manilensis*. As análises das seqüências revelaram que o gene *pr1A* pertence à família da protease Subtilisina-serina. Essa proteína também foi expressa em *Pichia pastoris* a fim de verificar a atividade da protease e os resultados mostraram que o gene clonado *pr1A* de *M. anisopliae* tem função degradante de cutícula, sugerindo assim, que esse é um fator de virulência potencial para o desenvolvimento da engenharia de biopesticidas (Zhang *et al.*, 2008).

As quitinases, enzimas que degradam a quitina, também têm um possível papel durante o processo de penetração. Estas enzimas têm sido descritas com pelo menos duas funções importantes em fungos filamentosos: o remodelamento da parede celular dos fungos durante seu crescimento e diferenciação e a degradação de quitinas extracelulares para a nutrição (St. Leger *et al.*, 1991a). *M. anisopliae* produz pelo menos seis diferentes quitinases secretadas, como detectado em zimogramas de atividade quitinolítica de sobrenadantes de cultivos em meio mínimo contendo quitina (Pinto *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2005). No entanto, foram clonados apenas três genes que codificam a enzima. O gene *chit1*, que codifica uma proteína madura de massa molecular de 42 kDa denominada CHIT42, foi isolado e caracterizado por Bogó *et al.* (1998), e especula-se que esta atue no processo de nutrição e no crescimento celular (Baratto *et al.*, 2003). Entretanto, a construção de linhagens com expressão aumentada desta proteína não acarretou aumento da virulência contra larvas da mariposa *M. sexta* (Screen *et al.*, 2001). O gene *chi2*, que codifica também uma quitinase de 42KDa (Baratto *et al.*, 2006) foi clonado e caracterizado, mas pouco ainda se sabe sobre a sua função. Dados iniciais apontam para a síntese de dois transcritos, um deles um produto de *splincing* alterado que parece ter uma regulação complexa. Por fim o gene *chi3*, o qual codifica uma proteína madura de 30 kDa, denominada CHIT30, com atividades de exo e endoquitinase, encontrada *in vivo* durante o processo de penetração do fungo no carrapato *B. microplus* (Silva *et al.*, 2005). A inativação desse gene não causou alterações significativas no fenótipo dos mutantes, indicando que a inativação desse gene não altera a eficiência da infecção (Staats *et al.*, 2007). Essa complexidade surpreendente do sistema de degradação de quitina parece estar presente em outros fungos filamentosos e pode ser uma estratégia mais global da biologia destes organismos (Curach *et al.*, 2004; Dana *et al.*, 2005).

Após a penetração, as células oriundas do grampo de penetração atingem a hemocele e se diferenciam em blastosporos, células derivadas de hifas, com menor tamanho, que provavelmente facilitam a sua circulação na hemolinfa e conseqüente disseminação no corpo do hospedeiro. O gene da adesina *MAD1*, além de influenciar a adesão e a germinação, controla também a formação de blastosporos, visto que mutantes nulos deste gene não são capazes de formar estas células *in vitro*, desenvolvendo-se como tubos germinativos (Wang & St. Leger, 2007b). Na hemolinfa, a qual é composta por água, carboidratos, proteínas e aminoácidos (Bidochka *et al.*, 1997), ocorre a produção de metabólitos secundários como o ácido oxálico e ácido cítrico, e de toxinas fúngicas, denominadas dextruxinas, que afetam os canais de transporte de íons envolvidos na resposta muscular e na integridade da membrana celular. O hospedeiro mostra sintomas como inquietação, perda da coordenação motora e

parada da ingestão de alimento (Vey *et al.*, 2002). Embora suas propriedades inseticidas tenham sido demonstradas, a função das destruxinas na patogenicidade ainda não foi completamente elucidada (Kershaw *et al.*, 1999; Vey *et al.*, 2002). Zhao *et al.* (2006) relataram em experimentos de infecção com o gafanhoto *Locusta migratoria manilensis* mostrando a expressão do gene *ntl-1*, o qual codifica uma trealase, durante a infecção, assim como a presença desta enzima na hemolinfa de gafanhotos infectados.

Um componente de defesa de *M. anisopliae* contra o sistema imune de insetos é a expressão de uma forma de colágeno na superfície de conídios e blastosporos que impede o reconhecimento e ataque de hemócitos, células do sistema imunológico de insetos.

Mutantes nulos para o gene (*Mcl1*) apresentam virulência diminuída contra larvas de *M. sexta* e são facilmente encapsulados por hemócitos presentes na hemolinfa da larva (Wang & St. Leger, 2006). Outro gene possivelmente relacionado com a adaptação de *M. anisopliae* às condições de alta pressão osmótica da hemolinfa do inseto é o *Mos1*. A deleção desse gene aumentou a sensibilidade ao estresse osmótico e oxidativo, diminuiu a formação de apressórios e virulência sobre *M. sexta* (Wang *et al.*, 2008). O gene *Mlac1* também está envolvido na virulência e ao estresse ambiental em *M. anisopliae*. Mutantes nulos para este gene não só reduziram a virulência sobre *Galleria mellonella*, mas também apresentaram conídios amarelos com susceptibilidade aumentada ao choque térmico e ao estresse da UV-B (Fang *et al.*, 2010).

Um entendimento dos processos envolvidos na regulação da conidiogênese é essencial para o desenvolvimento comercial e melhoria de linhagens de *M. anisopliae*. Em vários fungos filamentosos a via de sinalização da proteína G está envolvida na conidiogênese, na morfogênese e patogenicidade (Bolker, 1998; Lengeler *et al.*, 2000; Borkovich *et al.*, 2004). O circuito da regulação genética da conidiogênese é iniciado quando a via da proteína G é ativada. Neste contexto, Fang *et al.* (2007) clonaram e caracterizaram o gene *cag8* (regulador da sinalização da proteína G) de *M. anisopliae*. A análise filogenética mostrou que o *cag8* é ortólogo do gene *flbA* (regulador da proteína G) de *Aspergillus nidulans*. A complementação de $\Delta flbA$, de uma linhagem mutante de *A. nidulans* que não produz conídios, com *cag8* restaurou a conidiogênese e deleções do gene *cag8* resultaram na falta de conídios em *M. anisopliae* em meio de cultura e no inseto infectado, reduzindo o crescimento micelial, virulência, e causando a falta de pigmentação e forma irregular dos blastosporos. Desta forma, os autores demonstraram que o gene *cag8* desempenha um papel crítico na conidiogênese e na virulência.

O gene regulador de nitrogênio *nrr1* também tem demonstrado ser importante na patogenicidade, uma vez que os genes de *M. anisopliae* que codificam enzimas degradantes de cutículas do inseto são regulados em resposta a disponibilidade de carbono e nitrogênio (Paterson *et al.*, 1994; St. Leger, 1995). Screen *et al.* (1998), através de análises filogenéticas, constataram que NRR1 de *M. anisopliae* é um homólogo funcional da proteína AREA de *Aspergillus*. Os autores demonstraram a equivalência de *nrr1* com o *areA* por transformação e complementação de uma linhagem de *A. nidulans* com perda da função do gene *areA* com o gene *nrr1* de *M. anisopliae*. Os transformantes de *A. nidulans areA⁻/nrr1⁺* foram capazes de crescer em meio com nitrato e glutamato como únicas fontes de nitrogênio, enquanto a linhagem *areA⁻* foi incapaz de crescer nessas condições. O gene *areA* é um regulador de ação positiva global, ativando os genes estruturais do nitrogênio quando as fontes de nitrogênio são poucas, ligando diretamente ao GATA das regiões promotoras dos genes estruturais do nitrogênio (Kudla *et al.*, 1990; Marzluf 1997). Fang & Bidochka (2006), ao observarem o padrão de expressão constitutivamente induzido desse gene durante a germinação, conidiogênese e patogenicidade de *M. anisopliae* sugeriram que *nrr1* pode mediar a desrepressão catabólica do nitrogênio de maneira similar ao *areA*.

Diferenças claras nos perfis metabólicos também foram observadas a partir da análise das ESTs. Em geral, os genes necessários para síntese e degradação da parede celular, metabolismo de carboidratos, resposta a estresse ambiental, desintoxicação e transporte transmembrana foram comumente encontrados no perfil metabólico de *M. anisopliae* var. *acridum*. Por outro lado, as sequências expressas mais abundantes de *M. anisopliae* var. *anisopliae* foram da síntese de toxinas e controle do ciclo celular (Freimoser *et al.*, 2003). Estas variações refletem as diferentes estratégias ecológicas das duas variedades. *M. anisopliae* var. *acridum* tem como característica invadir todos os tecidos do hospedeiro, levando o inseto à morte (Inglis *et al.*, 2001). Já *M. anisopliae* var. *anisopliae* mata o hospedeiro pela produção de toxinas, seguindo com crescimento saprobio no interior do inseto (Samuels *et al.*, 1989).

2.4. PCR e qPCR (PCR quantitativo)

O advento da biologia molecular foi certamente um dos maiores passos das ciências biológicas durante o Século XX. A descoberta da técnica de reação em cadeia da polimerase, denominada PCR (*Polymerase Chain Reaction*) trouxe enormes benefícios ao desenvolvimento dos estudos genéticos, dando origem a outras classes de marcadores moleculares que têm revolucionado a genética molecular. Essa ferramenta funciona de forma relativamente simples, rápida e segura para a identificação e caracterização de diversos organismos e contribui para o entendimento de vários processos biológicos, com aplicação na taxonomia e filogenia de fungos (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Leal-Bertioli, 1998; Inglis *et al.*, 1999; Fungaro, 2000).

A PCR é a amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA visando a produção de milhões de cópias desta sequência. A PCR explora a capacidade de duplicação do DNA, onde uma fita simples de DNA é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares sob a ação da enzima polimerase do DNA. Essa enzima é capaz de adicionar os nucleotídeos presentes na reação, segundo a fita molde. A polimerase do DNA requer, entretanto, um “ponto de início” ligado à fita molde que servirá de apoio para que os nucleotídeos subsequentes sejam adicionados. Esse ponto de início da síntese é fornecido por um oligonucleotídeo que se hibridiza (se anela) à fita molde simples, o qual é denominado de *primer*. Ambas as fitas simples iniciais servem de fita molde para a síntese, desde que se forneça *primers* específicos a cada uma delas. Dessa forma, a região do DNA genômico a ser sintetizada é definida pelos *primers*, que se anelam especificamente às suas sequências complementares na fita molde, delimitando o fragmento de DNA que se deseja amplificar (Fungaro, 2000).

Na prática, o que se faz é adicionar em um microtubo uma quantidade muito pequena de DNA genômico, mais os quatro nucleotídeos que compõem a cadeia de DNA (dCTP, dATP, dGTP e dTTP), a Taq polimerase, os oligonucleotídeos, os íons essenciais à reação (Mg^{+}) e a solução tampão, a qual fornecerá as condições de pH e salinidade para que a síntese se processe. O microtubo com todos os reagentes é submetido a uma alta temperatura (geralmente 94°C por 5 minutos) para provocar o rompimento das pontes de hidrogênio entre as cadeias de DNA, causando a desnaturação da molécula. A temperatura é rebaixada (30 a 65°C por 30 segundos) quando, então, os *primers* têm a oportunidade de se anelarem às suas sequências complementares do DNA genômico. Finalmente, a temperatura é colocada em torno de 72°C (por 2 a 5 minutos), temperatura ideal para que a Taq polimerase promova a

síntese de novas cadeias. Repetindo-se esses três passos, desnaturação, anelamento e síntese, por cerca de 30 ciclos, produziu-se mais de 250 milhões de cópias de uma determinada sequência de DNA em fita dupla, uma vez que o número de cópias cresce de modo exponencial a cada ciclo. Para a análise dos resultados, os produtos de amplificação são separados por eletroforese em gel de agarose (Farah, 2000). Essa técnica tem permitido avanços significativos nas áreas aplicadas, dentre as quais a identificação de genótipos, o diagnóstico de doenças, melhoramento genético de plantas, animais e microrganismos (Gardes, 1996; Fungaro & Vieira, 1998; Destéfano *et al.*, 2004; Hyun *et al.*, 2007; Sasseron, 2008).

As pesquisas se avolumam de modo que uma inovação tecnológica resultante da PCR, denominada de PCR quantitativo (qPCR), vem ganhando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos. Essa técnica permite o acompanhamento da reação, por meio da emissão de uma fluorescência, e apresenta os resultados de forma mais precisa e rápida, em relação à PCR tradicional que apresenta somente resultados qualitativos (Novais & Pires-Alves, 2004).

Esta possibilidade de monitorar a PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e cDNA de maneira mais precisa e com maior reprodutibilidade porque determina valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de Ct (*Cycle Threshold*). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseada na fluorescência. (Figura 7).

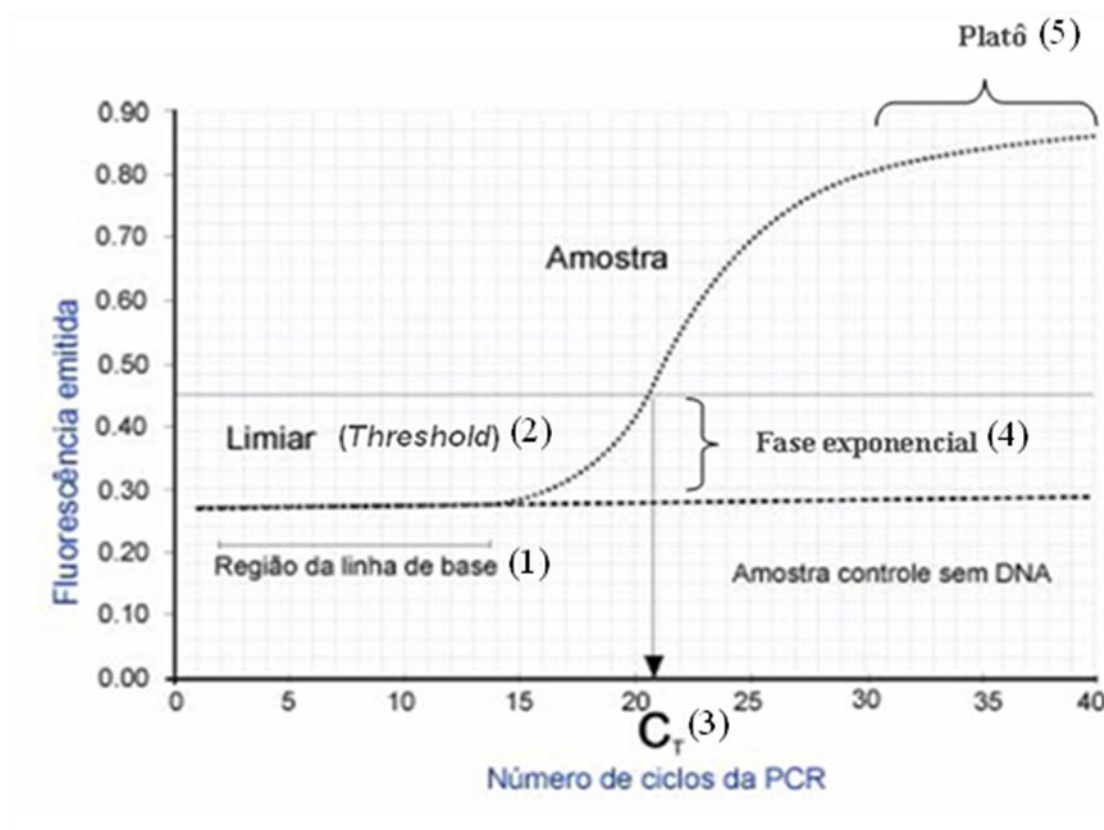


Figura 7. Curva de amplificação da PCR em Tempo Real. A amplificação mostra 5 fases distintas: (1) Região da linha basal: linha que está abaixo do limite de detecção da fluorescência ; (2) Limiar (*Threshold*): é um nível arbitrário de fluorescência escolhido com base na variação do valor basal; (3) C_T (*Cycle Threshold*) ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial; (4) Fase exponencial: quantidade do produto de PCR dobra a cada ciclo; (5) Fase Platô: não há mais amplificação (Fonte: adaptado de Novias & Pires-Alves, 2004).

A emissão da fluorescência aumenta na proporção direta da quantidade de produtos de PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são gerados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado. (Novais & Pires-Alves, 2004). Esta técnica requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador com sistema ótico para excitação da fluorescência e coleta da emissão e um computador com um software para aquisição de dados e análise final da reação.

Os sistemas de detecção da qPCR utilizam os fluoróforos, que são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico, para proporcionar o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos. Existem três principais tipos de detecção de qPCR disponíveis que são: SYBR Green, sonda de hidrólise (TaqMan) e Molecular Beacons, estas duas últimas com capacidade de hibridização gerando transferência de energia para quantificação (Wong & Medrano, 2005).

O SYBR® Green é um corante fluorescente que se intercala no DNA de fita dupla e com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite fluorescência. No início da amplificação, a mistura da reação contém o DNA desnaturado, os iniciadores e o SYBR® Green. As moléculas não-ligadas do SYBR® Green apresentam fluorescência fraca produzindo um sinal mínimo sendo este subtraído durante a análise de computador. Após o reconhecimento dos iniciadores, algumas moléculas do SYBR® Green podem ligar-se à fita dupla previamente formada. Durante a polimerização catalisada pela enzima *Taq* DNA polimerase, as moléculas do SYBR® Green vão se ligando ao DNA recentemente sintetizado. Assim, a reação é monitorada continuamente e um aumento da fluorescência é observado em tempo real. No ciclo seguinte, na etapa de desnaturação do DNA, as moléculas SYBR® Green são liberadas e há queda no sinal da fluorescência. A detecção da fluorescência no fim da etapa de cada ciclo da PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado (Figura 8) (Vitzthum *et al.*, 1999).

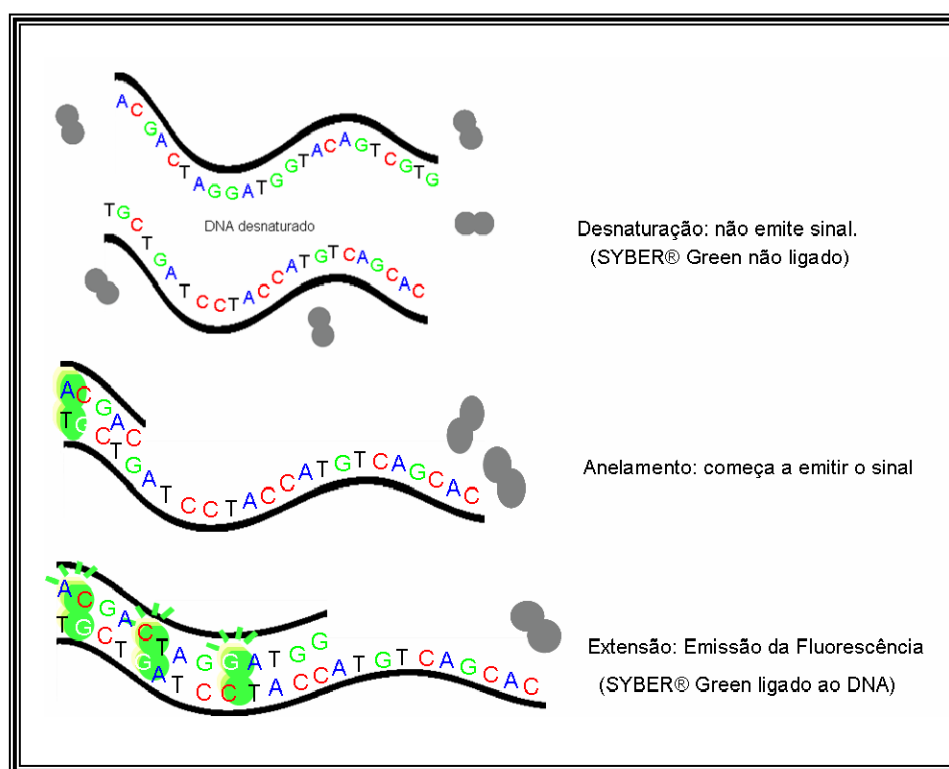


Figura 8: PCR em tempo real com SYBER Green demonstrando as etapas de desnaturação, anelamento e extensão. Fonte: adaptado de Martins (2008).

TaqMan é uma sonda de hidrólise (fragmento de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA) utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo e na outra extremidade um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e dissipa na forma de luz e calor). Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonucleasica 5'→3' da *taq* DNA polimerase. Durante a PCR em tempo real a sonda TaqMan hibridiza com a sequência da fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação. No processo da amplificação a sonda TaqMan é degradada devido a ação da exonuclease 5'→3' da *taq*DNA polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão. A separação do fluoróforo do *quencher* resulta em um aumento da intensidade da fluorescência. Assim, durante o processo de amplificação a emissão de luz é aumentada de forma exponencial. Esse aumento da fluorescência ocorre apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da sequência alvo é estabelecida (Gibson *et al.*, 1996; Holland *et al.*, 1999) (Figura 9).

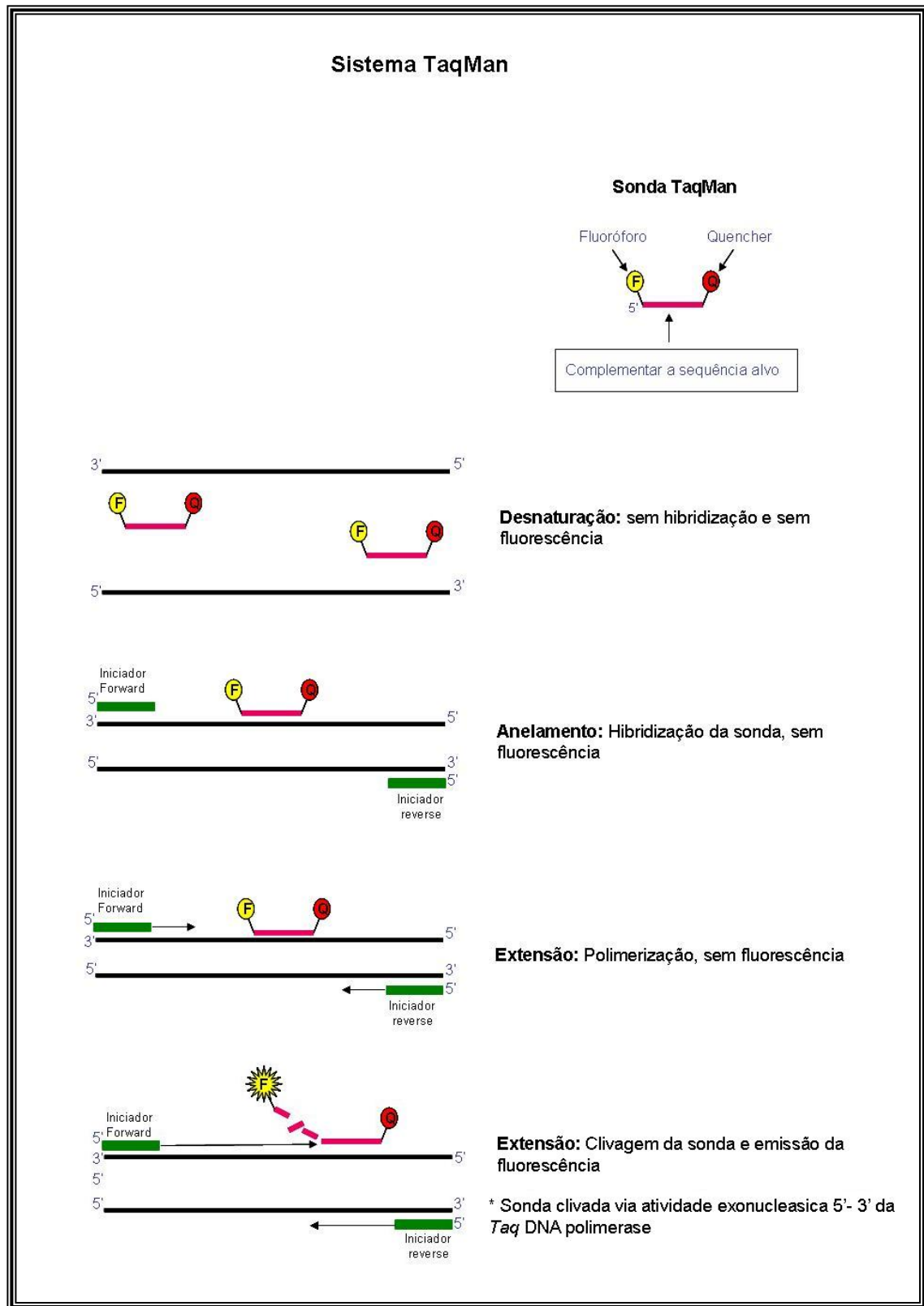


Figura 9: PCR em tempo real com sonda TaqMan demonstrando as etapas de desnaturação, anelamento e extensão

Molecular beacons são oligonucleotídeos usados como sondas de fita simples que formam uma estrutura secundária entre as extremidades 5' e 3', chamada de *haste-e-loop*. O *Loop* contém uma sequência complementar à sequência-alvo e a haste é formada pelo anelamento das sequências complementares que estão localizadas nas extremidades. Um fluoróforo é ligado no final de uma extremidade e um *quencher* é ligado na outra extremidade. Os oligonucleotídeos *molecular beacons* não emitem fluorescência quando estão livres em solução. Entretanto, quando hibridiza com a fita de DNA contendo a sequência-alvo, as sondas assumem uma mudança conformacional tornando-a capaz de emitir fluorescência. Na ausência de alvos, os oligonucleotídeos não emitem fluorescência pois o *quencher* está próximo ao fluoróforo captando energia. No momento em que o *molecular beacons* encontra o seu alvo, ocorre hibridização resultando em uma reorganização conformacional, onde o fluoróforo se dissocia do *quencher*, emitindo assim a fluorescência (Figura 10) (Angel *et al.*, 2006). Os *molecular beacons* podem ser sintetizados com diferentes cores de fluoróforos, possibilitando ensaios que necessitam detectar diferentes alvos em uma mesma reação. São altamente específicos permitindo discriminar sequências-alvo que diferem entre si por apenas um nucleotídeo substituído (El-Hajj *et al.*, 2009)

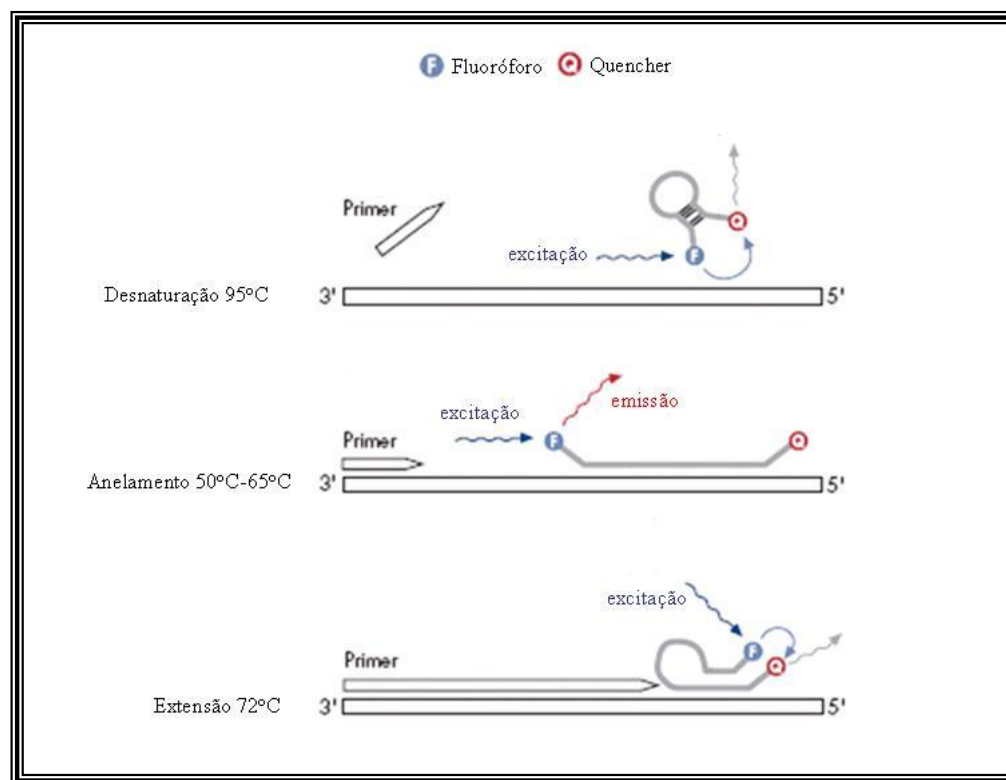


Figura 10: PCR em tempo real com *Molecular beacons* demonstrando as etapas de desnaturação, anelamento e extensão. Fonte: Center for medical research (2008).

2.5. RT-qPCR (RT-PCR quantitativo em tempo real)

A RT-qPCR (transcrição reversa seguida da PCR quantitativa) é uma técnica utilizada para analisar mRNA derivados de várias fontes (Freeman *et al.*, 1999, Bustin, 2002). Nesta técnica, utiliza-se a enzima transcriptase reversa para converter a amostra de mRNA em cDNA antes da etapa de amplificação por qPCR (Novais & Pires-Alves, 2004). RT-qPCR é altamente sensível e permite a quantificação de transcritos raros e de pequenas mudanças na expressão dos genes (Bustin *et al.*, 2005). Vários fatores têm contribuído para a transformação desta tecnologia em uma importante ferramenta de investigação: é um ensaio homogêneo que evita a necessidade de processamento pós-PCR; permite comparações simples entre mRNAs que diferem amplamente em sua abundância e a análise quantitativa bem como qualitativa do potencial da PCR (Ginzinger, 2002). O foco recente na quantificação do ácido nucléico, juntamente com a introdução de uma instrumentação de segunda geração e uma química alternativa, facilitou a migração desta tecnologia para laboratórios de investigação individuais, o que resultou na sua extensiva aplicação nos estudos genômicos, medicina molecular, virologia, microbiologia e biotecnologia, entre outras (Bustin *et al.*, 2005). Esta técnica é aplicada em diferentes espécies de fungos, tais como: *Pyrenophora teres* (Dilger *et al.*, 2003), *Candida albicans* (Toyoda *et al.*, 2004), *Aspergillus flavus* (Chang & Yu, 2004), *Metarhizium anisopliae* (Fang & Bidochka, 2006), *Beauveria bassiana* (Pathan *et al.*, 2007).

A transcriptase reversa é uma enzima de origem viral que tem a capacidade de produzir uma molécula de DNA dupla fita a partir da cópia de uma molécula de mRNA. Ou seja, a transcriptase reversa faz o caminho contrário daquele percorrido pela RNA polimerase, que a partir de uma molécula dupla fita de DNA produz RNA (Novais & Pires-Alves, 2004). A molécula de DNA produzida pela transcriptase reversa é chamada de DNA complementar (ou cDNA) e é formada pelos mesmos compostos encontrados na molécula de DNA (açúcar desoxirribose, grupos fosfato, ponte de hidrogênio e as 4 bases nitrogenadas, adenina, timina, guanina e citosina). A descoberta desta enzima viral e de seu mecanismo de ação abriu um importante caminho na biologia molecular. A molécula de RNA é extremamente instável e, dependendo do RNA em questão, o número de cópias pode estar muito reduzido. Deste modo, a possibilidade de se trabalhar com moléculas de cDNA ao invés de RNA tem facilitado muito o trabalho do cientista no laboratório. O cDNA é uma molécula estável, de fácil manuseio e sua multiplicação é bastante simples (Ginzinger, 2002).

O passo, aparentemente pequeno, de converter o RNA em uma molécula de cDNA molde é um importante contribuinte para evitar a variabilidade e a falta de reprodutibilidade frequentemente observados nos experimentos de RT-qPCR (Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia de Polimerase) (Bustin *et al.*, 2005). Existem várias razões para isso: primeiramente, o estado dinâmico de células torna inevitável que haja uma variação inerente no RNA preparado a partir das amostras biológicas; em segundo lugar, o RNA purificado pode ser de qualidade variável e, uma vez extraído, é bastante instável; em terceiro lugar, a eficiência da conversão do RNA para o cDNA é dependente da abundância do molde, isto é, significativamente mais baixo quando os moldes alvo são raros (Karrer *et al.*, 1995) e afetados negativamente por ácido nucléico não-específico presente na reação de transcrição reversa (Curry *et al.*, 2002; Stahlberg *et al.*, 2004b). O cDNA pode ser sintetizado utilizando os iniciadores arbitrários (*random primers*), oligo-dT, iniciadores específicos do gene-alvo ou uma combinação de oligo-dT e iniciadores.

Cerca de 30% da síntese de cDNA nos ensaios de RT-PCR em tempo real é realizada utilizando iniciadores arbitrários. A maioria do cDNA sintetizado a partir do RNA total é derivado do RNA ribossômico (rRNA) e isto pode criar problemas se o mRNA alvo de interesse estiver presente em baixos níveis, pois este não pode ser sintetizado proporcionalmente e sua amplificação subsequente poderá não ser quantitativa. Os *primers* aleatórios podem superestimar o número de cópias do mRNA em até 19 vezes quando comparado com o *primer* de sequência específica (Zhang & Byrne, 1999).

Oligo-dT é usado em aproximadamente 40% dos ensaios de RT-PCR em tempo real. É mais específico que os *primers* arbitrários e é um método muito utilizado, quando o objetivo é obter uma representação fiel do cDNA a partir do mRNA. Também é a escolha mais adequada quando o objetivo é amplificar vários mRNAs alvos de uma amostra limitada de RNA (Bustini, 2002).

Os *primers* alvo-específicos são utilizados em aproximadamente 20% das reações de RT-PCR. A sua utilização resulta na síntese do cDNA mais específico e pode fornecer maior sensibilidade às análises quantitativas (Lekanne-Deprez *et al.*, 2002). A principal desvantagem deste método é que ele requer reações distintas para cada alvo e portanto não é possível voltar para a mesma preparação e amplificar outros alvos numa fase posterior. Isto também é inútil se estiverem disponíveis apenas quantidades limitadas de RNA. Embora seja possível amplificar mais de um alvo em um único tubo de reação (*multiplex*) (Wittwer *et al.*, 2001), isto não é trivial e requer cuidado experimental e otimização das condições da reação se dados quantitativos são esperados para ter um reflexo rigoroso dos níveis do mRNA alvo.

A abundância do alvo também pode influenciar na escolha do *primer* mais adequado no passo da transcrição reversa (RT). Por exemplo, RT utilizando, *primers* específicos pode ser adequada para um alvo em grande abundância, mas *primer* aleatório pode ser melhor se o alvo estiver presente em número de cópia muito baixo (Bustin *et al.*, 2005).

Independentemente de qual método seja usado para a síntese de cDNA, a etapa de PCR requer *primers* específicos para alvo. A quantificação precisa requer conjuntos de *primers* que facilitam a máxima eficiência da amplificação. Geralmente é necessário desenhar, sintetizar e validar diferentes pares de *primers* até que seja obtido um conjunto que não gere dímeros e resulte em quase 100% de eficiência de amplificação. Os *primers* são melhores avaliados utilizando SYBR Green-I e a análise da curva de *melting* (Bustin *et al.*, 2005). Em resumo, cada um dos métodos usados para gerar cDNA diferem significativamente no que diz respeito à especificidade da produtividade e variedade do cDNA (Stahlberg *et al.*, 2004a).

Duas estratégias para a quantificação podem ser utilizadas: uma quantificação baseada na expressão absoluta e outra baseada na expressão relativa. Na quantificação absoluta, o número de cópias do transcrito por tubo é determinado por comparação da curva de calibração externa ou interna apropriada (Morrison *et al.*, 1998; Pfaffel *et al.*, 2002). Já a quantificação relativa é a mais adequada para se investigar mudanças fisiológicas aos níveis de expressão do gene e é baseada na razão entre a expressão do gene alvo *versus* um gene de referência. As tendências podem ser melhores desvendadas por quantificação relativa, mas os resultados dependem dos procedimentos usados de normalização (Pfaffel, 2001; Savli *et al.*, 2003).

Apesar da técnica de RT-qPCR ser amplamente utilizada para quantificar, matematicamente mudanças relevantes nos níveis de mRNA, existe um certo número de problemas associados à sua utilização. Estes incluem a variabilidade inerente do RNA, a variabilidade dos protocolos de extração e diferentes transcrições reversas e a eficiência da PCR (Bustin *et al.*, 2004). Consequentemente será necessário escolher um método de normalização para controlar esse erro. Diferentes estratégias foram propostas para normalizar os dados obtidos pela técnica de RT-qPCR (Dheda *et al.*, 2004). No entanto, na teoria, o uso do controle endógeno é a solução mais adequada para o problema de normalização (Bustin *et al.*, 2005). O controle endógeno inclui comumente o uso de um único gene de referência que é considerado ser expresso constitutivamente (Thellin *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2000; Toyoda *et al.*, 2004).

Genes de referência são considerados aqueles que estão envolvidos em processos celulares básicos e, supostamente, apresentam um perfil de expressão uniforme em diferentes tratamentos, tecidos e órgãos (Remans *et al.*, 2008). Os genes de referência mais comumente utilizados incluem β -actina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HPRT) e 18S do RNA ribossomal. Eles foram usados como referência por muitos anos em ensaios de *Northern blot* e RT-PCR convencional. A sua utilização foi aceitável para estas técnicas, por elas serem qualitativas. No entanto, o advento da PCR em tempo real colocou em ênfase mudanças quantitativas, resultando em uma reavaliação da utilização desses genes de referências. Porém isto não é feito e nos estudos moleculares se continua a utilizar arbitrariamente genes “clássicos” de referências para esse objetivo (Huggett *et al.*, 2005).

A síntese de mRNA desses genes é considerada estável e segura em vários tecidos (Marten *et al.*, 1994; Thellin *et al.*, 1999). Mas inúmeros estudos mostraram que os genes de referência são regulados em muitas condições experimentais (Zhang & Snyder, 1992; Bhatia *et al.*, 1994). Vários modelos abordam o método mais adequado para a normalização dos resultados existentes (Pfaffel, 2001; Pfaffel *et al.*, 2002; Vandesompele *et al.*, 2002; Akilesh *et al.*, 2003, Szabo *et al.*, 2004). Cada método de normalização é aplicável para cada condição experimental e cabe aos investigadores identificar e validar o método mais adequado, para ser utilizado em seus experimentos.

Atualmente RT-qPCR é considerada a melhor técnica para a análise da expressão gênica e muito utilizada em vários estudos (Bernard & Wittwer, 2002; van den Berg *et al.*, 2007; Bustin *et al.*, 2009). Esta popularidade é refletida no grande número de publicações relatando dados de qPCR, que usam diversos reagentes, protocolos, métodos de análise e formato de relatórios sem detalhes experimentais. Esta notável falta de consenso dificulta saber qual é a melhor forma de interpretar e realizar experimentos de qPCR (Bustin & Nolan, 2004). Recentemente foi criado um documento o MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) que fornece aos autores, revisores e editores, especificações para o mínimo de informações que devem ser comunicadas para uma experiência de qPCR, garantindo assim maior confiabilidade dos resultados, para ajudar a assegurar a integridade da literatura científica, promover a coerência entre os laboratórios e aumentar a transparência experiemntal (Bustin *et al.*, 2009).

3. EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ENVOLVIDOS NA ENTOMOPATOGENICIDADE DE *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* E *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*¹

RESUMO

A análise das expressões de genes envolvidos na germinação, conidiogênese e patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* durante seus estágios de vida sapróbios e patogênicos é um importante passo para aumentar a sua eficácia como agente de controle biológico. Utilizando a técnica de RT-qPCR a expressão relativa do gene regulador da sinalização proteína G, envolvido na conidiogênese (*cag8*) e do gene regulador da resposta ao nitrogênio *nrr1* foram quantificadas e comparações foram feitas entre duas variedades de *M. anisopliae*: *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum*, durante a germinação, conidiogênese e em diferentes fases de patogênese. Em ambas, a expressão diferencial dos genes analisados foi observada ao longo das diferentes fases de desenvolvimento; i) o gene *cag8* foi reprimido durante a germinação e induzido durante o desenvolvimento conidial e na patogênese, ii) o gene *nrr1* foi induzido durante a germinação, conidiogênese e patogênese. Considerando as diferenças entre as duas variedades, ambos os genes foram mais expressos em *M. anisopliae* var. *anisopliae*, sugerindo que as diferenças na patogenicidade poderão estar correlacionadas, com a capacidade de ativar a expressão de genes, em determinados ambientes e hospedeiros.

Palavras-Chave: biocontrol, entomopatogênico, quantitativo RT-PCR, gene de patogenicidade

¹ Trabalho aceito para publicação: Carneiro-Leão, M.P., Andreote, F.D., Araújo, W.L., Oliveira, N.T. 2011. Expressão diferencial de genes envolvidos na entomopatogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Genetics and Molecular Research*.

1.INTRODUÇÃO

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* pode infectar cerca de 200 espécies de mais de 50 famílias de insetos (Roberts & Humber, 1981) e é utilizado mundialmente como agente de controle biológico de vários insetos praga. Suas vantagens sobre pesticidas químicos incluem a alta especificidade ao inseto, baixa toxicidade para outros organismos e baixo impacto ambiental (Miller *et al.*, 1983). Além disso, devido aos seus processos de desenvolvimento múltiplo de infecção, a resistência dos insetos à *M. anisopliae* é menos provável, ou se desenvolve mais lentamente do que a resistência aos inseticidas químicos (He & Xia, 2008). No entanto, sua utilização tem sido limitada devido ao seu ritmo relativamente lento para matar, quando comparado aos inseticidas químicos (St Leger *et al.*, 1996a).

M. anisopliae é um organismo com estágios de vida safróbico e patogênico (Roberts e Humber, 1981). Os mecanismos morfológicos, citológicos e bioquímicos envolvidos nessas duas fases de vida são relativamente bem compreendidos. No entanto, as tentativas de melhorar a eficácia dos fungos entomopatogênicos também requer uma compreensão clara ao nível molecular (Wang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007b). Em particular, os passos moleculares envolvidos na fixação no hospedeiro e na penetração da cutícula são cruciais para o estabelecimento da infecção e são muito atraentes em termos científicos (Roberts & Humber, 1981, Wang *et al.*, 2008). Vários genes de *M. anisopliae* implicados na patogênese e em outros estágios de desenvolvimento foram clonados e caracterizados (St. Leger *et al.*, 1992, St Leger *et al.*, 1992b, Bogo *et al.*, 1998, Joshi & St Leger, 1999, Screen *et al.*, 2001, Baratto *et al.*, 2006, He & Xia, 2008). Assim, um estudo detalhado sobre o sincronismo da expressão destes genes é fundamental para elucidar a sua contribuição na adaptação do fungo como safróbico e patógeno.

Neste trabalho foi demonstrado que os genes *cag8* (regulador de sinalização da proteína G) e *nrr1* (regulador da resposta ao nitrogênio) são diferencialmente expressos em *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum*. É provável que essa diferença na expressão permita que *M. anisopliae* possa responder de forma flexível às condições adversas e se adapte aos diferentes ambientes e hospedeiros.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Metarhizium anisopliae var. *anisopliae* URM4921, isolado de *Mahanarva posticata* e *M. anisopliae* var. *acridum* URM4412, isolado de *Austracnis guttulosa* foram fornecidos pela Micoteca (URM) do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. As culturas fúngicas foram crescidas em Batata-Dextrose-Ágar a 28°C por 12 dias para a obtenção dos conídios.

2.2. Preparação do material biológico para o estudo da expressão gênica durante a germinação

Os conídios foram transferidos para uma solução de 0,01% v/v Tween 80 e em seguida a suspensão foi filtrada, em lâ de vidro para a remoção do micélio. Uma concentração de 2×10^8 conídios/ml foi inoculada em meio YPD (0,2% de extrato de levedura, 1% peptona e 2% dextrose). Os conídios foram coletados por centrifugação com 8h (conídio não germinado), 10h, 12h e 14h (conídio germinado) após a inoculação, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos por 24 horas a -80°C para posterior extração do RNA. Duas repetições biológicas foram utilizadas para cada hora analisada. A germinação foi monitorada microscopicamente.

2.3. Preparação do material biológico para o estudo da expressão gênica durante a conidiogênese

Os conídios foram transferidos em uma solução de 0,01% v/v Tween 80, em seguida a suspensão foi filtrada com em lâ de vidro para a remoção do micélio. Uma concentração de 2×10^7 conídios/ml foi espalhada em celofane (0.5µm poro) em YPD ágar (0,2% de extrato de levedura, 1% pepton, 2% dextrose e 15% de ágar). Raspados da placa de Petri, os micélios foram coletados com 24h (crescimento micelial), 48h, 72h (conidióforo com poucos conídios) e 96h (conidióforos com um grande número de conídios) após a inoculação, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos por 24 horas a -80° C para posterior extração de RNA. Duas repetições biológicas foram utilizadas para cada hora analisada. A conidiogênese foi monitorada microscopicamente.

2.4. Preparação do material biológico para estudo da expressão gênica durante a patogênese

Larvas de terceiro instar de *Diatraea saccharalis* (Broca da cana-de açúcar) foram infectadas por imersão por 1min. em uma suspensão de 2×10^8 conídios/ml. Os insetos coletados com 20h após a infecção, inseto infectado morto, inseto com pouco micélio emergindo, inseto mumificado com conídios e o inseto não infectado foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos por 24 horas a -80°C para posterior extração do RNA. Duas repetições biológicas foram utilizadas para cada fase analisada.

2.5. Extração do RNA total e Síntese de cDNA

O RNA total foi isolado a partir de conídios, dos micélios e insetos descritos acima. As amostras congeladas foram maceradas com N2 líquido. Para cada amostra, 100-150 mg de amostra em pó foi colocado em tubos de 2ml refrigerado. As amostras de RNA foram extraídas com o reagente Trizol (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. RNA foi suspenso em 50µl de água tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato). A pureza do RNA total extraído foi determinada como a relação 260/280nm e a integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA residual foi removido tratando o RNA com DNase I livre de Rnase, conforme as instruções do fabricante (Deoxyribonuclease I, Invitrogen). O RNA foi estocado a -80°C até a sua utilização. Uma porção de 2µg dos RNAs tratados com Dnase foi transcrito em cDNA, utilizando o Kit SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) e *primers* oligo-dT (Invitrogen).

2.6. Análise do quantitativo PCR em tempo real

Para se obter produtos de qPCR foi utilizado o Kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). Para cada reação de qPCR de 25 µl foram adicionados 12.5µl do qPCR SuperMix-UDG Kit (Invitrogen), 0,5µl de MgCl_2 (50mM), 0.1 µl de cada *primer* senso e anti-senso (100µM) (Beoneer), 10.8 µl de água livre de nuclease e 1 µl cDNA (20 ng/ml of cDNA para todos os genes). Foram incluídos os controles negativos (sem DNA molde) para cada conjunto de *primer* em cada corrida para garantir que não houve contaminação. Foram estabelecidos dois tubos de reação para cada repetição biológica. A reação foi realizada com o *iCycler system* (Bio-rad) com a seguinte programação: uma desnaturação inicial de 95°C por 1 min. e 50 seg. seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg.,

anelamento a 60°C por 30 seg. e extensão a 72°C por 30 seg. Após as amplificações, a especificidade de cada conjunto de *primers* foi avaliada por meio da análise de curvas de desnaturação (*melting curve*). Em todos os experimentos, as curvas de desnaturação foi realizada de 72°C a 96°C para verificar a especificidade da amplificação, detectada pela presença de um único produto de amplificação. Todas as amplificações foram realizadas em duplicatas, sendo as médias dos valores utilizadas para a análise final.

O gene de referência utilizado foi o *try* (envolvido na biosíntese do triptofano) (Fang & Bidochka, 2006). A sua escolha foi baseada na expressão constitutiva do gene, com valores de Cq similares em todas as amostras de cDNA analisadas. Os genes testados foram *cag8* e *nrr1*, os quais foram investigados durante a germinação, conidiogênese e patogenicidade em *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum*. Os métodos utilizados para a quantificação foram baseados em artigos anteriores; gene *cag8* (um regulador da proteína G via de sinalização envolvidos na conidiogênese) (Fang *et al.*, 2007) e o gene *nrr1* (um regulador da resposta ao nitrogênio) (Screen *et al.*, 1998). Os *primers* para os genes e os comprimentos dos produtos de PCR amplificados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência dos *primers* dos genes estudados e comprimento dos produtos de PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Número no Gen Bank	Comprimento dos produtos de PCR (pb)
<i>try</i>	TTGCAATGCATGTTTGATGTC	CAAAGAGTGGTATCGAGTTAC	AY245100	174
<i>cag8</i>	AAGCTGATGGCTAGCGATTC	TTGCGGTTGGAACGACTTTG	DQ826044	128
<i>nrr1</i>	ACTATTGATGAGCGTCGTAAC	TGCGTCGTTGTCCATGAAG	AJ006468	222

2.7. Quantificação relativa da expressão dos genes

A geração dos dados quantitativos por PCR em tempo-real é baseada no número de ciclos requeridos para a amplificação ideal gerando fluorescência para atingir um determinado limiar de detecção (Bustin *et al.*, 2009). A expressão relativa foi calculada por um modelo matemático no qual se inclui uma correção da eficiência da PCR em tempo real das transcrições individuais (Pfaffl, 2001). As eficiências das amplificações por PCR em tempo real (E) foram determinadas para cada conjunto de *primers*, pela inclinação de um modelo de regressão linear (Pfaffl, 2001) e obtidas a partir de diluições das amostras dos cDNA em um

intervalo de 50, 25, 5, 1 e 0,25ng/ml. A inclinação das curvas foi utilizada para determinar a eficiência da reação de acordo com a equação: $E = 10^{-1/[\text{slope}]}$.

Durante a germinação, o valor do Cq dos conídios coletados com 8h foi utilizado como tratamento controle e o valor do Cq dos conídios coletados com 10h, 12h e 14h foram utilizados como tratamentos das amostras. Durante a conidiogênese o valor do Cq do micélio coletado com 24h foi utilizado como tratamento controle e o valor do Cq do micélio coletado com 48h, 72h e 96h foram utilizados como tratamentos das amostras. Similarmente, durante a patogenicidade, o valor do Cq do inseto com 20h após a infecção foi utilizado como tratamento controle e o valor do Cq do inseto morto, inseto com micélio emergindo do inseto e o inseto completamente coberto com micélio foram utilizados como tratamentos das amostras.

Após calcular os valores de R de cada repetição biológica, a expressão relativa dos genes de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* foi apresentada como Log₂ R. Desta forma, correlacionou-se diretamente e numericamente os valores com o fato da indução ou da repressão da expressão gênica. Assim, a partir do nível zero de expressão, os genes analisados podem ser relativamente induzidos (valores positivos) ou reprimidos (valores negativos). Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do *software* Assistat 7.4 Beta (Silva & Azevedo, 2002).

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

Neste estudo foram coletadas informações, que fornecem uma melhor compreensão do papel dos genes *cag8* e *nrr1* implicados pela expressão diferencial durante a adaptação de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum*, como sapróbios e patogênicos. De acordo com a curva padrão² obtida a partir da inclinação das diluições de cada gene avaliado, as eficiências (E) da qPCR variaram entre 98% a 108% e os valores do coeficiente de regressão (R^2) variaram entre 0,981 e 0,994 (Tabela 2). As análises da curva de desnaturação (*melting curves*)³ mostraram a especificidade dos *primers*, com picos únicos para as amplificações com cada conjunto de *primers*. Estes resultados suportam a fidelidade na representação da expressão dos genes alvo em diferentes condições ambientais.

Tabela 2: Valores de E e R^2 obtidos a partir das diluições dos genes alvos e de referência de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

Genes	Valor de E (%)		Valor de R^2	
	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>
<i>cag8</i>	98%	98%	0,994	0,994
<i>nrr1</i>	105,4%	103,5%	0,994	0,995
<i>try</i>	108%	98%	0,981	0,994

O gene *cag8* atua regulando a via de sinalização da proteína G na superfície conidial e, portanto, está envolvido na interação com a camada lipídica da superfície do hospedeiro, promovendo a adesão dos conídios na cutícula do inseto por meio de mecanismos hidrofóbicos (Boucias *et al.*, 1988; Hamm, 1998). Em *M. anisopliae*, este gene desempenha um papel de regulação, na produção de conídios, virulência e síntese de hidrofobina (Fang *et al.*, 2007). Corroborando esses achados, observou-se a expressão diferencial desse gene em *M. anisopliae* var. *anisopliae* e em *M. anisopliae* var. *acridum* durante a germinação, conidiogênese e patogenicidade. A 10h, 12 e 14h de germinação, a expressão do gene *cag8* foi diferencialmente reprimida quando comparado com 8h (conídios não germinados) em *M. anisopliae* var. *anisopliae* e em *M. anisopliae* var. *acridum*. Em *M. anisopliae* var. *anisopliae*,

² Curvas padrão dos genes *cag8*, *try* e *nrr1* de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* apresentadas nas figuras A6; A7; A8 do apêndice, pag. 92-93.

³ Curvas de desnaturação dos genes *cag8*, *nrr1* e *try* durante a germinação, conidiogênese e patogênese de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* apresentadas nas figuras A1; A2; A3; A4 do apêndice, pag. 89-90

diferença significativa foi observada apenas com 14h, enquanto que em *M. anisopliae* var. *acridum* a expressão foi diferencialmente reprimida em todas as horas analisadas (Figura 1).

As diferenças também foram encontradas na expressão desse gene durante a conidiogênese. Após 48h, 72h e 96h de conidiogênese, *cag8* foi induzido quando comparado com 24h (crescimento micelial) em ambas as variedades. Em *M. anisopliae* var. *anisopliae* foram observadas diferenças significativas em todas as horas analisadas. No entanto, em *M. anisopliae* var. *acridum*, diferença estatística foi observada somente em 96 horas. Ao comparar as duas variedades, houve diferenças significativas com maior indução de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Figura 1).

Durante as fases de patogenicidade, tanto *M. anisopliae* var. *anisopliae* quanto *M. anisopliae* var. *acridum* apresentaram níveis significativamente diferentes de indução quando comparados com 20h após a infecção, com uma tendência semelhante à observada durante a conidiogênese. Em ambas as variedades, maior indução foi observada no inseto coberto de conídios (estágio de conidiogênese) e menor no inseto morto. Ao comparar as duas variedades, *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou maior indução (Figura 1).

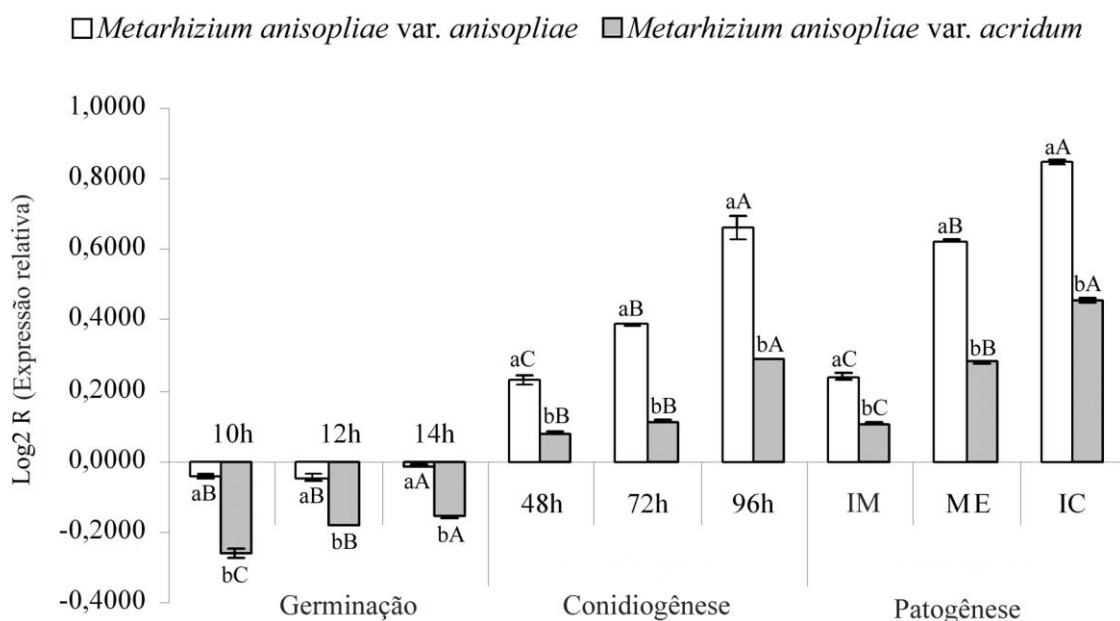


Figura 1. Nível de expressão relativa do gene *cag8*, durante a germinação, conidiogênese e patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. IM (inseto morto), ME (micélio emergindo do inseto cadáver), IC (Inseto completamente coberto com conídios). Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, letras minúsculas representam diferenças entre os isolados e letras maiúsculas representam as diferenças entre as horas para cada isolado.

A repressão desse gene durante a germinação e indução durante a conidiogênese, bem como nas fases de conidiogênese da patogênese, reforça a associação entre *cag8* e a conidiogênese. O conídio é a estrutura de propagação que está envolvida na transmissão da doença (Fang *et al.*, 2007). Assim, uma compreensão ao nível de expressão de genes envolvidos na conidiogênese é um passo importante para o desenvolvimento comercial e a melhoria desses fungos como biocontroladores. Os resultados mostram que *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou maior expressão desse gene durante o processo de patogenicidade. Lima (2005) observou que *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou maior potencial patogênico sobre *D. saccharalis* do que *M. anisopliae* var. *acridum*. Fang *et al.* (2007) analisaram uma linhagem mutante de *M. anisopliae* com perda da função do gene *cag8* e observaram uma diminuição da virulência em *Galleria mellonella*. Assim, os resultados alcançados sugerem que as variedades de *M. anisopliae* que tenham maior expressão desse gene, possam mostrar uma maior virulência, de acordo com o hospedeiro.

Outro gene analisado neste trabalho está relacionado com o processamento do nitrogênio pelos fungos. Os fungos mostram um elaborado mecanismo de controle de nitrogênio para promover o seu abastecimento constante durante as distintas diferenciações, bem como durante o processo de patogêneses. Estudos tem apontado para o fato de que mesmo os genes que codificam moléculas regulatórias ou aqueles que estão envolvidos no crescimento e secreção, também devam ser considerado de patogenicidade, uma vez que podem desempenhar funções importantes, durante o processo de adaptação à cutícula de vários insetos (Casadevall & Pirofski, 2001; Freimoser *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005).

O gene regulador da resposta ao nitrogênio *nrr1* tem demonstrado ser importante na patogenicidade de *M. anisopliae* (Screen *et al.*, 1998) uma vez que várias enzimas envolvidas na penetração da cutícula do inseto também são reguladas em resposta à disponibilidade de nitrogênio (St. Leger *et al.*, 1997). Os resultados mostraram que *nrr1* foi constitutivamente induzido a 10h, 12h e 14h da germinação, quando comparado com 8h (conídios não germinados), a 48h, 72h e 96h da conidiogênese, quando comparado com 20h (crescimento micelial) e durante os estágios da patogenicidade, quando comparado com o inseto com 20 horas, após a infecção. No entanto não foi observada interação entre as variedades e as horas de germinação ($F = 4.3607$, $p = 0.0677$), conidiogênese ($F = 3.3102$, $p > 0.10000$) e patogênese ($F = 1.166$, $p > 0.10000$) (Figura 2).

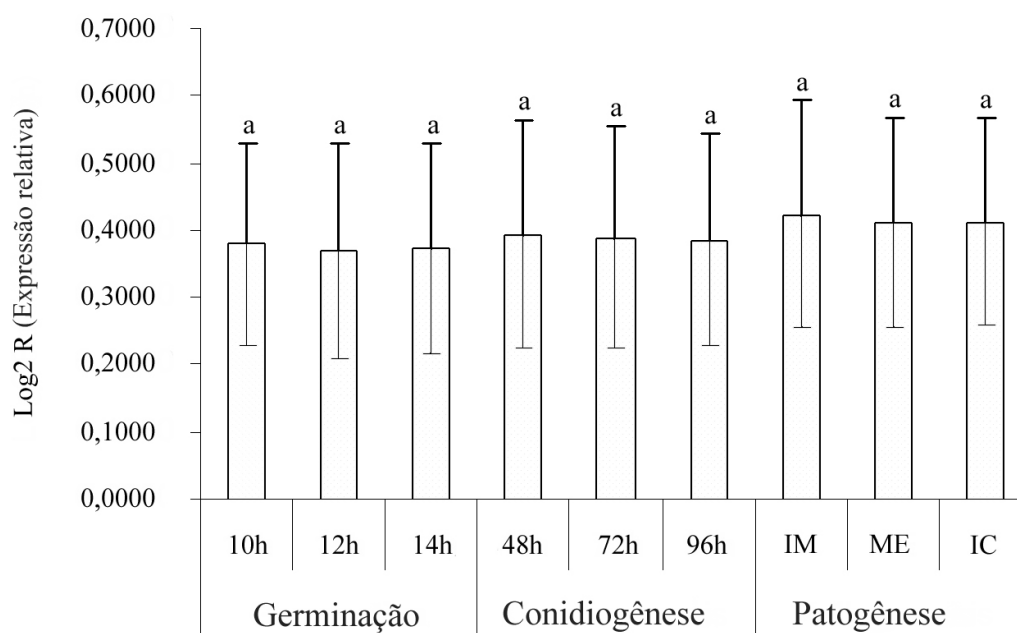


Figura 2. Nível de expressão relativa do gene *nrr1* durante a germinação, conidiogênese e patogenicidade. Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi observada diferença significativa para os três estágios de desenvolvimento somente quando analisadas as duas variedades, com maior expressão em *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Figura 3), o que pode estar relacionado à sua alta virulência contra *D. saccharalis*, uma vez que a síntese de enzimas envolvidas na penetração de *M. anisopliae* em artrópodes é regulada em resposta à disponibilidade de nitrogênio. A expressão constitutiva desse gene em YPD líquido ou ágar e no inseto sugere que esse gene possa mediar a ativação catabólica do nitrogênio. Fang & Bidochka (2006) também observaram a expressão constitutiva do gene durante a germinação, conidiogênese e patogenicidade de *M. anisopliae*, após infecção no inseto *Galleria mellonella*.

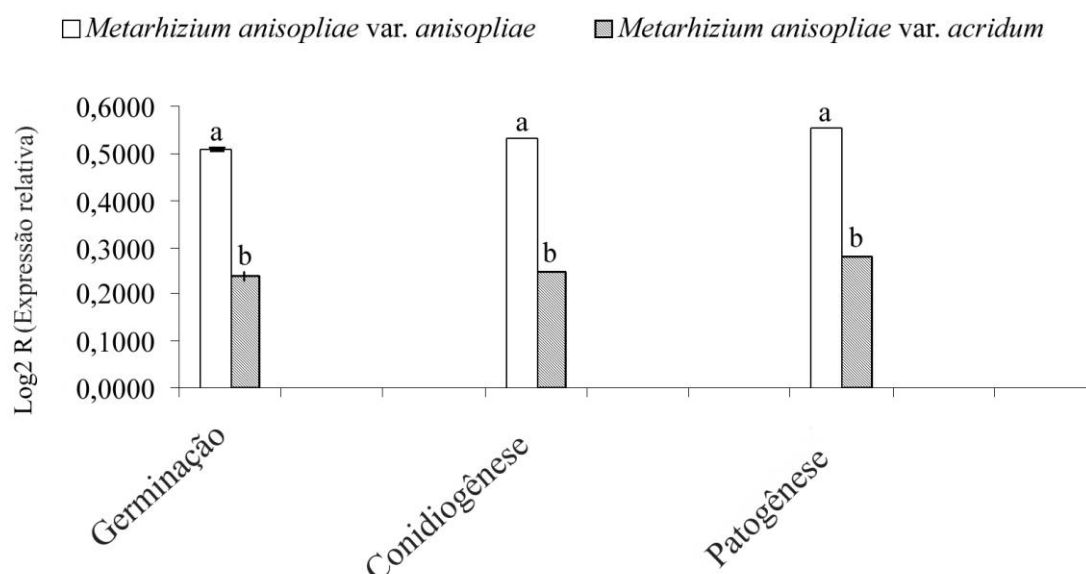


Figura 3. Nível de expressão relativa do gene *nrr1* durante a germinação, conidiogênese e patogenicidade em *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e em *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* independentemente do tempo. Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Os entomopatógenos *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* apresentam fases de vida sapróbia e parasita. No entanto, *M. anisopliae* var. *anisopliae* é um patógeno cosmopolita e relatos mostram que ataca cerca de 200 espécies de insetos (Samuels *et al.*, 1989). Em contraste, *M. anisopliae* var. *acridum* apresenta menos plasticidade em suas respostas fisiológicas, apresentando um alcance mais limitado aos insetos, com preferências para Acrididae (gafanhotos e grilos) (Inglis *et al.*, 2001). Assim, uma melhor estimativa de determinantes da patogenicidade de *M. anisopliae* deva ser obtida por meio de estudos de diferentes variedades (St Leger *et al.*, 1988; St Leger *et al.*, 1992b; St Leger *et al.*, 1996a; Freimoser *et al.*, 2003). Esta plasticidade exibida pode ser atribuída não apenas à presença de regiões genômicas específicas e genes, mas também à expressão diferencial de genes nos fungos, modulando sua capacidade de responder aos estímulos ambientais. Identificar genes que são reprimidos ou induzidos em resposta a um determinado inseto ou uma condição de crescimento certamente irá contribuir para o conhecimento sobre os mecanismos genéticos envolvidos na especificidade do hospedeiro e na adaptação (Pathan *et al.*, 2007). Corroborando esses achados, os resultados mostraram claras diferenças na expressão de genes

analisados durante a germinação, conidiogênese e patogenicidade entre *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum*, observando as expressões maiores dos genes *cag8* e *nrr1* em *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Além disso, também foi demonstrado que estas variedades usam diferentes estratégias para infectarem diversos grupos de insetos e se adaptarem aos diferentes ambientes. Esse conhecimento da expressão diferencial de genes ajuda a elucidar os mecanismos moleculares associados com a versatilidade metabólica de *M. anisopliae*, representando uma importante ferramenta para programas de melhoramento genético de linhagens utilizadas no controle biológico de pragas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. David Bousfield pela leitura crítica deste manuscrito e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

4. EXPRESSÃO DO GENE *pr1A* DURANTE O CRESCIMENTO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO E DURANTE O PROCESSO PATOGENICO EM *Metarhizium anisopliae*⁴

RESUMO

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* possui vários genes com expressão diferenciada em resposta a diferentes condições de crescimento e identificá-los poderá fornecer dados à compreensão de como este fungo é capaz de infectar uma ampla variedade de insetos e adaptar-se aos diferentes tipos de substratos. O gene *pr1A*, que codifica a protease tipo subtilisina envolvida na patogênese, vem sendo alvo de pesquisas voltadas para o melhoramento genético de linhagens utilizadas no controle biológico. Neste estudo, utilizou-se a técnica de RT-qPCR para investigar a expressão do gene *pr1A*, em *M. anisopliae* var. *anisopliae* e em *M. anisopliae* var. *acridum* durante o crescimento em diferentes condições de cultivo e durante o processo patogênico da broca-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*). Também foi realizado o teste de patogenicidade para avaliar a virulência de as ambas variedades contra *D. saccharalis* e correlacioná-las com o padrão de expressão do gene *pr1A*. As análises revelaram que em ambas as variedades, este gene foi diferencialmente expresso nas diferentes condições de cultivo e durante o processo patogênico. Considerando as diferenças entre as variedades, *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou maior expressão de *pr1A* em todas as condições analisadas bem como maior potencial para o controle biológico de *D. saccharalis*. Os resultados sugerem que essas variedades apresentam estratégias diferentes para adaptar-se a diferentes condições de crescimento.

Palavras-chave: entomopatógeno; *Diatraea saccharalis*, quantitativo RT-PCR; padrão de expressão

⁴ Trabalho a ser enviado à revista Word Journal Microbiology and Biotechnology: Carneiro-Leão, M.P., Tiago, P.V., Andreote, F.D., Araújo, W.L., Oliveira, N.T. Expressão do gene *pr1A* durante o crescimento em diferentes condições de cultivos e durante o processo patogênico em *Metarhizium anisopliae*.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos entomopatogênicos são utilizados no controle biológico de pragas como uma alternativa promissora aos defensivos agrícolas químicos, pois apresentam grandes vantagens quanto ao impacto ambiental, aos custos, à especificidade e ao desenvolvimento de resistência (Alves, 1998; Shah & Pell, 2003). *Metarhizium anisopliae* é o entomopatógeno melhor caracterizado e usado para o controle de diversas pragas (Frazzon *et al.*, 2000; Quesada-Moraga *et al.*, 2004; Lazzarini *et al.*, 2006; Scholte *et al.*, 2007). Este fungo é muito versátil sendo capaz de infectar uma ampla variedade de insetos, (Samuels *et al.*, 1989) e também de se adaptarem à vida na rizosfera de plantas (Hu & St. Leger, 2002). No entanto, ainda não está claro os mecanismos de adaptação a diferentes de crescimento, sendo que a falta de compreensão dos mecanismos moleculares e fisiológicos envolvidos nessa adaptação, que reduz a capacidade dos pesquisadores de desenvolver novas estratégias para melhorar a sua eficácia no controle biológico de pragas (Wang *et al.*, 2005). Uma grande e diversificada gama de enzimas e toxinas foram descritas em vários estudos e acredita-se que elas são a chave para a capacidade deste fungo infectar diversos grupos de insetos e crescer em diferentes tipos de substratos (Bagga *et al.*, 2004; Dutra *et al.*, 2004; Freimoser *et al.*, 2003, 2005; Wang *et al.*, 2005). Dentre as enzimas, a protease subtilisina PR1A é a mais estudada e a mais predominantemente produzida durante a degradação da cutícula dos insetos (Bagga *et al.*, 2004). Assim, o gene codificador dessa proteína (*pr1A*) é visto como um provável candidato para o desenvolvimento de avançadas engenharias de biopesticidas (St. Leger *et al.*, 1996b).

Identificar genes que são regulados em resposta a um determinado hospedeiro ou a uma determinada condição de crescimento poderá aumentar a compreensão sobre os mecanismos genéticos envolvidos na especificidade do hospedeiro e adaptação (Pathan *et al.*, 2007). *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* foi relatado atacando mais de 200 espécie de insetos (Samuels *et al.*, 1989). Em contraste, *M. anisopliae* var. *acridum* que é menos plástico em suas respostas fisiológicas, apresentando um alcance mais limitado de insetos, sendo conhecido por atacar apenas espécies da ordem Orthoptera (Inglis *et al.*, 2001). Uma melhor estimativa dos determinantes dessa flexibilidade comportamental de *M. anisopliae* pode ser obtida através do estudo de diferentes variedades, contribuindo para o melhoramento voltado ao controle de insetos. Desta forma, foi analisada a expressão do gene *pr1A* que codifica a proteína PR1A em *M. anisopliae* var. *anisopliae* e em *M. anisopliae* var. *acridum* crescidos

em diferentes meios de culturas e durante o processo de infecção em *Diatraea saccharalis* (broca da cana-de-açúcar).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultura Fúngica

Metarhizium anisopliae var. *acridum* URM4412, isolado originalmente de *Austracnis guttulosa* e *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM4921, isolado originalmente de *Mahanarva posticata* foram fornecidas pela Micoteca (URM) do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. As culturas fúngicas foram crescidas em Batata-Dextrose-Ágar a 28°C por 12 dias para a obtenção dos conídios.

2.2. Condições de cultivo para análise da expressão do gene *pr1A*

A análise do padrão de expressão do gene *pr1A* foi realizada após o crescimento das duas variedades em meio YPD (0,2% de extrato de levedura, 1% peptona e 2% dextrose), em Meio Mínimo líquido (MM) (Pontecorvo *et al.*, 1953), sem glicose, suplementado com 1% de caseína, e no Meio Mínimo líquido, sem glicose, suplementado com 1% (w/v) de cutícula do inseto. Para a obtenção da cutícula, foram utilizadas larvas de terceiro instar de *D. saccharalis*. Os insetos foram desidratados em estufa a 80°C, dissecados, e o exoesqueleto foi macerado. O pó resultante foi peneirado e armazenado em freezer a -25°C. Para obtenção de suspensão de cutícula (1%), esta foi ressuspensa em uma solução aquosa de tetraborato de potássio (1%) e submetida a vapor fluente por 20 minutos (Andersen, 1980). Posteriormente, o substrato cuticular foi adicionado ao MM líquido previamente esterilizado.

Uma suspensão de 2×10^8 conídio/ml foi inoculada em 20mL dos meios de cultura acima citados e incubados em agitador orbital sob uma velocidade de 150 rpm, a 28°C. O micélio foi coletado por filtração, com 24h e 72h após a inoculação, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantido à -80°C por 24 horas para posterior extração do RNA total. Duas repetições biológicas foram estabelecidas para cada tempo de análise.

2.3. Preparação do inseto para análise da expressão do gene *pr1A*

Larvas de terceiro instar de *D. saccharalis* foram infectadas por imersão durante 1min. em uma suspensão de 2×10^8 conídios/ml e mantidas separadamente em placas de Petri com alimentação natural de colmo de cana de açúcar à 28°C. A patogênese fúngica foi dividida nas seguintes fases: inseto não infectado, inseto com 20h após a infecção, inseto infectado morto, inseto com pouco micélio emergindo e inseto completamente coberto por conídios. Os insetos coletados nas fases citadas acima foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos à -80°C por 24 horas para posterior extração do RNA total. Duas repetições biológicas foram estabelecidas para cada tempo de análise. Foram utilizados oito insetos por repetição biológica para cada isolado fúngico.

2.4. Extração do RNA total e síntese do cDNA

As amostras dos micélios crescidos nos diferentes meios de cultura e os insetos acima mencionados foram macerados usando nitrogênio líquido e o RNA total foi isolado com o reagente Trizol (Invitrogen®) conforme a indicação do fabricante. O RNA total foi suspenso em 50µl de água tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato) e esterilizada. A pureza do RNA total extraído foi determinada com a razão entre os valores de absorbância nos comprimentos de onda 260/280 nm e a integridade checada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Para a remoção do DNA residual foi utilizado DNase I conforme indicação do fabricante. (Deoxyribonuclease I, Invitrogen®). RNA total foi estocado a -80°C até o momento do uso. Do RNA total 2µg foi transcrito em cDNA usando o SuperScript™ First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen®) e *primers* oligo-dT (Invitrogen®).

2.5. RT-PCR quantitativo (RT-qPCR)

Para a obtenção dos produtos de qPCR foi usado o Kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen®). Para cada reação de qPCR de 25 µl foram utilizados 12,50 µl do qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen®), 0,50 µl de MgCl₂ (50mM), 0,10 µl de cada *primer* (concentração de 100µM), 10,80 µl de água esterilizada e 1 µl do cDNA (20ng/ ml). Duas amostras de controle negativo para cada conjunto de *primers* foram usadas em cada placa de reação de qPCR, para garantir que não houve contaminação. cDNA do inseto não infectado também foi utilizado para garantir que os *primers* não amplificaram o DNA do

inseto. Foram estabelecidos dois tubos de reação para cada repetição biológica. A reação foi realizada com o *iCycler system* (Bio-rad) com a seguinte programação: uma desnaturação inicial de 95°C por 1 min. e 50 seg., seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg., anelamento a 60°C por 30 seg. e extensão a 72°C por 30 seg. Após as amplificações, a especificidade de cada conjunto de *primers* foi avaliada por meio da análise de curvas de desnaturação (*melting curve*), onde a presença de um único pico evidencia a amplificação de um único fragmento do cDNA molde. A curva de desnaturação foi realizada aumentando lentamente a temperatura de 72°C para 96°C. Todas as amplificações de qPCR foram conduzidas em duplicatas e a média dos valores foram utilizadas para a análise final.

Utilizando o gene *try* (Fang & Bidochka, 2006), que atua na biosíntese do triptofano, como gene de referência, foi analisada a expressão do gene *pr1A* (Fang & Bidochka, 2006), que codifica a protease subtilisina PR1A em *M. anisopliae* var. *anisopliae* e em *M. anisopliae* var. *acridum* em diferentes condições de cultivo e durante as diferentes fases de patogenicidade de *D. saccharalis*. A escolha do gene de referência foi baseada na expressão constitutiva do gene, com altos valores de Cq semelhantes em todas as amostras de cDNA analisadas. O gene *try* foi amplificado usando o *forward primer* (5'-TGCAATGCATGTTTGATGTC-3') e o *Reverse primer* (5'-CAAAGAGTGGTATCGAGTTAC-3') e o gene *pr1A* foi amplificado usando o *Forward primer* (5'-GATTGGTGGCAGCACTAAC-3') e *Reverse primer* (5'-TCCTGGATCTTCTTGCAAAG-3').

2.6. Quantificação relativa

A geração dos dados quantitativos por PCR em tempo-real é baseada no número de ciclos necessários, para a amplificação ideal gerado pela fluorescência, para atingir um determinado limiar de detecção (Bustin *et al.*, 2009). A expressão relativa foi calculada por um modelo matemático no qual inclui uma correção da eficiência da PCR em tempo real das transcrições individuais (Pfaffl, 2001). As eficiências das amplificações por PCR em tempo real (E) foram determinadas, para cada conjunto de *primers* com a inclinação de um modelo de regressão linear (Pfaffl, 2001) e obtidas a partir de diluições das amostras dos cDNA em um intervalo de 50, 25, 5, 1 e 0,25ng/ml. A inclinação das curvas foram utilizadas para determinar a eficiência da reação de acordo com a equação: $E = 10^{-1/[\text{slope}]}$.

Durante o crescimento fúngico em diferentes meios de cultivos, o valor do Cq do micélio coletado, com 24h foi utilizado como tratamento controle e o valor do Cq do micélio coletado, com 72h como tratamentos das amostras. Similarmente, durante a patogenicidade, o valor do Cq do inseto com 20h após a infecção foi utilizado como tratamento controle e os valores do Cq do inseto morto, inseto com micélio emergindo do inseto e o inseto completamente coberto com micélio foi utilizados como tratamentos das amostras.

Após calcular os valores de R de cada repetição biológica, a expressão relativa dos genes de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* foi apresentada como Log_2 R. Desta forma, correlacionou-se diretamente e numericamente os valores com o fato da indução ou da repressão da expressão gênica, assim, a partir do nível zero de expressão os genes analisados podem ser relativamente induzidos (valores positivos) ou reprimidos (valores negativos). Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do *software* Assistat 7.4 Beta (Silva & Azevedo, 2002).

2.7. Teste de Patogenicidade

Com o intuito de correlacionar a expressão diferenciada do gene *pr1A*, com o grau de patogenicidade de *M. anisopliae* foi avaliada a ação de *Metarhizium* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* contra *D. saccharalis*. Em delineamento inteiramente casualizado, no bioensaio foram utilizados dois tratamentos: a testemunha com água destilada esterilizada acrescida de espalhante adesivo Tween 80 (0,01%v/v) e uma suspensão fúngica na concentração de 10^8 conídios/ml obtidas a partir de colônias jovens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum*. Para cada tratamento foram utilizadas cinco repetições com 10 larvas e cada bioensaio repetido três vezes. As larvas foram colocadas em placas de Petri contendo 20mL de cada tratamento, durante 1 minuto e em seguida transferidas para placas de Petri, contendo alimentação natural de colmo de cana-de-açúcar em cubos, as quais foram acondicionadas em BOD a 28°C. As observações foram realizadas diariamente durante 10 dias. As larvas mortas foram colocadas em câmara úmida para confirmação do agente causal. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do *software* Assistat 7.4 Beta (Silva & Azevedo, 2002).

3. RESULTADOS

3.1. Curva de desnaturação e eficiência da amplificação

As análises da curva de desnaturação (*melting curves*)⁵ mostraram a especificidade dos *primers*, com picos únicos para as amplificações com cada conjunto de *primers*. De acordo com a curva padrão⁶ obtida a partir da inclinação das diluições de cada gene avaliado, as eficiências (E) da qPCR variaram entre 98% e 106,2% e os valores do coeficiente de regressão (R^2) variaram entre 0,994 e 0,998 (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de E e R^2 obtidos a partir das diluições dos genes alvos e de referência de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

Genes	Valor de E (%)		Valor de R^2	
	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>
<i>pr1</i>	103%	104%	0,998	0,996
<i>try</i>	106,2%	98%	0,995	0,994

3.2. Expressão do gene *pr1A* em diferentes condições de cultivo

Em ambas as variedades o gene *pr1A* foi induzido a 72h de cultivo ao comparar com 24h nos três meios utilizados (fase sapróbia). No entanto, ao se comparar os meios de cultivo observou-se expressão significativamente menor no meio YPD e maior no Meio Mínimo suplementado com cutícula da *D. saccharalis*. Diferenças estatísticas também foram observadas quando comparadas às variedades, observando-se expressão significativamente maior em *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Tabela 2).

⁵ Curvas de desnaturação dos genes *pr1A* e *try* durante o crescimento em diferentes condições de cultivos e durante o processo patogênico em *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* apresentada na figura A5 do apêndice, pag. 91.

⁶ Curva padrão do gene *pr1A* de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum*

Tabela 2. Expressão relativa do gene *pr1A* em *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* durante o crescimento em diferentes meios de cultura

Fungo	Meio de cultura		
	YPD	Cutícula	Caseína
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	0.1260 aC	0.8151 aA	0.3662 aB
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	0.0195 bC	0.5212 bA	0.2190 bB

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

3.3. Expressão do gene *pr1A* durante a patogenicidade

Foi observado, tanto em *M. anisopliae* var. *anisopliae* quanto em *M. anisopliae* var. *acridum*, que o gene *pr1A* foi reprimido no inseto morto e induzido no inseto coberto por micélio e no inseto completamente coberto por conídios ao comparar com o inseto com 20h, após a infecção. Ao comparar as fases analisadas, observou-se maior expressão no inseto coberto por micélio seguido do micélio completamente coberto por conídios (Tabela 3). Diferenças estatísticas também foram observadas quando comparadas às variedades, observando-se que *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou menor repressão no inseto morto e maior indução no inseto coberto por micélio bem como no inseto coberto por conídios (Tabela 3).

Tabela 3. Expressão relativa do gene *pr1A* em *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* durante a patogenicidade de *Diatraea saccharalis*

Fungo	Fases da patogênese		
	IM	ME	IC
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	-0.1739 aC	1.9086 aA	0.8533 aB
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	-0.3937 bC	0.91475 bA	0.4542 bB

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. IM (inseto morto), ME (micélio emergindo do inseto cadáver), IC (Inseto completamente coberto com conídios).

3.4. Patogenicidade

O teste de patogenicidade revelou que aos 10 dias *M. anisopliae* var. *anisopliae* matou 88% das larvas de *D. saccharalis* enquanto *M. anisopliae* var. *acridum* matou apenas 38%. Foi observado também que *M. anisopliae* var. *anisopliae* começou a matar com 3 dias após a infecção, observando 12% de mortalidade, enquanto *M. anisopliae* var. *acridum* começou a matar com 4 dias, observando 7% de mortalidade (Tabela 4).

Tabela 4. Mortalidade acumulada de *Diatraea saccharalis* infectadas por *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* durante 10 dias de avaliação

Fungo	Dias (%mortalidade acumulada)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	0aH	0aH	9aG	21aF	34aE	51aD	63aC	73aB	83aA	88aA
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	0aF	0aF	0bF	7bE	15bD	24bC	30bB	34bAB	37bA	38bA
Controle	0aA	0aA	0bA	0cA	0cA	0cA	0cA	0cA	0cA	0cA

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não difere significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

Presumivelmente, *M. anisopliae* têm vários subgrupos de genes sensíveis às diferentes condições de crescimento e identificá-los ajuda a esclarecer os seus mecanismos de adaptação (Wang *et al.*, 2005; Wang & St Leger, 2005). Nesse estudo, o gene *pr1A* teve sua expressão diferenciada em resposta às diferentes condições de crescimento, indicando que a expressão desse gene pode variar de acordo com as diferentes fontes de carbono utilizadas para a indução.

A subtilisina PR1A é produzida em meio mínimo e essa produção é reforçada pela adição de cutícula do inseto no meio, porém sua síntese é reprimida em meio rico (St Leger *et al.*, 1996b; Frenoisier *et al.*, 2003; 2005). O aumento significativo da expressão do gene *pr1A* no meio suplementado com cutícula de *D. saccharalis*, comparativamente com o meio

suplemento de caseína e com o meio rico (YPD) corroboram esses relatos (Tabela 2). A demonstração da expressão diferenciada de *pr1A*, nos diferentes meios de cultura sugere que ambas as variedades são capazes de regular o padrão de expressão desse gene, durante o crescimento sapróbio. É provável que essa diferença na expressão seja um dos fatores que permitam que *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* possam responder de forma flexível à composição do ambiente circundante.

Durante a patogenicidade, as etapas de adesão ao hospedeiro e a penetração através da cutícula são decisivas no estabelecimento da infecção e envolvem profundas alterações dos padrões de expressão gênica, com reflexo nas alterações drásticas da quantidade disponível de nutrientes do hospedeiro (Roberts & St. Leger, 2004). Em condições desprovidas de nitrogênio, a subtilisina PR1 é produzida no apressório e hidrolisa proteínas cuticulares para facilitar a penetração das hifas no inseto (Goettel *et al.*, 1989, St. leger *et al.*, 1989a,b). Após ultrapassar a cutícula, o fungo cresce na hemolinfa, rica em nutrientes, onde PR1 é reprimida pela presença de fontes acessíveis de carbono e nitrogênio (St. leger *et al.*, 1988). Este processo explica o fato do gene *pr1A* ter sido reprimido no inseto morto, em ambas as variedades (Tabela 3), uma vez que na morte do inseto, o fungo já penetrou à cutícula, formou os blastosporos na hemolinfa e invadiu os diversos órgãos internos que são ricos em nutrientes (Shah & Pell, 2003). Após essa etapa, *M. anisopliae* utiliza os nutrientes disponíveis do inseto, esgotando-os. Assim PR1 é novamente induzida e as funções que facilitam a penetração da hifa pela cutícula permitem que o fungo possa emergir e produzir conídios em grande massa sobre a superfície do inseto cadáver, resultando na mumificação (Small & Bidochka, 2005). Desta forma, a indução da expressão do gene *pr1A* tanto no inseto coberto apenas pelo micélio, quanto no inseto coberto pelos conídios, apesar de ter sido diferenciada (Tabela 3), sugerem que este gene possa não estar diretamente relacionado na formação dos conídios, mas deva ser necessário para completar o ciclo patogênico.

Quando relacionadas diretamente com fatores de virulência, há demonstração de que linhagens mutantes de *M. anisopliae* com expressão aumentada da enzima PR1A, apresentaram maior patogenicidade aos hospedeiros *Manduca sexta* (St. Leger *et al.*, 1996b) e mutantes espontâneos nulos para o gene *pr1A* de *M. anisopliae*, mostraram redução na capacidade infectiva de *Tenebrio molitor* quando comparado ao tipo selvagem (Wang *et al.*, 2002). Nossos dados revelaram resultados coerentes com isso quando correlacionamos o nível de expressão de *pr1A* com os dados obtidos a partir do teste de patogenicidade. Ao comparar as duas variedades observamos que *M. anisopliae* var. *anisopliae*, além de ter apresentado maior expressão desse gene em todas as fases de patogenicidade (Tabela 3), também

apresentou melhor ação patogênica contra *D. saccharalis*, tanto no tempo quanto na mortalidade (Tabela 4), indicando que o nível da expressão de *pr1A* possa determinar a capacidade do fungo de causar a doença.

A estrutura da superfície e a composição química da cutícula dos insetos são fatores que podem afetar a adesão dos esporos e consequentemente à patogenicidade (Lord & Howard, 2004). *M. anisopliae* reconhece sinais específicos do hospedeiro o que induz à secreção de diferentes proteínas específicas, e como consequência, provavelmente, é definida a especificidade de um determinado isoaldo/hospedeiro (Pedrini *et al.*, 2007; Santi *et al.*, 2010). Os padrões de transcritos atingidos em resposta ao reconhecimento das características topográficas do inseto podem revelar como *M. anisopliae* reconhece os hospedeiros adequados e os mecanismos envolvidos na patogenicidade (Wang & St Leger, 2005). Desta forma, embora *pr1A* tenha sido expresso pelas duas variedades, especulá-se que o maior nível de expressão apresentado por *M. anisopliae* var. *anisopliae* deva ocorrer em resposta ao hospedeiro, sugerindo ser esse um dos fatores que determina a maior habilidade desse patógeno, para infectar *D. Saccharalis*, uma vez que as diferenças nos fatores de patogenicidade entre as variedades de *M. anisopliae* podem existir devido à regulação diferente do mesmo conjunto de genes, ao invés das variações do número e tipos de genes para cada espécie de hospedeiro (Freimoser *et al.*, 2003).

Embora muitos estudos envolvendo genes relacionados à patogenicidade foram relatados na literatura (Freimoser *et al.*, 2003; Dutra *et al.*, 2004; Small & Bidochka *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005, Wang & St. Leger, 2005; Wang *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2010), muito ainda poderá ser descoberto sobre as funções de cada gene implicado pela expressão diferenciada, desde que as condições de cultivo e os hospedeiros ainda não tenham sido utilizados, visto que *M. anisopliae* pode expressar genes diferentemente para cada tipo de ambiente ou hospedeiro (Freimoser *et al.*, 2003). Foi o que ocorreu nos ensaios, utilizando *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* que ainda não tinham sido avaliados nessas condições. A demonstração da expressão diferenciada do gene *pr1A* entre *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* nos diferentes meios de cultivos, bem como durante a patogenicidade, indica que essas variedades apresentam estratégias diferentes para se adaptarem a diferentes condições de crescimento, acordando com seu estilo de vida sapróbio e/ou parasítico, o que seria um sinal de versatilidade entre esses patógenos, que favoreceria a sua adaptabilidade às condições ambientais.

Os resultados alcançados fornecem um melhor entendimento sobre algumas funções que *pr1A* possui durante a fase sapróbia e parasítica dessas duas variedades de *M. anisopliae*,

estudadas, ressaltando na sua importância à biologia desses fungos e também sugere que esse gene é um fator de virulência potencial, para o desenvolvimento da engenharia dos biopesticidas.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Micoteca URM/RENEBRA, pelo apoio financeiro.

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Metarhizium anisopliae é extensivamente estudado, e é o entomopatógeno melhor caracterizado, para o uso no controle de diversas pragas. Este fungo é muito versátil sendo capaz de infectar uma ampla variedade de insetos e também de se adaptar à vida na rizosfera de plantas. No entanto, ainda não está bem estabelecida a maneira como este fungo se adapta às condições tão diferentes de crescimento e a falta de compreensão dos mecanismos moleculares e fisiológicos envolvidos nessa adaptação reduz a capacidade dos pesquisadores de desenvolver novas estratégias para melhorar a sua eficácia no controle biológico de pragas. Assim, um estudo detalhado sobre o sincronismo da expressão de genes em resposta a um determinado hospedeiro ou a uma determinada condição de crescimento é fundamental para elucidar a sua contribuição na adaptação do fungo como sapróbio e patógeno.

No presente trabalho foi analisado o nível de expressão relativa dos genes *cag8* (regulador da sinalização da proteína G) e *nrr1* (regulador da resposta ao nitrogênio) durante a germinação, conidiogênese e patogênese de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum*. Em ambas as variedades, *cag8* foi reprimido durante a germinação e induzido durante a conidiogênese e patogênese. A repressão desse gene durante a germinação e a indução durante a conidiogênese, bem como na fase de conidiogênese da patogênese corroboram o relato de que esse gene está envolvido nessa conidiogênese. Uma compreensão ao nível de expressão de genes envolvidos na conidiogênese é um passo importante para o desenvolvimento comercial e a melhoria desses fungos como biocontrole, visto que o conídio é a estrutura que está envolvida no processo de transmissão da doença. O gene *nrr1* tem demonstrado ser importante na patogenicidade de *M. anisopliae*, uma vez que várias enzimas envolvidas durante a penetração na cutícula do inseto também são reguladas em resposta à disponibilidade de nitrogênio. Os trabalhos mostraram que esse foi constitutivamente induzido durante a germinação, conidiogênese e patogênese tanto em *M. anisopliae* var. *anisopliae* quanto em *M. anisopliae* var. *acridum*. Essa expressão constitutiva sugere que esse gene deva mediar a desrepressão catabólica do nitrogênio.

Outro gene analisado neste trabalho foi o *pr1A* (codificador da protease subtilizina PR1A). Esta protease está diretamente relacionada com a capacidade de penetração e colonização de *M. anisopliae* no tecido de hospedeiro, sendo muito usada no desenvolvimento de engenharia de biopesticida. Assim, foi analisado o nível de expressão relativa do gene *pr1A*, em *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* durante o crescimento

em diferentes condições de cultivo e durante a patogênese. Foi demonstrado também que o gene *pr1A* foi diferencialmente expresso nos diferentes meios de cultivo, apresentando maior expressão no meio suplementado com cutícula de *D. saccharalis*, em ambas as variedades. Essa diferença na expressão sugere que ambas as variedades são capazes de regular o padrão de expressão desse gene durante o crescimento sapróbio ou parasítico. Durante a patogênese *pr1A* foi reprimido no inseto morto e induzido no inseto coberto por micélio e no inseto completamente coberto por conídios, sugerindo que esse gene tenha função que seja necessária, para completar o ciclo patogênico.

Considerando as diferenças entre as duas variedades, *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou maior expressão de todos os genes analisados durante a patogenicidade, justificando o fato dessa linhagem ter apresentado maior potencial para o controle de *D. saccharalis*. Desta forma, os estudos indicam que as diferenças apresentadas durante a patogenicidade estão correlacionadas, com a capacidade de ativar a expressão de genes em determinados hospedeiros.

Esse conhecimento referente a expressão diferencial de genes, auxiliam na elucidação dos mecanismos moleculares associados à versatilidade metabólica de *M. anisopliae*, representando uma importante ferramenta aos programas de melhoramento genético das linhagens utilizadas no controle biológico de pragas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akilesh, S., Shaffer, D.J., Roopenian, D. 2003. Customized molecular phenotyping by quantitative gene expression and pattern recognition analysis. *Genome Research* 13: 1719-1727.
- Albuquerque, A. C., Pereira, K.C.A., Cunha, F. M., Veiga, A.F.S.L. 2005. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgreen) Isoptera:Termitidae. *Neotropical Entomology* 34: 585-591.
- Alves, S.B. 1998. *Controle Microbiano de Insetos*, Piracicaba, Fundação de estudos agrícolas Luiz de Queiroz (FEALQ).
- Anand, R.; Prasad, B.; Tiwary, B. N. 2009. Relative susceptibility of *Spodoptera litura* pupae to selected entomopathogenic fungi. *BioControl* 54: 85-92.
- Andersen, S.O. 1980. Cuticular sclerotization. In: Miller, T.A. (ed.) *Cuticle Techniques in Arthropods*. New York, Springer-Verlag, pp. 185-217.
- Angel A.M., Steffen, J. Zengmin, L. Jingyue, J. Nicholas, J. T. 2006. Molecular beacons with intrinsically fluorescent Nucleotides. *Nucleic Acids Research* 34 :1-7.
- Arruda, W., Lübeck, I., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2005. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology* 37: 231-244.
- Arthurs, S., Thomas, M.B. 2001. Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 59-65.
- Athayde, A.C.R., Ferreira, U.L., Luna-Alves Lima, E.A. 2001. Fungos entomopatogênicos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 21: 12 -15.
- 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. 1998. *Genética de Microrganismos*, Goiana, Editora da Universidade Federal de Goiás (UFG).
- Azevedo, J. L. 2001. O uso de fungos na biotecnologia. In: Serafini, L.A., Barros, N.M., Azevedo, J.L. (ed) *Biotecnologia na Agricultura e na Pecuária*. Guiabá, Livraria e Editora Agropecuária Ltda, pp. 93-152.
- Azevedo, J.L., Wolff, J.L 2002. A moderna biotecnologia como auxiliar no controle microbiano de pragas da agricultura. In: Azevedo, J.L.; Melo, J.S. *Controle Biológico*. Jaguariúna, EMBRAPA, pp. 326-347.

- Bagga, S., Hu, G., Screen, S.E., St. Leger, R.J. 2004. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene* 324: 159-169.
- Baratto, C.M., Dutra, V., Boldo, J.T., Leiria, L.B., Vainstein, M.H., Schrank, A., 2006. Isolation, Characterization, and Transcriptional Analysis of the Chitinase *chi2* Gene (DQ011663) from the Biocontrol Fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* *Current Microbiology* 53: 217–21.
- Baratto, C.M., Silva, M.V., Santi, L., Passaglia, L., Schrank, I.S., Vainstein, M.H., Schrank, A., 2003. Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology* 49: 723-726.
- Barreto, C.C., Staats, C.C., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2004. Distribution of Chitinases in the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and Effect of N-Acetylglucosamine in Protein Secretion. *Current Microbiology* 48: 102-107.
- Bernard, P.S., Wittwer, C.T. 2002. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clinical Chemistry* 48: 1178-85.
- Bhatia P., Taylor, W.R., Greenberg, A. H, Wright, J.A. 1994. Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Analytical Biochemistry* 216: 223-226.
- Bidochka, M.J., St. Leger, R.J., Roberts, D.W. 1997. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts:an overview. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 171:213-224.
- Bittencourt, V.R.E.P., 2000. Trials to control South American ticks with entomopathogenic fungi. *Annals of the New York Academy Sciences* 916: 555-558.
- Bittencourt, V.R.E.P., Mascarenhas, A.G., Faccini, J.L.H., 1999. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. *Revista Ciência Rural* 29: 351–354.
- Blanford, S., Thomas, M.B. 2001. Adult survival maturation, and reproduction of the desert locust *Schistocerca gregaria* infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Journal of Invertebrate of Pathology* 78: 1-8.
- Bogo, M.R., Rota, C.A., Pinto, J.R.H., Ocampos, M., Corrêa, C.T., Vainstein, M.H., Schrank, A. 1998. A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*:isolation and characterization of genomic and full length cDNA. *Current Microbiology*, 37: 221-225.
- Bolker, M. 1998. Sex and crime: heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology* 25: 143-156.

- Borkovich, K.A., Alex, L.A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G.E., Read, N.D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F.E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J.E., Dunlap, J.C., Loros, J.J., Catcheside, D., Inoue, H., Aramayo, R., Polymenis, M., Selker, E.U., Sachs, M.S., Marzluf, G.A., Paulsen, I., Davis, R., Ebbole, D.J., Zelter, A., Kalkman, E.R., O'Rourke, R., Bowring, F., Yeadon, J., Ishii, C., Suzuki, K., Sakai, W., Pratt, R. 2004. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 68: 1-108.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C., Latge, J.P. 1988. Non-specific factors involved in the attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1795-1805.
- Bustin, S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 29: 23-29.
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34: 597-601.
- Bustin S.A, Benes V, Garson J.A, Hellemans J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R. Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 4: 611-622.
- Bustin, S.A., Nolan, T.P. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques* 15: 155-166.
- Cabib, E., 1987. The synthesis and degradation of chitin. *Advance Enzymology* 59: 59-101.
- Carneiro-Leão, M.P. *Comportamento e citologia de linhagens de Metarhizium em cultura*. Monografia (Curso de Especialização); UFPE; Recife, 30p, 2004.
- Carneiro-Leão, M.P. *Caracterização molecular (PCR) e Infecção de Metarhizium anisopliae var. acridum e Metarhizium anisopliae var. anisopliae em Zaprionus indianus*. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos), UFPE, Recife, 72p, 2006.
- Casadevall, A., Pirofski, L. 2001. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *The Journal of Infectious Diseases* 184: 337-344.
- Center for medieval research. Quiagen. Disponível em: www.meduni-graz.at/zmf/946. Acesso em: 2 de junho 2008
- Chandler, D. 1997. Selection of an isolate of insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* virulent to the lettuce root aphid, *Pemphigus bursarius*. *Biocontrol Science and Technology* 7: 95-104.
- Chang, P.K.J, Yu, J.H. 2004. aflT, a MFS transporter-encoding gene located in the aflatoxin gene cluster, does not have a significant role in aflatoxin secretion. *Fungal Genetics and Biology* 41: 911-920.

- Chen, Z., Feng, H.Y., Shi, L.C., Liu, Y.G., Pan, L. C.; Wang, G. 2000. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* for control of *Lissarhoptrus oryzophilus*. *Chinese Journal of Biological Control* 16: 53-55.
- Clarkson, J.M., Charnley, A.K., 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology* 4: 197-203.
- Curach, N.C., Teo, V.S.J., Gibbs, M.D., Bergquist, P.L., Nevalainen, K.M. 2004. Isolation, characterization and expression of the hex1 gene from *Trichoderma reesei*. *Gene* 331: 133-140.
- Curry, J., Mchale, C., Smith, M.T. 2002. Low efficiency of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase during reverse transcription of rare t(8;21) fusion gene transcripts. *Biotechniques* 32: 768-770.
- Dana, M.M., Pintor-Toro, J.A. 2005. Post-transcriptional control of a glucomylase gene from *Trichoderma harzianum* under stress conditions. *Molecular Research* 104: 134-150.
- Destéfano, R.H.R.; Destéfano, S.A.L., Messias, C.L. 2004. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. *Genetics and Molecular Biology* 27: 245-252.
- Dheda, K., Huggett, J.F., Bustin, S.A., Johnson M.A., Rook, G. Zumla, A. 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 37: 112-119.
- Dilger, M., Felsenstein, F. G., Schwarz, G. 2003. Identification and quantitative expression analysis of genes that are differentially expressed during conidial germination in *Pyrenophora teres*. *Molecular Genetics and Genomics* 270: 147-155.
- Driver, F., Milner, R.F., Trueman, W.H.A. 2000. taxonomic revision of *Metarhizium* based on phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycological Research* 14: 134-150.
- Dong, C., Zhang, J., Huang, H., Chen, W., Hu, Y. 2007. Pathogenicity of a new China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhium*) to subterranean termite *Odontotermes formosanus*. *Microbiological Research* 164: 27-35.
- Dutra, V., Nakazato, L., Broetto, L., Schrank, I.S., Vainstein, M.H., Schrank, A. 2004. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. *Research in Microbiology* 155: 245-251.
- El-Hajj, H.H., Marras, S.A., Tyagi, S., Shashkina, E., Kamboj, M., Kiehn, T.E., Glickman, M.S., Kramer, F.R., Alland, D. 2009. Use of sloppy molecular beacon probes for identification of mycobacterial species. *Journal of Clinical Microbiology* 47: 1190-1198.

- Fang, W., Bidochka, M. J. 2006. Expression of genes involved in germination, conidiogenesis and pathogenesis in *Metarhizium anisopliae* using quantitative real-time RT-PCR. *Mycological Research* 110: 1165-1171.
- Fang, W., Fernandes, E.K.K., Roberts, D.W., Bidochka, M. J., St. Leger, R.J. 2010. A laccase exclusively expressed by *Metarhizium anisopliae* during isotropic growth is involved in pigmentation, tolerance to abiotic stresses and virulence. *Fungal Genetics and Biology* 47: 602-607.
- Fang, W., Pei, Y., Bidochka, M.J. 2007. A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology* 153: 1017-1025.
- Farah, S. B. 2000. *DNA Segredos & Mistérios*, São Paulo, Sarvier.
- Faria, M.R., Magalhães, B.P. 2001. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil: situação atual e perspectivas. *Biotecnologia, Ciências & Desenvolvimento* 22: 18-21.
- Feijó, F.M.C. *Ação de Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae var. anisopliae e Metarhizium flavoviride var. flavoviride no desenvolvimento pós-embriônico de Chrysomya albiceps sob condições de laboratório*. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas), UFPE, Recife, 126 p, 2004.
- Ferreira, U.L. *Crescimento, características enzimáticas, eletroforéticas em Metarhizium spp. e a atividade quitinolítica a partir da degradação da cutícula de Boophilus microplus*. Tese (Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas) – UFPE. 72p. 2004
- Ferreira, M.E., Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao Uso de Marcadores RAPD e RFLP em Análise Genética*. 3ª edição, Brasília, EMBRAPA.
- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pest by entomogenous fungi. *Annuals Review of Entomology* 23: 409-442.
- Ferron, P. 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: Burges, H. D. Microbial Control of Pest and Plant Disease 1970-1980. *Academic Press Inc London* 465-498.
- Fransceschini, M. *Envolvimento da protease PR1A na patogenicidade do fungo Metarhizium anisopliae e na infecção do carrapato bovino Boophilus microplus*. Tese (Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 150p, 2005.
- Frazzon, A.P.G., Da Silva, V.Jr.I., Masuda, A., Schrank, A., Vainstein, M.H. 2000. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* 94: 117-125.
- Freeman, W.M., Walker, S.J., Vrana, K.E. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potencial. *Biotechniques* 26: 112-122.

- Freimoser F.M., Hu, G., St Leger, R.J. 2005. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. *Microbiology* 151: 361–371.
- Freimoser, F.M., Screen, S., Bagga, S., Hu, G., St Leger, R.J. 2003. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology* 149: 239–247.
- Fungaro, M.H.P. 2000. PCR na Micologia. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 14: 12-16.
- Fungaro, M.H P.; Vieira, M.L.C. 1998. Aplicação da PCR em ecologia molecular. In: Melo, I. S., Azevedo, J.L. (ed.) *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna, EMBRAPA-CNPq, PP. 205-207.
- Entz, S. C.; Kawchuk, L. M.; Johnson, D. L. 2008. Discovery of a North American genetic variant of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* pathogenic to grasshoppers. *BioControl* 53: 327-339.
- Gams, W., Rozsypal, J. 1973. *Metarhizium flavoviride* n. sp. Isolated from insects and soil. *Acta Botanica Neerlandica* 22: 518-521.
- Gardes, M., Bruns, T.D. 1996. ITS-RFLP matching for identification of fungi. In: Clapp, J. P. (ed.) *Species diagnostics protocols: PCR and other nucleic acid methods*. Totowa, Human Press, pp.177-186.
- Gibson, U.E., Heide, C.A., Williams, P.A. 1996. A novel method for real time quantification RT-PCR. *Genome Research* 6: 995-1001.
- Gillespie, J.P.; Burnett, C.; Charnley, A.K. 2000. The immune response of desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Journal of Insect Physiology* 46: 429-437.
- Ginzinger, D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 30: 503-512.
- Goettel, M.K., St Leger, R.J., Rizzo, N.W., Staples, R. C., Roberts, D.W. 1989. Ultrastructural localization of a cuticledegrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Journal of General Microbiology* 135: 2233-2239.
- Hajek, A.E. Lund, J. Smith, M.T. 2008. Reduction in fitness of female Asian longhorned beetle (*Anoplophora glabripennis*) infected with *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 98: 198-205.
- Hajek, A.E., St. Leger, R.J., 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* 39: 293-322.
- Hamm, H.E. 1998. The many faces of G protein signaling. *Journal of Biological Chemistry* 273: 669-672.

- Hammil, T.M. 1972. Electron microscopy of phloconidiogenesis in *Metarhizium anisopliae*. *American Journal of Botany* 59: 317-326.
- He, M., Xia, Y. 2008. Construction and analysis of a normalized cDNA library from *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* germinating and differentiating on *Locusta migratoria* wings. *FEMS Microbiology Letters* 291: 127-135.
- Hegedus, W.D., Khachatourians, G.G. 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnology Advances* 13: 455-490.
- Herrera, F., Carballo, M., Shannon, P. 1999. Efficacy of native entomopathogenic fungal strains against *Bemisia tabaci* in the laboratory. *Manejo Integrado de Plagas* 54: 37-43.
- Holland, P. M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. 1999. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 7276-7280.
- Hornbostel, V.L., Ostfeld, R.S., Zhioua, E., Benjamin, M.A. 2004. Sublethal effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) on engorged larval, nymphal, and adult *Ixodes sacpularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 41: 922-929.
- Hsiao, Y.M.; Ko, J.L. 2001. Determination of destruxins, cyclic peptide toxins, produced by different strains of *Metarhizium anisopliae* and their mutants induced by ethyl methane sulfonate and ultraviolet using HPLC method. *Toxicon* 39: 837-841.
- Hu, G., St. Leger, R.J. 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 6383-6387.
- Hungate, J. Dheda, K., Bustin, S., Zumula, A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity* 6: 279-284.
- Hughes, S. J. 1953. Conidiophores conidia and classification. *Canadian Journal of Botany* 31: 577-659.
- Hungate, W.O.H., Thomsem, L., Eilenberg, J., Boomsma, J.J. 2004. 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* 85: 46-53.
- Hyun, J.W., Peres, N.A., Yi, S.Y., Timmer, L.W., Kim, K.S., Kwon, H.M., Lim, H.C. 2007. Development of PCR assays for the identification of species and pathotypes of *Elsinoe* causing scab on citrus. *Plant Disease* 91: 865-870.
- Ihara, F., Yaginuma, N. K., Mishiro, K., Sato, T. 2001. Screening of entomopathogenic fungi against the brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae). *Applied Entomology and Zoology* 36: 495-500.

- Inglis, P.W., Magalhães, B.P., Valadares-Inglis, M.C. 1999. Genetic variability in *Metarhizium flavoviride* revealed by telomeric fingerprinting. *FEMS Microbiology Letters* 179: 49-52.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M., Strasser, H. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (ed.) *Fungi as Biocontrol Agents*. Wallingford, CAB International, pp. 23-69.
- Itafor Bioprodutos. Disponível em: www.itafortebioprodutos.com.br. Acesso em: 14 setembro 2010.
- Jaramillo, J., Borgemeister, C. 2006. New bioassay method to assess the pathogenicity of Colombian strains of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Paecilomyces* sp. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 91: 57-60.
- Jarrold, S.L., Moore, D., Potter, U., Charnley, A.K. 2007. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycological Research* 111: 240-249.
- Joshi, L., St. Leger, R.J., 1999. Cloning, expression and substrate specificity of MeCPA, a zinc carboxypeptidase that is secreted into infected tissues by the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 9803- 9811.
- Joshi, L., St. Leger, R.J., Roberts, D.W. 1997. Isolation of cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (Pr1B) from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using differential display-RT-PCR. *Gene* 197: 1-8.
- Juarez, M.P., Crespo, R., Fernández, G.C., Lecuona, R., Cafferata, L.F. 2000. Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a chagas disease vector. *Journal of Invertebrate Pathology* 76: 198-207.
- Kaaya, G.P., Munyinyi, D.M. 1995. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. *Journal of Invertebrate Pathology* 66: 237-241
- Kamp, A.M., Bidochka, M.J. 2002. Conidium production by three species of insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied Microbiology* 35: 74-77.
- Kanga, L.H.B., James, R.R., Boucias, D.G. 2003. *Hirsutella thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* as potencial microbial agents of *Varroa destructor*, a honey bee parasite. *Journal of Invertebrate Pathology* 81: 175-184.
- Karrer, E.E., Lincoln, J.E., Hogenhout, S., Bennett, A.B., Bostock, R.M., Martineau, B., Lucas, W.J., Gilchrist, D.G., Alexandre, D. 1995. *In situ* isolation of mRNA from individual plant cells: creation of cell-specific cDNA libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 3814-3818.

- Kassa, A., Stephan, D., Vidal, S., Zimmermann, G., 2004. Laboratory and field evaluation of different formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* submerged spores and aerial conidia for the control of locusts and grasshoppers. *BioControl* 49: 63-81.
- Kendrick, W.B. 1971. *Taxonomy of Fungi Imperfect*, Toronto, University of Toronto Press, pp. 390.
- Kershaw, M.J., Moorhouse, E.R., Bateupan, R., Reynolds, S.E., Charnley, A.K., 1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 213–223.
- Kucera, M., 1980. Proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae* toxic for *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 35: 304-310.
- Kudla, B., Caddick, M.X., Langdon, T., Martinez-Rossi, N.M., Bennett, C.F., Sibley, S., Davies, R.W., Arst, H.N.Jr. 1990. The regulatory gene *area* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *The EMBO Journal* 9: 1355-1364.
- Kuklinsky-Sobral, J. W., Luna-Alves Lima, E. A., Araújo, J. M., Azevedo, J. L. 2004. Genetic variability in regenerated *Metarhizium flavoviride* protoplasts. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47:1-14.
- Lazzarini, G.M.J., Rocha, L.F.N., Luz, C. 2006. Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. *Mycological Research* 110: 485–49.
- Leal-Bertioli, S.C.M. 1998. O enfoque molecular na sistemática de fungos. In: Luz, W.C., Fernandes, M.C., Prestes, A.M., Picinini, E.C. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Brasília, RAPP, pp.197-230.
- Lengeler, K.B. Davidson, R.C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.C., Wang, P., Pan, W., Waugh, M., Heitman, J. 2000. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiology and Molecular Biology Review* 64: 746-785.
- Lekanne-Deprez, R.H., Fijnvandraat, A.C., Ruijter, J.M., Moorman, F.M. 2002. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Analytical Biochemistry* 307: 63-69.
- Lima, M.L.F. *Caracterização molecular de espécies de Metarhizium e patogenicidade sobre Diatraea saccharalis*. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos), UFPE, Recife, 89p, 2005.
- Liu, Z.Y., Liang, Z.Q., Whalley, A.J.S., Yao, J., Liu, A.Y. 2001. *Cordyceps brittlebankisoideis*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *Journal of invertebrate Pathology* 78: 178-182.
- Lord, J.C., Howard, R.W. 2004. A proposed role for the cuticular fatty amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera:Liposcelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. *Mycopathologia* 158:211-217.

- Luna-Alves Lima, E.A. *Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens mutantes e diplóides de Metarhizium anisopliae (Metsch) Sorokin*. Tese (Doutorado em Biologia – Modalidade Genética) – UFRJ, Rio de Janeiro. 260p, 1985.
- Luna-Alves Lima E.A., Tigano, M.S. 1989. Citologia de estruturas leveduriformes de *Beauveria bassiana* em meios de culturas líquidos e na hemolinfa de *Spodoptera frugiperda*. *Revista de Microbiologia* 28: 85-94.
- Magalhães, B.P., Goettel, M.S., Frazão, H.S. 2000. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Beauveria bassiana* on *Rhammatocerus schistocercoides* under humid and dry conditions. *Brazilian Journal of Microbiology* 31: 162-164.
- Maniania, N.K., Okello, R.O., Oleruch, R.O., Odero, T. A. 1994. Potencial of entomopathogenic hyphomycetes (Deuteromycotina) fungi for the control of the stem borer *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of African Zoology* 108: 529-536.
- Marten, N. W., Burke, E.L., Hayden, J.M., Straus, A.D. 1994. Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. *FASEB Journal*. 8: 538-544.
- Martins, C. Químicas e aplicações. Opticon Continuous Fluorescence Detection system. Disponível em: web.cena.usp.br/.../Apresentacao_Opticon_Real_Time_PCR_MJ.ppt. Acesso em 2 junho 2008.
- Marzluf, G.A. 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Review* 61: 17-32.
- Mendonça, A. F. 2005. *Cigarrinhas da cana-de-açúcar Controle Biológico*. Maceió, INSECTA, pp. 317.
- Messias, C.L., Azevedo, J.L. 1980. Parasexuality in the deuteromycetes *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society* 75: 473-477.
- Miller, L.K., Ling, A.J., Bulla, L.A. 1983. Bacterial, viral, and fungal insecticides. *Science*, 219: 715-721.
- Milner, R. J. 2000. Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. *Biocontrol* 21: 47-50.
- Milner, R.J., Miller, L., Lutton, G.G., Driver, F. 1996. Biological control of the black field cricket, *Teleogryllus commodus* (Walker) (Orthoptera: Gryllidae), using the fungal pathogen *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Plant Protection Quarterly* 37: 155-162.
- Monteiro, S. G., Bittencourt, V.R.E.P., Daemon, E., Faccini, J.L.H. 1998. Effect of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on eggs of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Ciência Rural*. 28: 699-709.
- Morrison, T., Weis, J.J., Wittwer, C. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24: 954-958.

- Nascimento, F.B.S. *Ação de Metarhizium anisopliae var. anisopliae, Metarhizium anisopliae, Beauveria bassiana e paramentos biológicos após passagem em Rhipicephalus sanguineus*. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos). UFPE, Recife, 2003, 50p.
- Novais, C.M., Pires-Alves, M. 2004. PCR em tempo real. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 33: 10-13.
- Oliveira, M.A.S.; Alves, R.T., Fialho, J.F., Junqueira, N.T.V. 2001. Patogenicidade de fungos entomógenos sobre o percevejo-de-renda da mandioca no Distrito Federal. *Comunicado Técnico*. Embrapa Cerrados, Planaltina 45: 1-4.
- Oliveira, M.A.P. Marques, E.J., Teixeira, V.W., Barros, R. 2008. Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Scientiarum Biological Sciences* 30: 220-224.
- Onofre, S.B., Barros, N.M., Azevedo, J. L. 2001. Pathogenicity of *Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride* (Gams & Rozpal) and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin over bovine tick *Boophilus microplus* (Can., 1887). *American Journal of Veterinary Research* 62: 1478-1480.
- Onofre, S.B., Vargas, L.R.B., Rossato, M., Barros, N.M., Boldo, J.T., Nunes, A.R.F., Azevedo, J.L. 2002. 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, pp. 297-317.
- Ouedrago, R. M., Cusson, M., Gottel, M. S., Brodeur, J. 2003. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locust, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Journal of Invertebrate Pathology* 82: 103-109.
- Paterson, I.C, Charnley, A.K., Cooper, R.M., Clarkson, J.M. 1994. Partial characterisation of specific inducers of a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology* 140: 3153-3159.
- Pathan, A.A.K., Uma Devi, K., Voge, H., Reineke, A. 2007. Analysis of differential gene expression in the generalist entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin grown on different insect cuticular extracts and synthetic medium through cDNA-AFLPs. *Fungal Genetics and Biology* 44: 1231-1241.
- Pedrini, N., Crespo, R., Juárez, M.P. 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 146: 124-137.
- Pereira, M.F.A., Benedetti, R.A.L., Almeida, J.E.M. 2008. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no controle de *Deois flavopicta* (Stal. 1854), em pastagem de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*). *Arquivos do Instituto Biológico* 75: 465-469.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002-2007.

- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30: 1-10.
- Pinto, A. S., Barreto, C.B., Schrank, A., Ulhoa, C.J., Vainstein, M.H. 1997. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogene *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 322-327.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemons, L.M., MacDonald, K.D., Bufton, A.W.J. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advance in Genetics* 5: 141-238.
- Qazi, S.S., Khachatourians, G.G. 2007. Hydrated conidia of *Metarhizium anisopliae* release a family of metalloproteases. *Journal of Invertebrate Pathology* 95:48-59.
- Quarles, W., 1995. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Crop Protection* 22: 415-422.
- Quesada-Moraga, E., Santos-Quirós, R., Valverde-García, P., Santiago- Álvarez, C. 2004. Virulence, horizontal transmission, and sub lethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 87: 51-58.
- Rampelotti, F.T. Ferreira, A., Prando, H.F., Grützmacher, A.D., Martins, J.F.S., Tcacenco, F.A., Mattos, M.L.T. 2007. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (metsch.) Sorokin sobre as fases do desenvolvimento de *Tibraca limbativentris* stal (Hemiptera: Pentatomidae) em condições de laboratório. *Arquivo do Instituto Biológico* 74: 141-148.
- Rangel, D.E.N., Brag, G.U., Anderson, A.J., Roberts, D.W. 2005. Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. *Journal Invertebrate Pathology* 90: 55-58.
- Remans, T., Smeets, K.; Opdenakker, K., Mathijsen, D.; Vangronsveld, J., Cuypers, A. 2008. Normalization of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta* 227: 1343-1349.
- Ribeiro, S.M.A., Luna-Alves Lima, E.A., Assunção, W.T.G. 1992. Sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch). Sorokin (linhagem PL43) em folhas de cana-de-açúcar. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 21: 59-67.
- Roberts, D.W., Humber, R.A. 1981. Entomogenous fungi. In: Cole, G.T., Kendrick, B. (ed.) *Biology of Conidial Fungi*. New York, Academic Press, pp. 201-236.
- Roberts, D.W., St. Leger, R.J., 2004. *Metarhizium* spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects. *Advances in Applied Microbiology* 54: 1-70.
- Rombach, M.C., Humber, R.A. Roberts, D. W. 1986. *Metarhizium flavoviride* var. *minus* var. nov., a pathogen of plant and leafhoppers on rice the Philippines and Solomon Islands. *Mycotaxon* 27: 87-92.

- Samuels, K.D.Z., Pinnock, D.E., Allsopp, P.G. 1989. The potencial of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina, Hyphomycets as a Biological control-agent of *Inopus rubriceps* (Macquart) (Diptera, Stratiomidae). *Journal of The Australian Entomological Society* 28: 69-74.
- Samuels, R.I., Coracini, D.L.A., Martins dos Santos, C. A., Gava C.A.T. 2002. Infection of *Blissus antillus* (Hemiptera: Lygaeidae) eggs by the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *BiolControl* 23: 269-273.
- Santi, L., Silva, W.O.B., Pinto, A.F.M., Schrank, A., Vainstein, M.H. 2010. *Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. *Fungal Biology* 114: 312-319.
- Sasseron, G.R. Desenvolvimento e validação de diagnostic molecular de fungos patogênicos a citros. Dissertação (Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical). Instituto Agrônômico, Campinas, 2008, 71p.
- Savli, H. Karadenizli, A., Kolavli, F., Gundes, S., Ozbek, U., Vahaboglu, H. 2003. Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. *Journal of Medical Microbiology* 52: 403-408.
- Scholte, E. J., Knols, B.G., Takken, W. 2006. Infection of malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Journal Invertebrate Pathology* 91: 43-49.
- Scholte, E.J., Njiru, B.N., Suallegange, R.C., Takken, W., Knols, B.G.J., 2003. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal* 2: 1-8.
- Scholte, E.J., Takken, W., Knols, B.G. 2007. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisoplaie*. *Acta Tropical* 102: 151-158.
- Screen, S., Baliey, A., Charnley, K., Cooper, R., Clarksom, J. 1998. Isolation of a nitrogen response regulator gene (*nrr1*) from *Metarhizium anisopliae*. *Gene* 221: 17-24.
- Screen, S.E., Hu, G., St. Leger, R.J., 2001. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 260-266.
- Shah, P.A., Pell, J.K., 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1: 413-423.
- Silva, A.P.A.P. Infectividade de *Metarhizium anisopliae* à *Zaprionus indianus* (mosca-do-figo) sob condições de laboratório. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos), Recife, UFPE, 50p, 2007.

- Silva, F.A.Z., Azevedo, C.A.V. 2002. Assistat computational program version for the Windows operating system. *Brazilian Journal of Agro-industrial Products* 4: 71-78.
- Silva, M.V.S., Santi, L., Staats, C.C., Costa, A.M., Colodel, E.M., Driemeier, D., Vainstein, M.H., Schrank, A. 2005. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of *chi3* gene. *Research in Microbiology* 156: 382-392.
- Small, C.N., Bidochka, M.J. 2005. Up-regulation of PR1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*. 3: 301-313.
- Staats, C.C. Junges, A., Fitarelli, M., Furlaneto, M.C., Vainstein, M.H., Schrank, A. 2007. Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. *Applied microbiology and biotechnology* 76: 945-950.
- Stahlberg, A., Håkansson, J., Xian, X., Semb, H., Kubista, M. 2004a. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clinical Chemistry* 50: 509-515.
- Stahlberg, A., Kubista, M., Pfaffl, M. 2004b. Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis. *Clinical Chemistry* 50: 1678-1680.
- St. Leger, R.J. 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Canadian Journal of Botany* 73: 1119-1125.
- St. Leger, R.J., Butt, T.M., Goettel, M.S., Staples, R.C., Roberts, D.W. 1989a. Production in vitro of apressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology* 13:274-288.
- St Leger, R.J., Butt, T.M., Staples, R.C., Roberts, D.W. 1989b. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology* 13: 253-262.
- St. Leger R.J., Charnley, A.K., Cooper, R.M. 1987a. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 253: 221-232.
- St. Leger R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K. 1986a. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *Journal of General Microbiology* 132: 1509-1517.
- St. Leger R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K., 1986b. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. *Journal of Invertebrate Pathology* 47: 167-177.
- St. Leger, R.J. Cooper, R.M. Charnley, A.K. 1991a. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 58: 415-426.

- St. Leger, R.J., Durrandas, P.K., Cooper, R.M., Charnley, A.K., 1988. Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Microbiology* 150: 413–416.
- St. Leger, R.J., Frank, D.C., Roberts, D.W., Staples, R.C. 1992a. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading protease structural gene from entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *European Journal of Biochemistry* 204: 991–1001.
- St. Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M., Rizzo, M.J., Roberts, D.W. 1996a Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Applied Environmental Microbiology* 62: 907-912.
- St. Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M., Roberts, D.W., 1996b. Construction of a mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 6349-54.
- St. Leger, R.J., Joshi, L., Roberts, D.W. 1997. Adaptation of proteases and carbohydrases of sporophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology* 143: 1983–1992.
- St. Leger, R.J., Roberts, D.W., Staples, R.C., 1991b. A model to explain differentiation of appressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 57: 299-310.
- St Leger, R.J., Staples, R.C., Roberts, D.W. 1992b. Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene* 120: 119-124.
- Sun, L., Fuxa, J.R., Henderson, G., 2003. Effects of virulence, sporulation and temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 84: 38-46.
- Suzuki, T., Higgins, P.J., Crawford, D.R. 2000. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 29: 332-337.
- Szabo A., Perou, C.M., Karaca, M., Perreard, L., Quackenbush, F., Bernard, P.S. 2004. Statistical modeling for selecting housekeeper genes. *Genome Biology* 5: 1-10.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., Borman, B.D., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* 75: 291-295.
- Toyoda, M., Cho, T., Kaminishi, H., Sudoh, M., Chibana, H. 2004. Transcriptional profiling of the early stages of germination in *Candida albicans* by real-time RT-PCR. *FEMS Yeast Research* 5: 287-296.
- Tulloch, M. 1976. The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society* 66: 407-411.

- U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/product/prod_029056.htm Acesso em Setembro 2006.
- van den Berg R.J., Vaessen, N., Endtz, H.P., Schulin, T., Van Den Vorm, E.R., Kuijper, E.J. 2007. Evaluation of realtime PCR and conventional diagnostic methods for the detection of *Clostridium difficile* associated diarrhoea in a prospective multicentre study. *Journal of Medical Microbiology* 56: 36-42.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. 2002. Accurate normalisation of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3: 0034-1-0034-11.
- Vänninen, I., Tyni-Juslin, J., Hokkanen, H., 2000. Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in finnish agricultural soils. *BioControl* 45: 201-222.
- Vey, A., Matha, V., Dupas, C., 2002. Effects of the mycotoxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. *Journal of Invertebrate Pathology* 80: 177-187.
- Vicentini, S. 1999. *Ecologia do gafanhoto Stiphra robusta (Orthoptera: Proscopiidae) e seu controle biológico com o fungo entomopatogênico Metarhizium flavoviride (Hyphomycetes)*. Tese (Pós-Graduação em Ecologia), Brasília, UNB, 138p.
- Vitzthum, F., Geiger, G., Bisswanger, H., Brunner, H., Bernhagen, J. 1999. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator and image analysis system. *Analytical Biochemistry* 276: 59-64.
- Xavier, L. M. S.; Ávila, C. J. 2006. Patogenicidade de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin e de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin a *Scaptocoris carvalhoi* Becker (Hemiptera: Cydnidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 50: 540-546.
- Xavier-Santos, S., Magalhães, B. P., Luna-Alves, E. A. 1999a. Infectivity of *Metarhizium flavoviride* (Hyphomycetes). *Revista de Microbiologia* 30: 47-51.
- Xavier-Santos, S., Magalhães, B.P., Luna-Alves, E. A. 1999b. Infectivity of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozspal (Deuteromycotina:Hyphomycetes) against grasshopper *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera:Acrididae) in the laboratory. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 28: 359-363.
- Wang, C., Duan, Z., St. Leger, R. J. 2008. MOS1 Osmosensor of *Metarhizium anisopliae* Is Required for Adaptation to Insect Host Hemolymph. *Eukaryotic Cell* 7: 302-309.
- Wang, C., Gang, Hu., St. Leger, R.J. 2005. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genetics and Biology* 42: 704-718.

- Wang, C., J. Powell. 2004. Cellulose bait improves the effectiveness of *Metarhizium anisopliae* as a microbial control of termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Biological Control* 30: 523-529.
- Wang, C., St. Leger, R.J. 2005. Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Eukaryotic Cell* 4: 937-947.
- Wang, C., St. Leger R.J. 2006. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103:6647-6652.
- Wang, C., St. Leger, R.J. 2007b. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell* 6:808-816.
- Wang, C., St. Leger, R.J. 2007a. The *Metarhizium anisopliae* Perilipin Homolog MPL1 Regulates Lipid Metabolism, Appressorial Turgor Pressure, and Virulence. *Journal of Biological Chemistry* 282: 21110-21115.
- Wang, C., Typas, M.A.; Butt, T.M. 2002. Detection and characterisation of *pr1* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters* 213: 251-255.
- Wekesa, V.W., Knapp, M., Maniania, N.K., Boga, H.I. 2006. Effects of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on mortality, fecundity and egg fertility of *Tetranychus evansi*. *Journal of Applied Entomology* 130: 155-159.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Gundry, C.N., Elenitoba-Johnson, K.S. 2001. Real-time multiplex PCR assays. *Methods* 25: 430-442.
- Wong, M.L., Medrano, J.F. 2005. Relative PCR for mRNA quantification. *Biotechniques* 39: 75-85.
- Zacharuk, R.Y. 1971. Fine struture of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (Coleoptera). IV. Development winthin the host. *Canadian Journal of Microbiology* 17: 525-529.
- Zhang, J., Byrne, C.D. 1999. Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competitive reverse-transcriptase PCR. *Biochemical Journal* 337: 231-241.
- Zhang, J., Snyder, S.H. 1992. Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehydes 3 phosphate dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy* 89: 9382-9385.
- Zhang, W., Yueqing, C., Yuxian, Xia. 2008. Cloning of the subtilisin Pr1A gene from a strain of locust specific fungus, *Metarhizium anisopliae*, and functional expression of the protein in *Pichia pastoris*. *World Jornal of Microbiology and Biotechnology* 24: 2481-2488.

Zhao, H., Charnley, A.K., Wang, Z., Yin, Y., Li, Z., Li, Y., Cao, Y., Peng, G., Xia, Y. 2006. Identification of an extracellular acid trehalase and its gene involved in fungal pathogenesis of *Metarizium anisopliae*. *Journal of Biochemistry* 140:319-327.

APÊNDICES

Figuras referentes às curvas de desnaturação dos genes *cag8*, *nrr1* e *try* durante a germinação, conidiogênese e patogênese de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e do gene *pr1* e *try* durante o crescimento em diferentes condições de cultivos e durante o porocesso patogênico em *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

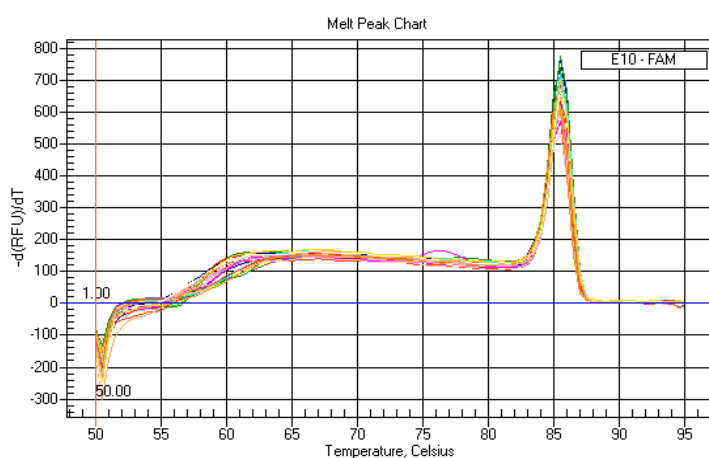


Figura 1. Curva de desnaturação (*Melting curves*). Gene *cag8* e *try* durante a germinação e conidiogênese de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.

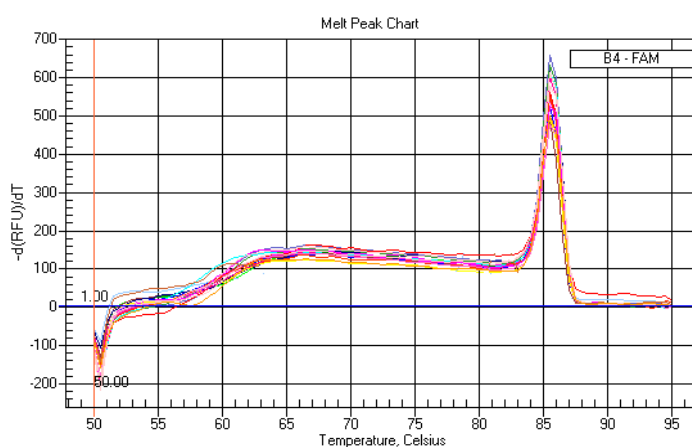


Figura 2. Curva de desnaturação (*Melting curves*). Gene *cag8* e *try* durante a patogênese de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.

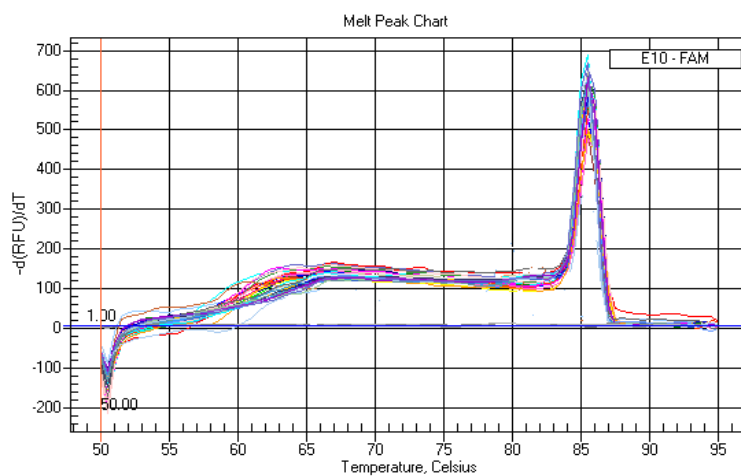


Figura 3. Curva de desnaturação (*Melting curves*). Gene *nrr1* e *try* durante a germinação e conidiogênese de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.

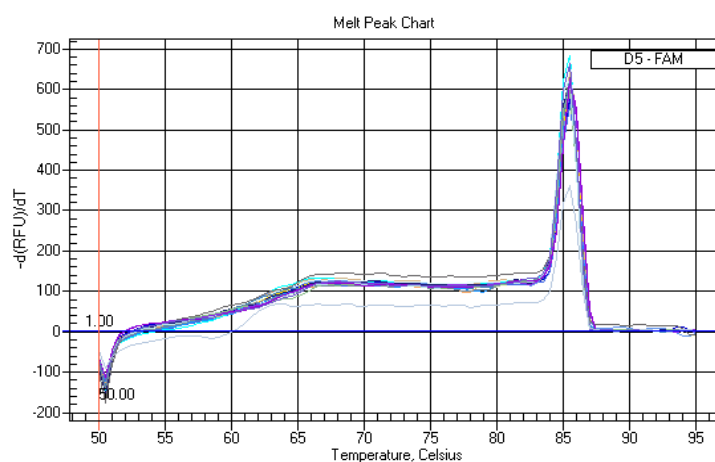


Figura 4. Curva de desnaturação (*Melting curves*). Gene *nrr1* e *try* durante a patogênese de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.

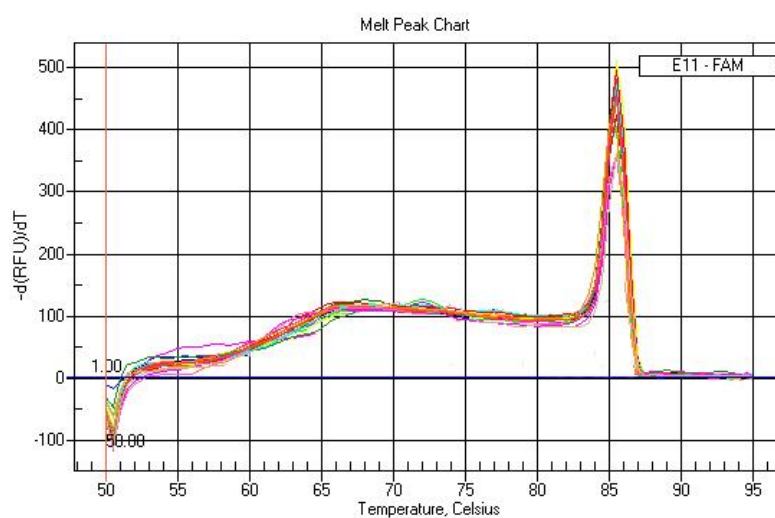


Figura 5. Curva de desnaturação (*Melting curves*). Gene *pr1* e *try* durante o crescimento em diferentes condições de cultivos e durante o porocesso patogênico em *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

Figuras referentes às curvas padrão dos genes *cag8*, *nrr1*, *try* e *pr1A* em *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

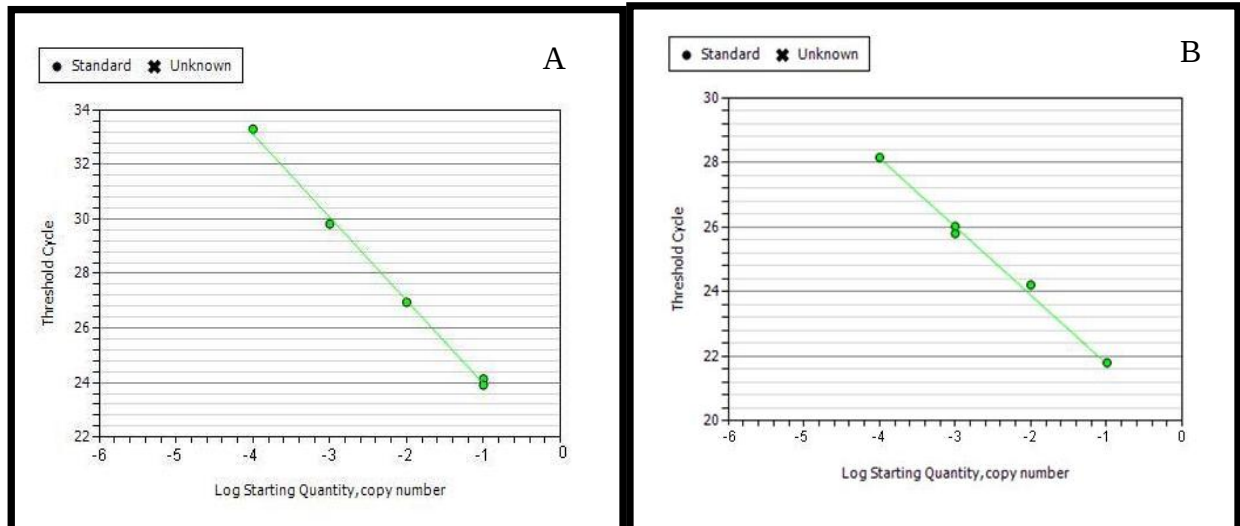


Figura 6. Curva padrão do gene *cag8* de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (A) e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (B).

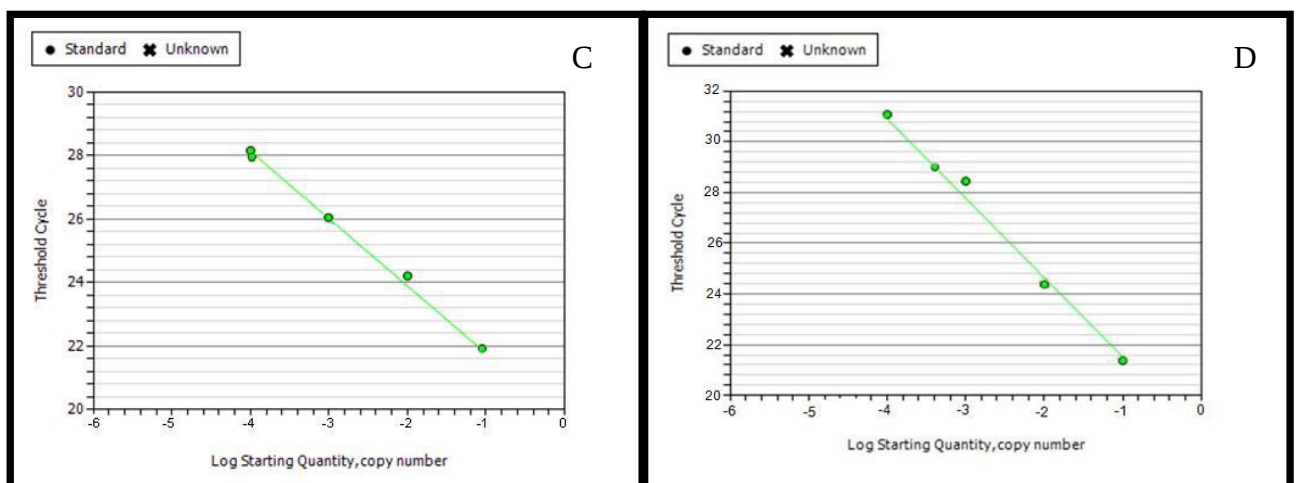


Figura 7. Curva padrão do gene *try* de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (C) e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (D).

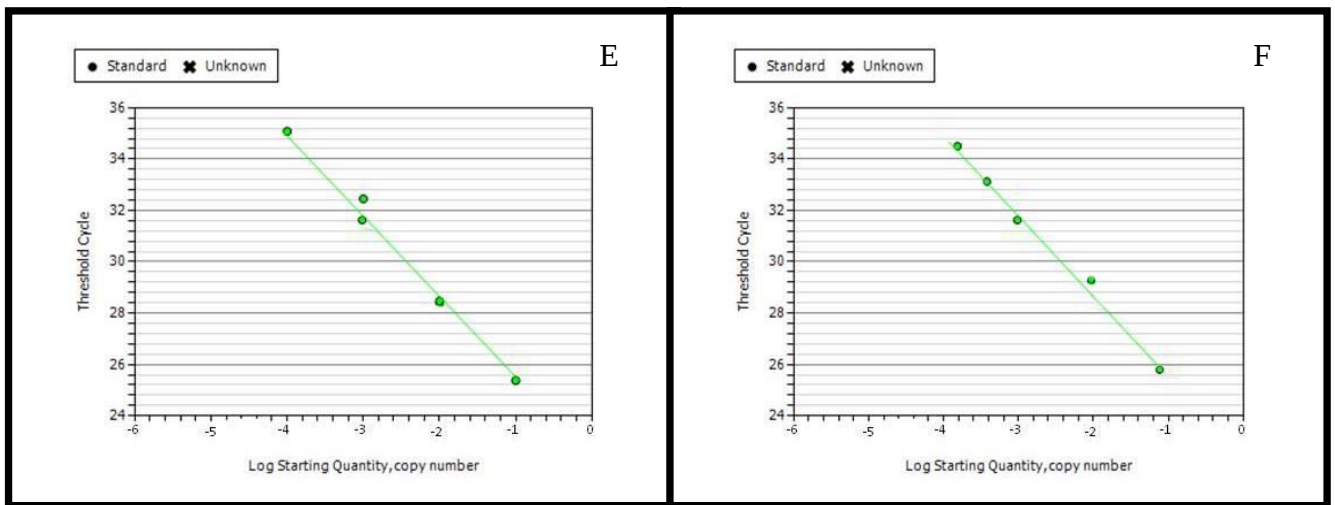


Figura 8. Curva padrão do gene *nrr1* de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (E) e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (F).

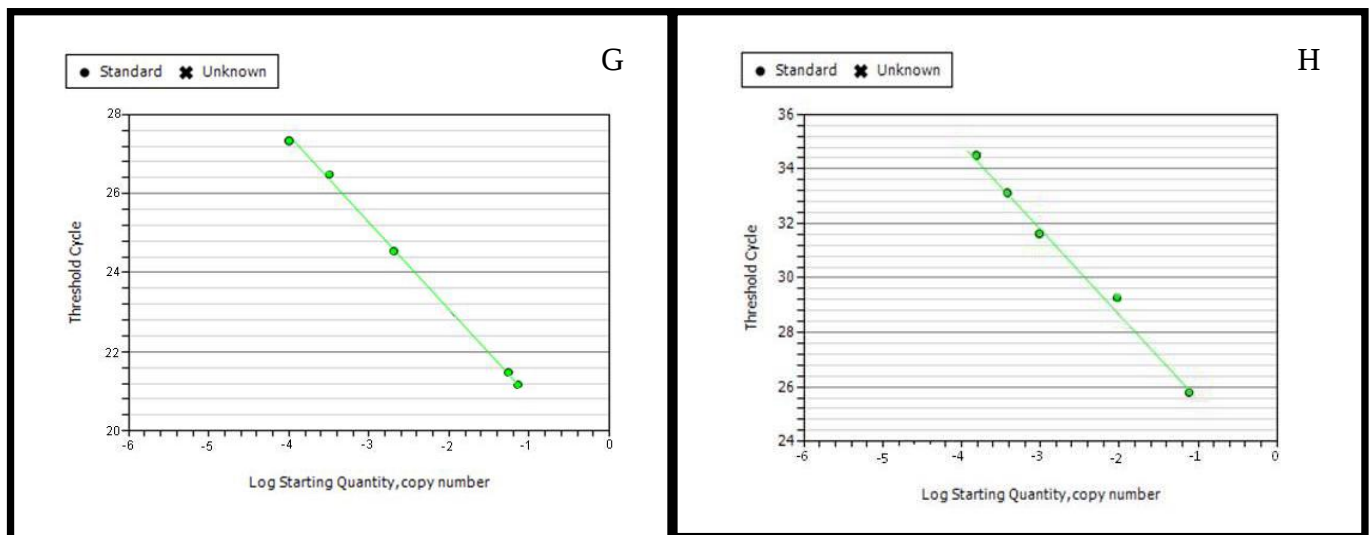


Figura 9. Curva padrão do gene *pr1* de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (G) e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (H).