

MARIELE PORTO CARNEIRO LEÃO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR (PCR) E INFECÇÃO DE
Metarhizium anisopliae var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var.
anisopliae EM *Zaprionus indianus***

RECIFE
2006

MARIELE PORTO CARNEIRO LEÃO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR (PCR) E INFECÇÃO DE
Metarhizium anisopliae var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var.
anisopliae EM *Zaprionus indianus***

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em
Biologia de Fungos do
Departamento de Micologia
da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte do
requisito para obtenção do
título de Mestre.

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Elza Áurea de Luna Alves Lima

CO-ORIENTADOR: Prof Dr. José Ferreira dos Santos

Recife-PE
2006

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR (PCR) E INFECÇÃO DE
Metarhizium anisopliae var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var.
anisopliae EM *Zaprius indianus***

MARIELE PORTO CARNEIRO LEÃO

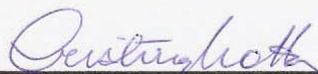
ORIENTADORA: Profª Drª Elza Áurea de Luna Alves Lima

CO-ORIENTADOR: Prof Dr. José Ferreira dos Santos

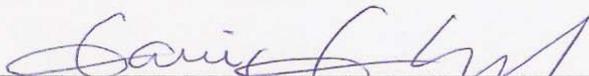
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Elza Áurea de Luna Alves Lima (Departamento de Micologia UFPE)

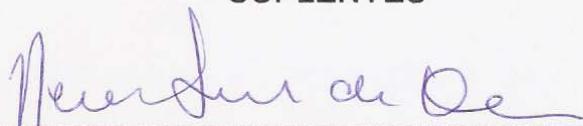


Profª Drª Cristina Maria de Souza Motta (Departamento de Micologia UFPE)

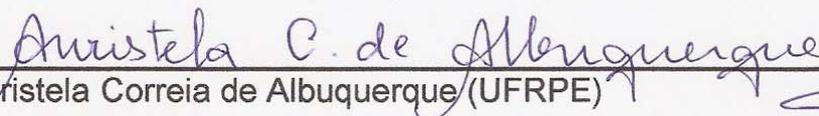


Profª Drª Tania Tassinari Rieger (Departamento de Genética / UFPE)

SUPLENTES



Profª Drª Neiva Tinti de Oliveira (Departamento de Micologia / UFPE)



Profª Drª Auristela Correia de Albuquerque (UFRPE)

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

DEDICO

Com muita gratidão, sinceridade e reconhecimento, aos meus pais, que cedo me ensinaram, pelo exemplo, que vale a pena ser honesta e lutar por um ideal.

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.

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

À Prof^a da UFPE, minha orientadora, Dr^a Elza Áurea de Luna Alves Lima, pela confiança, paciência, bem como pelo exemplo de dedicação, de doação de dignidade pessoal e sobre tudo de amor.

À meu Co-orientador, Prof^o Dr. José Ferreira dos Santos pelas sugestões durante o decorrer do trabalho

À UFPE e ao Departamento de Micologia, que facilitaram minhas pesquisas durante esse trabalho.

Ao CENARGEN – EMBRAPA, pela liberação das linhagens empregadas nesse trabalho.

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

Em especial a Bereneuza Tavares Ramos Valente Brasileiro e Meirana Xavier Vila Nova pelo apoio, intercambio de conhecimentos e ajuda e paciência durante o decorrer desse trabalho.

Aos meus colegas de Laboratório de Citologia e Genética: Ana Paula Almeida, Ana Paula Duarte, Virgínia, Neide e Francisco pela convivência harmoniosa.

Às minhas colegas do Departamento de Genética Nara e Kelma pela ajuda na obtenção da mosca *Zaprionus indianus*.

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

SUMÁRIO

Páginas

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| 2.1 – Aspectos taxonômicos e biológicos de <i>Metarhizium</i>..... | 17 |
| 2.2- Utilização de <i>Metarhizium</i> ssp. para o biocontrole de insetos- pragas..... | 20 |
| 2.3 – <i>Zaprionus indianus</i>..... | 23 |
| 2.4 – Marcadores Moleculares..... | 27 |
| 2.4.1- PCR (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)..... | 27 |
| 2.4.2- Região ITS do DNA ribossomal..... | 28 |
| 2.4.3- Microssatélite (GTG) ₅ | 31 |
| 2.4.4- <i>Intron Splice Site Primer</i> | 32 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 3.1 – Local de Realização dos Experimentos | 33 |
| 3.2 – Linhagens Fúngicas Utilizadas..... | 33 |
| 3.3 – Linhagem da Mosca utilizada..... | 33 |
| 3.4 – Meios de Cultura | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.1– Batata-Dextrose-Agar (BDA) | 33 |
| 3.4.2– Meio Mínimo(MM) | 33 |
| 3.4.3– Meio para Drosophila..... | 34 |
| 3.5– Análise da variabilidade genética detectada por marcadores moleculares | 34 |
| 3.5.1– Obtenção de micélio para extração do DNA genômico | 34 |
| 3.5.2– Extração de DNA | 34 |
| 3.5.3– Quantificação do DNA..... | 36 |
| 3.5.4– Amplificação de DNA pela técnica de PCR..... | 36 |
| 3.5.4.1-Região ITS do rDNA..... | 36 |
| 3.5.4.2-Microsatélite (GTG) ₅ | 37 |
| 3.5.4.3- <i>Intron Splice Site Primer</i> | 37 |
| 3.6 –Análise Estatística | 38 |
| 3.7 –Teste de Patogenicidade | 39 |
| 3.7.1– Bioensaios..... | 39 |
| 3.7.2– Suspensões de esporos fúngicos..... | 39 |
| 3.7.3– Quantificação do inóculo..... | 39 |
| 3.7.4– Infecção “in vitro” de larvas <i>Zaprionus indianus</i> | 40 |
| 3.7.5– Reisolamento do fungo de <i>Zaprionus indianus</i> | 40 |
| 3.7.6– Análise Estatística..... | 40 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 41 |
| 4.1– Teste de Patogenicidade..... | 41 |
| 4.2– Análise das regiões de Microsatélite, intron e ITS antes da Infecção de <i>Zaprionus indianus</i> | 45 |
| 4.3– Análise das regiões de Microsatélite, Intron e ITS após reisolamento de <i>Zaprionus indianus</i> pós infecção experimental..... | 51 |
| 5. CONCLUSÕES | 53 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 54 |

LISTA DE FIGURAS

| | Páginas |
|--|---------|
| FIGURA 1. <i>Zaprionus indianus</i> . (A e B) Faixas brancas demarcadas por linhas negras paralelas. (C) Espinhos complexos nos fêmures das patas anteriores. Campos (2005)..... | 25 |
| FIGURA 2. (A) Fruto de figo sadio. (B) Larvas de <i>Zaprionus indianus</i> no ostíolo do fruto. (C) Dano em figo causado por <i>Zaprionus indiauns</i> . (D) Larvas dentro do fruto. Stein et al. (1999). | 26 |
| FIGURA 3. Estrutura do agregado gênico com representação das regiões ITS1, ITS2 e a subunidade 5.8S do rDNA com iniciadores ITS5 eITS4. Adaptado de Fungaro (2000)..... | 30 |
| FIGURA 4. Representação esquemática da técnica de extração de DNA para fungos filamentosos. Brasileiro (2003)..... | 35 |
| FIGURA 5. Perfil de amplificação de DNA das 2 linhagens de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Fusarium solani</i> das regiões de (GTG) ₅ (A) e <i>Intron</i> (B). Nas pistas M, marcador de peso molecular 100 pb; Nas pistas 1, 2 e 3, encontram-se os DNAs das linhagens <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Fusarium solani</i> | 45 |
| FIGURA 6. Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard a partir dos perfis de (GTG) ₅ obtidos de linhagens de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Fusarium solani</i> | 48 |

FIGURA 7. Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard a partir dos perfis de *Intron* obtidos de linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Fusarium solani* 48

FIGURA 8. Perfil da região ITS do rDNA dos isolados de *Metarhizium anisopliae*, pelos *primers* ITS4 e ITS5, em gel de agarose. Na pista M, marcador de peso molecular 100pb, nas pistas 1, 2 e 3 encontra-se o DNA das linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *Fusarium solani* 50

FIGURA 9. Perfil de amplificação de DNA das 2 linhagens *Metarhizium* das regiões de (GTG)₅ (A) e Intron (B). Nas pistas M, marcador de peso molecular 100pb; Nas pistas 1e 5 encontra-se o DNA da linhagem *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* antes da passagem pela mosca e nas pistas 2 e 6 o DNA após passagem pela mosca; Nas pistas 3 e 7 encontra-se o DNA da linhagem *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* antes da passagem pela mosca e nas pistas 4 e 8 encontra-se o DNA após a passagem pela mosca 51

FIGURA 10. Perfil da região ITS do rDNA dos isolados de *Metarhizium anisopliae*, pelos *primers* ITS4 e ITS5, em gel de agarose. Na pista M, marcador de peso molecular 100pb, nas pistas 1 e 2, encontra-se o DNA das linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* antes e após passagem por *Zaprionus indiauns* respectivamente; Nas pistas 3 e 4 o DNA de *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*..... 52

LISTA DE TABELAS

Páginas

| | |
|---|----|
| TABELA 1. <i>Primers</i> utilizados para amplificar o DNA das linhagens de <i>Metarhizium</i> | 36 |
| TABELA 2. Média e desvio do número de moscas que emergiram por vidro, infectadas por <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> após 8 dias avaliação..... | 43 |
| TABELA 3. Percentual do ritmo de emergência de <i>Zaprionus indianus</i> infectadas por <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> durante os 8 dias avaliação | 44 |

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR (PCR) E INFECÇÃO DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* VAR. *ACRIDUM* E *METARHIZIUM ANISOPLIAE* VAR. *ANISOPLIAE* EM *ZAPRIONUS INDIANUS*

MARIELE PORTO CARNEIRO LEÃO

RESUMO

Foram analisadas as linhagens *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* quanto à patogenicidade sobre *Zaprionus indianus*, utilizando as concentrações 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 conídios/mL considerando o percentual de emergência de adultos. De acordo com a metodologia empregada verificou-se que as duas linhagens apresentaram ação contra *Z. indianus*. Os marcadores moleculares ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA, *Intron Splice Site Primer* e Microssatélite (SSR- *Simple Sequence Repeats*), foram utilizados para avaliar a diversidade genética entre as linhagens antes e após a passagem pela mosca. A análise de agrupamento usando o método de UPGMA baseada nas distâncias genéticas dos marcadores moleculares confirmou a diversidade genética reconhecida no gênero *Metarhizium*. O microssatélite (GTG)₅ e o *intron* do grupo mRNA nuclear tiveram a mesma sensibilidade em detectar a variabilidade genética entre as linhagens de *Metarhizium*. Os produtos de amplificação dos *loci* ITS1-5.8-ITS2 do rDNA com os iniciadores ITS4 e ITS5 foram eficientes em demonstrar que as linhagens estudadas pertence à espécie *Metarhizium anisopliae*, apesar da diversidade genética demonstrada pelos marcadores (GTG)₅ e EI1. Os perfis de amplificações da região microssatélite, *intron* e ITS após a passagem por *Z. indianus* comprovaram que as linhagens reisoladas foram às mesmas que foram utilizadas para infectar.

Palavras-chave: *Metarhizium*, região ITS-rDNA, *Intron Splice Site Primer*, Microssatélite e *Zaprionus indianus*

MOLECULAR CHARACTERIZATION (PCR) AND INFECTION *METARHIZIUM ANISOPLIAE* VAR. *ACRIDUM* AND *METARHIZIUM ANISOPLIAE* VAR. *ANISOPLIAE* ON *ZAPRIONUS INDIANUS*

MARIELE PORTO CARNEIRO LEÃO

ABSTRACT

The *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *M. anisopliae* var. *anisopliae* strains were analysed for the pathogenicity to the fly *Zaprionus indianus*, using the concentrations 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 conidia/mL, considering the percentage of adults' emergency. In agreement with the used methodology, it was verified that both fungi strains presented action against *Z. indianus*. The ITS (*Internal Transcribed Spacer*) molecular markers of rDNA, *Intron Splice Site Primer* and Microsatelite (SSR- *Simple Sequence Repeats*) were used to evaluate the genetic diversity before and after passing through the fly. The grouping analysis using the UPGMA method, based on the genetic distances of molecular markers, confirmed the recognized genetic diversity of the genus *Metarhizium*. The microsatelite (GTG)₅ and the *introns* of nuclear mRNA group showed the same sensitive to detect the genetic variability among *Metarhizium* strains. The amplification products of the rDNA locus ITS1-5.8-ITS2 with the ITS4 and ITS5 primers were efficient to demonstrate that the strains analysed belongs to the *Metarhizium anisopliae* specie, although genetic diversity was demonstrated by markers (GTG)₅ e EI1. The amplification profiles of microsatelite, *intron* and ITS regions after passing through the *Z. indianus* proved that the reisolateds strains were the same that were used for infection.

Key Words: *Metarhizium*, ITS-rDNA region, *Intron Splice Site Primer*, Microsatelite and *Zaprionus indianus*

1. INTRODUÇÃO

Zaprionus indianus, mosca de origem africana, foi introduzida no Brasil, de forma acidental (VILELA, 1999). Esta espécie ainda não foi considerada uma praga na sua região de origem, onde apresenta o comportamento normal verificado para os organismos da família, cujas larvas e adultos se alimentam das leveduras, de frutos caídos ao solo em decomposição (BEGON, 1982). Entretanto, após sua invasão no Brasil, dadas às condições favoráveis, este drosofilídeo sofreu significativa modificação de comportamento e parece ter atingido o *status* de praga, realizando a postura em frutos em início de maturação. A mosca deposita seus ovos no ostíolo do fruto, e as larvas penetram no interior levando à inutilização dos mesmos pela introdução de leveduras e bactérias. Estes frutos tornam-se impróprios para o consumo, como ocorreu na região de Valinhos (SP) como figos produzidos para exportação, causando grande prejuízo e tornando essa mosca conhecida no Brasil como a mosca-do-figo (VILELA et al., 2001).

Na região Nordeste a mosca-do-figo foi encontrada em 2000, na região do Vale do Rio São Francisco (Sobradinho, BA), pela equipe do Setor de Drosofilídeos do Laboratório de Genética Animal (Departamento de Genética, CCB) da UFPE e no mesmo ano esta mosca foi encontrada nas zonas da mata e litorânea dos estados de Pernambuco e Paraíba, demonstrando grande capacidade de disseminação (SANTOS et al., 2003).

Na região Sul a mosca-do-figo parece restrita aos frutos cultivados, como figos, caqui, pêssegos e laranjas, indicando que o seu controle poderia ser facilmente empreendido, uma vez que não haveria reservatórios em áreas naturais para reinfestação das culturas (VILELA, 1999; VILELA et al., 2001). Na região Nordeste as populações de *Z. indianus* adotaram uma estratégia diferente de disseminação, atacando frutos nativos, como umbu, sirigüela, jaca, sapoti e jenipapo, formando reservatórios naturais de onde poderá reinfestar áreas de fruticultura, podendo ser considerada a mais nova ameaça potencial desta mosca nas áreas de fruticultura, como o Vale do Rio São Francisco (SANTOS et al., 2003). Embora ainda não tenha causado prejuízos econômicos na região Nordeste, a melhor adaptação ao ambiente natural, desta mosca, poderá levar com o aumento das populações, a infestações de difícil controle, devido às reinfestações provenientes de áreas naturais adjacentes.

A ameaça da *Z. indianus* à fruticultura paulista está levando à necessidade do desenvolvimento urgente de métodos para seu controle biológico, visando à sua prevenção. Esta necessidade provavelmente se estenderá em breve a outros estados, principalmente da região Nordeste, onde o clima quente favorece o desenvolvimento e disseminação da *Z.*

indianus. Devido à recente invasão, ainda não foram identificados inimigos naturais com potencial para utilização no manejo da praga. Uma alternativa promissora de controle biológico da mosca-do-figo, com maior rapidez de desenvolvimento, segurança e efetividade, poderá ser a utilização de fungos entomopatogênicos (ONOFRE et al., 2002).

A eficiência e especificidade da utilização de fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* e *Beauveria bassiana*, foi demonstrada para o controle de dípteros como da mosca *Chrysomya albiceps*, causadora da miíase de animais e humanos (FEIJÓ, 2004; FEIJÓ et al., 2004; MARCIEL et al.), da mosca doméstica (STEINKRAUS et al., 1990), da mosca africana tsé-tsé (KAAYA & OKECH, 1990; KAAYA e MUNYINYI, 1995), dos mosquitos flebotomíneos transmissores de leishmaniose (REITHINGER et al., 1997) e da mosca-branca (ZAKI, 1998; OROZCO-SANTOS et al., 2000; BROWNBRIDGE et al., 2001).

A busca de métodos eficientes de monitoramento é prioridade para o manejo adequado dessa mosca, tornando-se base para as ações de prevenção e controle. Diferentes métodos de genética molecular, como a técnica de PCR (GARDES & BRUNS, 1996), que é bastante utilizada para caracterização de linhagens de leveduras (BARROS-LOPES et al., 1996; MELO, 2000; PATARO et al., 2000; GUERRA et al., 2001), tem sido utilizada com sucesso para a identificação e monitoramento de fungos filamentosos (HENRION et al., 1994; HEGEDUS & KHACHATOURIANS, 1995; BUSCOT et al., 1996; GUIMARÃES & SÁ, 2000; BRASILEIRO et al., 2004; DESETÈFANO et al., 2004).

O presente trabalho teve por objetivo testar a susceptibilidade da mosca do figo (*Zaprionus indianus*), aos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae*, como também testar o emprego da técnica de PCR com *primers* específicos para genes de DNA ribossômico, antes e após a passagem pelo inseto, visando monitorar e desenvolver um método de controle biológico eficaz e seguro, para evitar prejuízos à fruticultura regional e nacional.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos taxonômicos e biológicos de *Metarhizium*.

Metarhizium anisopliae (Metsch) Sorokin

Espécies de *Metarhizium* são os fungos mais utilizados nos dias atuais em controle biológico. *Metarhizium anisopliae*, foi descrita 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). Nos anos que seguiram a este relato, esta espécie foi alvo de várias denominações, no entanto, em 1883, Sorokin conferiu ao isolado de Metschnikoff a denominação de *M. anisopliae*, e esta passou a ser aceita e utilizada até os dias atuais. (LUNA-ALVES LIMA, 1989).

Em estudos baseados no trabalho de Johnston, que separa 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 – 9,0µm. e *M. anisopliae* (Mestch.) Sorokin var. *major* Johnston apresenta conídios que variam de 9,0-18,0µm. Por outro lado, Gams & Rozsypal (1973) descreveram pela primeira vez, a espécie de *M. flavoviride* isolada de larvas de pupas de curculionídeos e dos solos cultivados na Europa. Os autores empregaram características morfológicas e 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 & Roberts. Driver et al. (2000), baseado nos padrões de RAPD, na seqüência ITS do DNA ribossômico, analisaram 123 isolados de espécies identificadas como *M. anisopliae*, *M. flavoviride* ou *M. album*. Os resultados confirmaram a predominância de *M. anisopliae*, embora tenham sido reconhecidos quatro agrupamentos: *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *majus* e dois isolados descritos como variedades novas *M. anisopliae* var. *lepiditum* e *M. anisopliae* var. *acridum*, um outro grupo representado por duas variedades, *M. flavoviride* var. *novazealandicum* e *M. flavoviride* var. *pemphigum*. Após a publicação desse estudo as linhagens brasileiras isoladas de gafanhoto tidas com *M. flavoviride* passaram a ser denominadas de *M. anisaopliae* var. *acridum*.

Estas variedades foram aceitas pela comunidade científica (GILLESPIE et al., 2000; MAGALHÃES et al., 2000; ARTHURS & THOMAS, 2001, BLANFORD & THOMAS, 2001; OUEDRAGO et al., 2003; ALBURQUEQUE et al., 2005; RANGEL et al., 2005).

O ciclo parassexual é uma alternativa de sexo encontrado em alguns Anamorfos dos Ascomycotina e Basidiomycotina. Messias & Azevedo (1980), descreveram pela primeira vez o ciclo parassexual de *M. anisopliae* a partir de linhagens mutantes homocarióticas haplóides, e obtiveram linhagens diplóides que foram confirmadas pela haploidização, utilizando a substância Cloroneb. 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. Em *M. anisopliae*, a formação dessas estruturas segue o modelo fiáldico proposto por Hughes (1953), que culmina com produção de conídios de coloração esverdeada Hammil (1972), de inserção basipetal (LUNA-ALVES LIMA, 1985). A mesma autora também demonstrou que os conídios de *M. anisopliae* apresentam variação quanto à forma, à disseminação e ao número de núcleos. Através de estudos citológicos, em oito linhagens selvagens, nove mutantes e dez diplóides, encontrou grande variação nos conídios onde observou formas cilíndricas, globosas, ovóides, elípticas, triangulares, alantoides e hialodídimas. Esta última foi descrita pela primeira vez na literatura.

Entre os fungos utilizados no controle biológico de pragas ou com potencial para tanto, *M. anisopliae* é o que mais tem merecido atenção dos pesquisadores por isso maior número de informação foi acumulada a seu respeito conforme constataram MONTEIRO et al. (1998). Esses autores citam ainda, que o fungo apresenta estrutura reprodutiva semelhante a um esporodóquio na descrição de outros autores. Contudo, essa forma semelhante ao esporodóquio, é na verdade a justaposição dos conidióforos que se entrelaçam frouxamente, devido às grandes ramificações das estruturas hifais, mas os conidióforos continuam individualizados (LUNA-ALVES LIMA, 1985; XAVIER-SANTOS, 1999b; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004).

O ciclo biológico de *M. anisopliae* se inicia coma a germinação dos conídios. Estes, em condições adequadas emitem um tubo germinativo que após diferenciação hifal, forma o micélio; neste, a medida que o fungo se desenvolve, surgem em parte determinada, os conidióforos. Entre o terceiro e quinto dia de crescimento os conídios se apresentam de cor branca, tornado-se esverdeados com o amadurecimento da colônia (RIBEIRO et al., 1992). Na fase parasitária, o fungo desenvolve estruturas denominadas apressórios (FERRON, 1978),

estrutura que facilita a penetração do fungo no hospedeiro, através de processos mecânicos e enzimáticos.

Os apressórios penetram no inseto, diferenciam-se em estrutura leveduriforme as quais secretam toxina que culmina com a morte do inseto. As hifas se exteriorizam formam os conidióforos e conídios, estes são dispersos e o ciclo se reinicia (ZACHARUK, 1971; LUNA-ALVES LIMA & TIGANO, 1989).

Ribeiro et al. (1992) através de estudos com a linhagem de *M. anisopliae* (PL43) isolada de *Mahanarva posticata* em Pernambuco, verificaram que o micélio formado por hifas de parede delgada, septada, hialina, crescido em meio completo, apresenta variação da condição nuclear confirmando os achados de Luna-Alves Lima (1985). Os seguimentos uninucleados e binucleados foram mais acentuados em relação aos multinucleados.

No Brasil, *M. anisopliae* var. *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).

Lima (2005) fez um estudo de caracterização molecular de espécies de *Metarhizium* e patogenicidade sobre a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*. A autora analisou 15 linhagens de *Metarhizium* isoladas de diferentes regiões e hospedeiros quanto as características genéticas e 7 linhagens quanto a patogenicidade e observou que não houve correlação entre grupos e regiões geográficas. Das sete linhagens analisadas no teste de patogenicidade, a 4415, a 4400 e a 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*

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

O uso indiscriminado de agrotóxicos tem provocado prejuízo à agricultura, ao longo dos anos e o controle biológico tem sido empregado como uma alternativa para esse problema (ALVES, 1998; AZEVEDO & WOLFF, 2000). Neste contexto, o controle biológico, tem despertado o interesse dos pesquisadores, pois se tem mostrado eficiente, econômico e duradouro, ausência de resíduos tóxicos, inocuidade aos homens e aos animais, além de não apresentar efeitos negativos, como a perda da eficiência e a deterioração do meio ambiente, causado pelos produtos químicos utilizados no controle de populações em desequilíbrio e que terminam por comprometer os insetos que não são alvos (MAGALHÃES et al., 2000).

O interesse pelo uso de fungos para o controle de pragas da agricultura tem aumentado nos últimos anos, à medida que foram sendo evidenciados os problemas advindos da utilização dos inseticidas químicos. Alguns dos gêneros de fungos entomopatogênicos atuam no controle microbiano incidindo sobre pragas, reduzindo a população destas, que são de importância econômica para a agricultura. A variedade natural desses fungos é uma das suas principais vantagens neste controle, onde, através de técnicas laboratoriais aprimoradas torna-se possível a sua separação com características adequadas para serem utilizados como inseticidas biológicos. (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO, 2001).

Inúmeras espécies de insetos são controladas por *Metarhizium* e *Beauveria*, dentre os quais, destacam-se *Diatraea saccharalis*, *Plutella xylostella* (traça das crucíferas), *Ostrinia nubilalis* e *Cydia pomonella* (traça das frutas) (HUNGHERS et al., 2004). *M. anisopliae* coloniza uma ampla faixa de hospedeiros, por isso é uma das espécies mais utilizadas no controle microbiano de insetos. Esta espécie é bastante utilizada no controle de pragas que causam prejuízos às culturas de interesse agrícola em todo o mundo.

No continente africano, Maniania et al. (1994) realizaram experimentos no campo, no Quênia, para avaliar o potencial da espécie *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. Por outro lado no continente australiano, Milner et al. (1996) avaliaram 12 isolados de *M. anisopliae* contra o grilo *Teleogryllus commodus*, uma peste dos pastos, e selecionaram a linhagem FI1099 para uso no campo que induziu uma mortalidade de 40 a 60% na dosagem de $2 \text{ a } 4 \times 10^{13}$ conídios/ha 21 dias após a inoculação.

Na Europa, Chandler (1997) estudou a patogenicidade de 25 linhagens de *M. anisopliae* contra *Pemphigus bursarius*, uma peste da alfaca, do Reino Unido e observaram que somente uma linhagem foi capaz de controlar os afídeos, apresentando uma CL_{50} de $2,45 \times 10^6$ 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.

Entretanto Kanga et al. (2003) no intuito de diminuir as perdas econômicas causadas nas indústrias, avaliaram o potencial de *M. anisopliae* contra o ácaro *Varroa destructor*. Os pesquisadores relataram que o tempo necessário para a morte de 90% dos adultos em laboratório foi de 4,16 dias quando utilizado uma concentração de $1,1 \times 10^3$ conídios/mL⁻² e a CL_{90} foi de $7,13 \times 10^3$ conídios/mL⁻² quando aplicados em colméia. *M. anisopliae* também teve sua ação comprovada no continente asiático, quando Chen et al. (2000) avaliaram esta espécie no campo, para o controle de *Lissorhoptus oryzophilus*, uma praga que causa sérias perdas econômicas na cultura do arroz, na China. Os autores constataram, na fase de pré-oviposição, uma redução de 92,5% na população de adulto de *L. oryzophilus*, 13 dias pós-inoculação, quando utilizado uma concentração de 10^{14} conídios/ha.

M. anisopliae é o agente de controle biológico mais importante nas condições climáticas brasileiras, devido à variabilidade genética que resulta no surgimento de muitas linhagens com diferentes níveis de virulência, especificidade, produção de conídios, resistência à ultra-violeta e patogenicidade a vários insetos. No Brasil vêm sendo utilizado contra inseto da ordem Homoptera, da família Cercopideae, conhecidos como cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata* e *M. fimbriolata*) e das pastagens (*Zulia entreciana* e *Deois flavopicta*) (ALVES, 1998; MENDONÇA, 2005).

Magalhães et al. (2000) verificaram em estudos 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, 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. Entretanto *M. anisopliae* var. *acridum* mostrou-se melhor, produzindo mais conídios do que *B. bassiana* em 100% de umidade relativa. No mesmo sentido de obter informação sobre o biocontrole de *R. schistocercoides*, Faria & Magalhães (2001) demonstraram o uso de *M. anisopliae* var.

acridum como biorregulador de populações *R. schistoceroide*, no Brasil. Esse fungo, em condições de campo, apresenta uma taxa de redução populacional de bandos 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.

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 no controle biológico de *B. microplus*, com *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) 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*. Os resultados demonstraram que *M. anisopliae* var. *anisopliae* é menos patogênicos que *M. flavoviride* var. *flavoviride*. Entretanto, ambas as espécies controlaram este parasita com eficiência. Os mesmos autores ressaltaram também a importância de espécie *M. anisopliae* para o controle de importantes pragas como: *Anthonomus grandis*, bicudo-do algodoeiro e espécies de formigas do gênero *Atta*. Além disso, a comprovada patogenicidade de *M. anisopliae* contra insetos de interesse médico como: *Triatoma infestans*, *Glossina morsitans morsitans* (mosca-tsé-tsé) e os mosquitos *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi*.

Athayde (2002) e Athayde et al. (2001) realizaram testes de laboratório com *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *B. bassiana* em *B. microplus*. Os resultados obtidos foram satisfatórios, mostrando a eficiência destes fungos e com base nos resultados alcançados por *M. flavoviride*, sugeriram que este seja explorado como novo agente a ser investigado contra essa praga bovina. Por outro lado Nascimento (2003) avaliou em condições de laboratório, a ação de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridum* e *B. bassiana* contra *Rhipicephalus sanguineus*. Os resultados comprovaram a patogenicidade desses fungos, sugerindo assim, a utilização dos mesmos como possíveis controladores de *R. sanguineus*, o carrapato do cão.

Recentemente, Feijó (2004) verificou através de testes laboratoriais que *B. bassiana*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. flavoviride* var. *flavoviride* apresentaram ação contra ovos, larvas e adultos de *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”. No mesmo ano, Ferreira (2004) através de

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 quitinolítica. Os resultados obtidos sugeriram o desenvolvimento de estudo utilizando diferentes exoesqueletos como uma maneira de se detectar os níveis da atividade quitinolítica e a produção de quitinase com vista à seleção das linhagens fúngicas mais patogênicas às pragas de interesse veterinário e agroindustrial.

2.3 *Zaprionus indianus*

A família Drosophilidae apresenta distribuição geográfica mundial e é composta por cerca de 3.000 espécies de moscas de pequeno porte, com 2,5-3,0 mm de comprimento, de olhos vermelhos brilhantes e asas pequenas hialinas, sendo poucas espécies com manchas ou veias enfumaçadas, agrupadas em 62 gêneros, comumente chamadas de moscas-das-frutas (WHEELER, 1981; SANTOS et al., 2003). Seu corpo pode variar possuindo de cores claras a escuras, ou até mesmo apresentando ornamentações como as espécies do gênero *Zaprionus* e os drosophilideos havaianos (GRIMALDI, 1990). A ordem Diptera está entre as mais largamente estudadas na classe Insecta e de maior interesse nas áreas de genética, desenvolvimento e evolução (REIS & EBERT, 1996; FORTINI & BONINI, 2000).

O Gênero *Zaprionus* está composto atualmente por dois sub-gêneros, *Anaprionus* e *Zaprionus sensu strito* e um total de 56 espécies (TSACAS & CHASSAGNARD, 1990). É caracterizado por ter cerdas do mesonotum arrajados em arcos distintos e faixas longitudinais branco-prateadas na região dorsal da cabeça e torax. (COQUILETT, 1901).

A espécie *Z. indianus* é a mais comum do seu gênero no continente africano. Provavelmente pelo desconhecimento da ocorrência da espécie em toda região Afrotropical, Gupta (1970) propôs o epíteto *indianus* em alusão à procedência dos exemplares-tipo, coletados na Índia. De acordo com Tsacas (1985), esta espécie também encontra-se referida na literatura sobre os seguintes sinônimos: *Z. intermis*, *Z. paravittiger* e *Z. collarti*, sendo que o último foi proposto em substituição ao primeiro, publicado em 1938, pois foi constatado que o epíteto *inermis* estava pré-ocupado no gênero *Zaprionus* pelo homônimo *Z. inermis*. Por outro lado, nas últimas décadas, ela tem sido identificada incorretamente por vários autores

como sendo *Z. vittiger* Coquillett (1901), como a qual pode ser facilmente confundida se analisada exclusivamente com relação à morfologia externa (TSACAS 1985, 1990).

Z. indianus parece ter sido a única do Gênero a escapar da região de origem. Atualmente, ela está se espalhando rapidamente por áreas tropicais sendo encontradas na Índia, Arábia Saudita, nas ilhas dos oceanos Índicos, Atlânticos e recentemente invadiu a região Paleártica e o Brasil (CHASSAGNARD & KRRAIJEVELD, 1991; VILELA, 1999; TIDON et al., 2003; SANTOS et al., 2003). Trata-se de uma espécie que apresenta caracteristicamente faixas brancas estreitas e demarcadas por linhas negras paralelas que se estendem da cabeça até o final do escutelo e mesonotum (GUPTA, 1970). São moscas de abdômen claro, com fêmures das patas anteriores possuindo espinhos, complexos, longos com a segunda ponta pequena, acoplada à base (Figura 1). Numa análise mais minuciosa, observa-se que a borda da genitália masculina tem a extremidade não denteada e acoplada ao corpo do distifalus (TSACAS & CHASSAGNADR, 1990). É uma espécie polífaga, com capacidade de se desenvolver em diversos frutos de diferentes origens geográficas, facilitando assim sua expansão e como a maioria dos drosofilídeos alimentam-se fundamentalmente de bactérias e leveduras que participam da fermentação de substratos ricos em carboidratos, especialmente frutos em decomposição. Além disto, o ciclo reprodutivo relativamente rápido em ambientes de temperatura elevada e o aumento do comércio internacional de frutas são apontados como prováveis fatores para o sucesso da invasão e dispersão da espécie pelo mundo (VILELA et al., 2001).

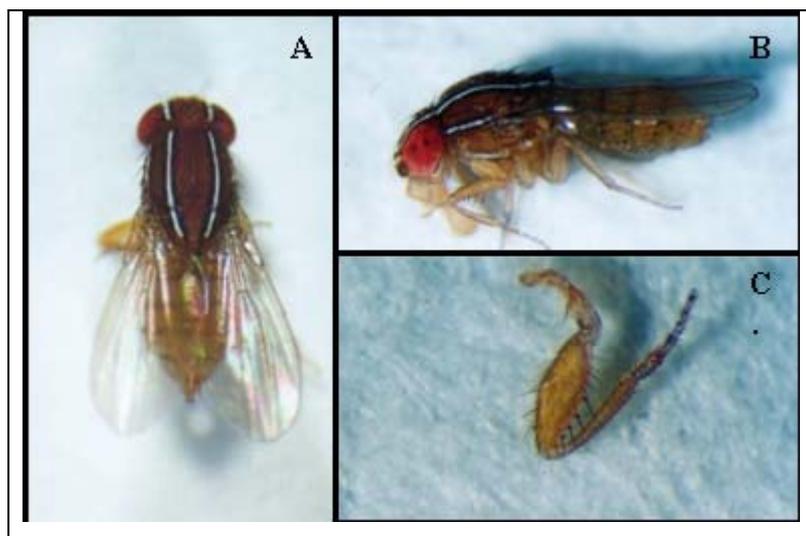


Figura 1. *Zaprionus indianus*. (A e B) Faixas brancas demarcadas por linhas negras paralelas (seta); (C) Espinhos complexos nos fêmures das patas anteriores (seta). Fonte: Campos (2005)

O primeiro registro publicado sobre a ocorrência de *Z. indianus*, no continente americano data de 1999, pelo Prof. Dr. Carlos R. Vilela do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, faz referência a exemplares observados em frutos de caqui, no município de Santa Isabel, (SP) (VILELA, 1999). Nesta mesma época, na região de Valinhos (SP), durante a safra de figo (*Ficus carica*) da variedade roxo – valinhos, foi constatada a presença de uma grande quantidade de *Z. indianus* se alimentando e fazendo postura no ostíolo do fruto em início de maturação. Uma grande quantidade de larvas também foi observada dentro de alguns frutos, tornando-os impróprios para consumo humano, assumindo um comportamento de praga incomum entre drosofilídeos (VILELA et al., 2001). (Figura 2). Além da pequena massa de ovos colocados no ostíolo, os adultos depositam bactérias e leveduras que proporcionam a fonte de alimentos para as larvas e desencadeiam o início do processo de decomposição prematuro que se propaga para o interior dos frutos, tornando-os impróprios para consumo (STEIN et al.; 1999; VILELA et al., 2001). Esse processo fermentativo associados com a infecção de frutos por estas moscas, foi atribuído à ação de uma única levedura em particular, *Candida tropicalis*, indicando uma relação muito estreita com a espécie introduzida *Z. indianus* (GOMES et al., 2005).

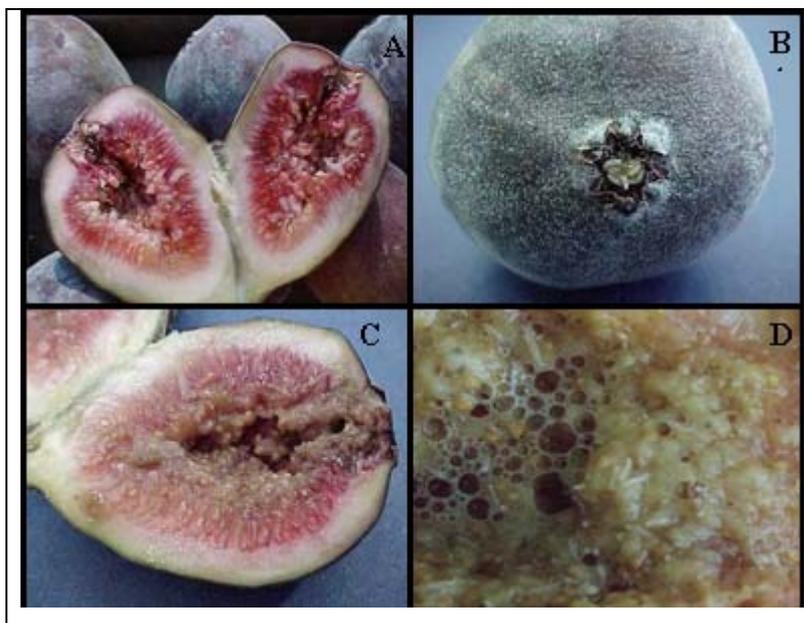


Figura 2. (A) Fruto de figo sadio; (B) Larvas de *Zaprionus indianus* no ostíolo do fruto (seta); (C) Dano em figo causado por *Zaprionus indiauns*; (D) Larvas dentro do fruto (seta). Fonte: Stein et al. (1999)

A mosca do figo já foi encontrada em 74 espécies botânicas de 31 famílias. Entre estas plantas, inúmeras são nativas do continente americano (abacate, abacaxi, cajá-mirim, goiba, mamão) ou foram aqui introduzidas (banana, carambola, cítricos, manga, nêspera, figo) (VILELA et al., 2001). Esta possibilidade é potencialmente mais danosa em regiões de fruticultura como o Vale do Rio São Francisco (Estados de Pernambuco e Bahia), onde estão estabelecidos vários agronegócios voltados para fruticultura de exportação (SANTOS et al.; 2003). O estabelecimento desse inseto como praga da fruticultura, poderá implicar em prejuízos sócio-econômicos e ambientais, em decorrência das possíveis medidas ao seu controle. O eventual emprego de controle químico poderá resultar em um aumento significativo do custo da produção e inviabilizar a exportação das frutas, uma vez em que vários países, especialmente os europeus, impõem rigorosa restrição de frutas com resíduos de determinados produtos químicos. Face às características topográficas da região, esse método de controle também poderá causar danos imprevisíveis aos ecossistemas e à saúde humana, uma vez que os agricultores residem nas propriedades e estas estão localizadas contiguamente às áreas urbanas (VILELA et al., 2001).

2.4 Marcadores Moleculares

2.4.1. PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

O desenvolvimento do processo de amplificação via PCR, causou grande impacto nos estudos genéticos, dando origem a outras classes de marcadores moleculares que têm revolucionado a genética molecular, pois funciona como uma ferramenta 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 principalmente em fungos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; LEAL-BERTIOLI, 1998; INGLIS, 1995; FUNGARO, 2000).

A reação em cadeia da polimerase é a amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, visando à produção de milhões de cópias desta sequência. A PCR explora a capacidade de duplicação do DNA. Uma fita simples de DNA é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares sob a ação da enzima polimerase do DNA, 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 sintetizado é definida pelo *primers*, que se anelam especificamente às suas sequências complementares na fita molde, delimitando o fragmento de DNA que se deseja amplificar. 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 e a solução tampão, a qual fornecerá as condições de pH e salinidade para que a síntese se processe. O microtubo 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 utilizada na reação atue, dirigido a síntese de novas cadeias. Repetindo-se esses três tipos de passos, desnaturação, anelamento e síntese, por cerca de 30 ciclos, produziremos mais de 250 milhões de cópias de uma determinada seqüência de DNA em fita dupla, uma vez que o número de cópias cresce de modo exponencial a cada ciclo. Os produtos de amplificação são separados por eletroforese em gel de agarose (FARAH, 2000). Este processo têm permitido avanços significativos em áreas aplicadas, dentre as quais a identificação de genótipos, o diagnóstico de doenças, melhoramento genético de plantas, animais e microrganismos (GARDES, 1996; FUNGARO & VIEIRA, 1998; DESTÉFANO et al., 2004).

2.4.2 Região ITS do DNA ribossomal.

O DNA que codifica para o RNA ribossomal apresenta-se como um agregado gênico, compostos pelos genes 18S, 5,8S e 28S. Estes genes são separados por regiões denominadas ITS1 e ITS2 (Figura 3), as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico maduro (WHITE et al., 1990). O uso de seqüências de rDNA apresenta vantagens de serem estáveis e ocorrem em múltiplas cópias no genoma, o que as torna facilmente amplificáveis via PCR. Além disso, algumas regiões altamente conservadas e outras variáveis têm permitido a análise de diferentes níveis taxonômicos, incluindo espécies relacionadas (EDEL et al., 1996). Todavia a região 18S é a mais conservada e por isso é utilizada apenas na comparação de organismos distantemente relacionados. A porção 28S é a mais variável, sendo apropriada para a comparação para a comparação de diferentes gêneros ou, em alguns casos de diferentes espécies. As regiões ITS evoluem rapidamente sendo apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. O fato das regiões serem flanqueadas por segmentos conservados, serem relativamente curtas 500 a 800pb e aparecem em grande número de cópias no genoma permite que sejam amplificadas e seqüenciadas com facilidade (FUNGARO, 2000; GUIMARÃES & SÁ, 2002).

Segundo Leal-Bertioli (1998) as informações de regiões conservadas permitem a construção de iniciadores para sua amplificação a partir de genomas diversos. As análises podem ser obtidas da presença ou ausência de produtos, clivagem dos produtos de PCR, gerando RFLPs, assim como o sequenciamento direto dos mesmos. Os exemplos mais comuns para estes são a amplificação de genes de rRNA, mtRNA, tRNA e microssatélites. Paul (2001) ressalta que o DNA ribossomal nuclear é constituído por regiões transcritas e não transcritas. ITS1 e ITS2 são regiões variáveis e podem ser amplificadas pela técnica PCR usando iniciadores universais ITS5 e ITS4. O mesmo autor utilizou esta técnica para comparar *Pythium longandrum* sp nov. com espécies correlatadas. As técnicas de amplificação e posterior sequenciamento do gene 5.8S com regiões intergênicas (ITS1 e ITS2) também foram aplicadas para *Metarhizium*. A análise filogenética dos dados do sequenciamento mostrou que *M. anisopliae* constitui um grupo monofilético, e *M. flavoviride* e *M. album* representam duas linhagens evolucionárias separadas (CURRAN et al., 1994; SOSA-GÓMEZ et al., 1998).

Uma ferramenta bastante apropriada para análises de DNA, é a investigação sobre as variações no tamanho dos fragmentos gerados de distintas amostras de DNA clivadas com enzimas de restrição, pela comparação entre o número e tamanho dos fragmentos produzidos pela digestão do DNA com ou sem uma posterior etapa de hibridização com sondas marcadas (MARQUES et al., 2002). As enzimas de restrição cortam o DNA em sítios específicos, onde cada enzima reconhece uma seqüência característica de nucleotídios. A alteração em ao menos um nucleotídio pode criar ou destruir um sítio de restrição. Por isso, quando existe variação ou polimorfismo entre indivíduos na posição dos sítios de corte e no comprimento de DNA entre eles, ocorrem fragmentos de restrição de diferentes tamanhos (SANTOS, 2001). A combinação de amplificação da região ITS e a restrição dos produtos de amplificação (RFLP-ITS) pode ser útil para identificar a maioria dos fungos ao nível de espécie ou grupos de espécies. Este método é rápido, simples, relativamente barato e facilmente adaptável para novos grupos de fungos (GARDES & BRUNS, 1996).

Análises de restrição de ITS e 5.8 de ITS têm auxiliado na taxonomia de espécies fúngicas. (NEUVÈ et al., 1994; LEAL, 1996) observaram nas espécies *Beauveria brongniartii* e *M. anisopliae* alta variabilidade intraespecífica, sendo esta região útil para caracterização de isolados destas espécies. Pipe et al. (1995) analisaram RFLPs de genes rRNA em *Metarhizium*

observando a homogeneidade dos isolados brasileiros que foram obtidos de dercopídeos, distinguindo-se dos isolados de *M. flavoviride*, embora tenham sido obtidos do mesmo hospedeiro, nas Filipinas. Driver et al. (2000) baseado nas seqüências do gene ribossomal 28S, analisaram 123 linhagens de *Meatarhizium*, sugerindo duas novas variedades para as espécies *M. anisopliae* e *M. flavoviride*.

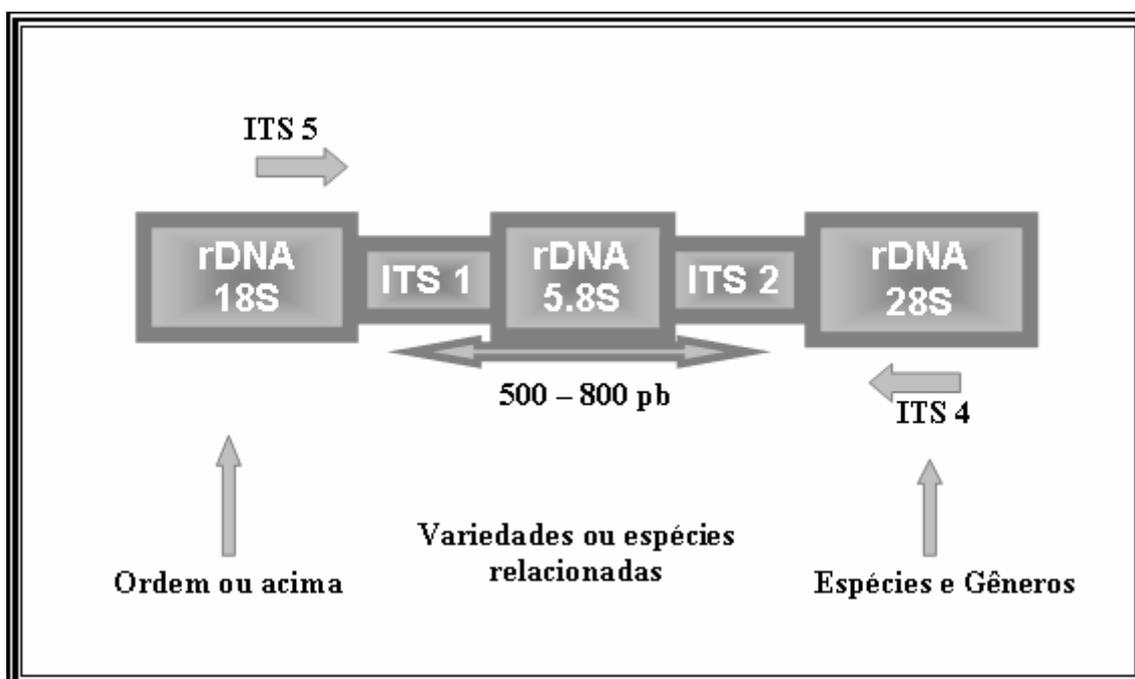


Figura 3. Estrutura do agregado gênico com representação das regiões ITS1, ITS2 e a subunidade 5.8S do rDNA com iniciadores ITS5 e ITS4. Adaptado de Fungaro (2000).

2.4.3 Microssatélite

As regiões de microssatélites são também conhecidas como seqüências simples repetidas (SSR- Simple Sequence Repeats) e consistem de pequenas seqüências com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento que repetem em *tandem* em um dado locus distribuídos ao longo do genoma. Tais seqüências são mais freqüentes nos genomas dos eucarióticos, distribuindo ao acaso e formam *loci* genéticos muito mais polimórficos do que os *loci* hiperpermeáveis constituídos por minissatélites (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Os motivos de microssatélites são pequenos, usualmente menores do que 10-pb (RICHARD et al., 1999; GUY-FRANCK & PÂQUES, 2000).

Repetições de nucleotídeos envolvendo as bases A ou T são muito mais freqüentes do que repetições com as bases G ou C. Por outro lado, no caso dos dinucleotídeos, as seqüências repetidas CA e CT são mais comuns do que as repetições CG. Embora os microssatélites ocorram na maioria das vezes em posições extragênicas ou dentro de *introns*, seqüências deste tipo também foram descritas em regiões codificantes dos genes (FARAH, 2000). Os métodos que detectam o polimorfismo nos *loci* de seqüências repetidas simples geram um grande número de alelos detectáveis oferecendo boa reprodutibilidade.

Estes marcadores têm revolucionado algumas áreas da genética, sendo bastante utilizados para mapeamento genético e físico de genomas, para identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (GROPPE et al., 1995; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Devido a sua alta mutabilidade os microssatélites possuem um significativo papel na evolução do genoma produzindo e mantendo a variação genética quantitativa (KASHI et al., 1997). O alto grau de mutações altera os seus comprimentos e conseqüentemente, estas mudanças resultam em polimorfismo entre indivíduos. Este alto grau de polimorfismo que detecta permite uma discriminação precisa entre indivíduos proximamente relacionados. Além de serem altamente polimórficos, os microssatélites usam quantidades mínimas de DNA, equivalentes às usadas no RAPD. As condições de amplificação e da reação são espécies-específicas e a variação na quantidade de produtos amplificados pela PCR é resultado do número de unidades repetidas (BECERRA & PAREDES, 2000).

Marcadores moleculares baseados em microssatélites podem ser obtidos para a discriminação de Taxa, o que é chamado de “*microsatelite fingerprinting*”. Este método tem

sido testado em vários fungos, detectando polimorfismo inter e intraespecíficos, auxiliando também nos estudos de melhoramento genético de plantas. A utilização da técnica tem auxiliado a identificação e caracterização de fungos (LEAL-BERTIOLI, 1998; ENKERLI et al., 2001; AVENOT et al., 2005; ENKERLI et al., 2005).

Os *primers* de microssatélites com motivos de (AT)_n, (CA)_n, (CT)_n, (GT)_n, (TG)_n, (ACA)_n, (ACC)_n, (ACG)_n, (ACT)_n, (AGC)_n, (AGG)_n, (AGT)_n, (ATC)_n, (GAC)_n, (GTG)_n, (GACA)_n, (GATA)_n, (TGTC)_n são usualmente utilizados para amplificação de regiões repetidas. Esta ferramenta produz padrão de amplificação que revela o possível polimorfismo de DNA na seqüência de nucleotídios entre os dois sítios de microssatélites no genoma de fungos, gerando o que é denominado de perfil ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*).

2.4.4. Intron Splice Site Primer

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

Os *introns* podem ser classificados em 4 classes gerais, *intron* do grupo I, *intron* do grupo II, *intron* de mRNA nuclear e *intron* do tRNA nuclear baseadas no mecanismo de *splicing* (CECH, 1990; SUGA *et al.*, 2000). Os *introns* do Grupo I e do Grupo II são classificados de acordo com suas organizações internas e têm uma capacidade intrínseca de auto-remoção por montagem (BRASILEIRO 2003). Podem ser utilizados como marcadores moleculares, podendo implementar informações valiosas para o estudo das relações taxonômicas e dos estudos de diversidade intra e interespecífica, bem como, estudos de heterogeneidade com *introns* de genes que codificam proteínas, como β-tubulina (HAN *et al.*, 2002). Em estudo realizado com *M. anisopliae* var. *anisopliae*, foram identificados *introns* do grupo I em espaços na região 28S do rDNA revelando a presença de 5 grupos distintos desta estruturas em diferentes sítios de inserção (MAVRIDOU *et al.* 2000). Pires (2002) utilizou o iniciador EI1 para investigar a diversidade genética de vinte linhagens de *B. bassiana*, obtendo cinco grupos distintos.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de Realização dos Experimentos

Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco e Laboratório de Citologia e Genética do Departamento de Micologia da UFPE.

3.2. Linhagens fúngicas utilizadas

As linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* CG (291) e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Bio2) foram fornecidas pela Micoteca (URM) do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. A linhagem de *Fusarium soloni*, utilizada como out grup, foi coletada da mandioca (*Manihot esculenta*).

3.3. Linhagens da mosca utilizadas

A linhagem VV1 da mosca-do-figo *Zaprionus indianus* é criada rotineiramente no Laboratório de Genética Animal da UFPE, não havendo dificuldade para obtenção de grande número de larvas, conforme a metodologia de Campos (2003).

3.4. MEIOS DE CULTURA

3.4.1. Meio Batata-Destrose-Ágar (BDA)-OXOID

3.4.2 Meio Mínimo (PONTECORVO et al. 1953)

| | |
|---|--------|
| NaNO ₃ | 6,0g |
| KH ₂ PO ₄ | 1,5g |
| KCl..... | 0,5g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O..... | 0,5g |
| FeSO ₄ | 0,01g |
| ZnSO ₄ | 0,01g |
| Glicose..... | 10g |
| Água destilada q.s.p. | 1000mL |

3.4.4. Meio para *Drosophila*

| | |
|--------------------------------------|-------|
| Água destilada..... | 800mL |
| Banana madura amassada..... | 50g |
| Farinha de milho..... | 100g |
| Fermento fresco..... | 30g |
| Nipagin em 10 mL de álcool 95° | 4g |

3.5. ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DETECTADA POR MARCADORES MOLECULARES

3.5.1. Obtenção de micélio para extração do DNA genômico

Os fungos obtidos de culturas monospóricas, foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de Meio Mínimo líquido. Após inoculação foram mantidos sob agitação de 250 giros a 28⁰C por 120 horas. Em seguida, o micélio foi coletado por filtração a vácuo e lavado com água destilada autoclavada. Foi determinado o peso úmido para a extração do DNA e estocado a -20⁰C.

3.5.2 Extração de DNA

A Extração do DNA foi realizada pela técnica de Raeder & Broda (1985). O Micélio foi triturado em nitrogênio líquido até a completa pulverização e transferido para tubos de microcentrífuga onde se adicionou 800µl de tampão de extração (Tris-HCl 200mM pH 8.0; NaCl 250mM; EDTA 25mM; Dodecil Sulfato de Sódio 1%). Após homogeneização, os microtubos de microcentrifuga foram incubados por 15 minutos a 65⁰C. Posteriormente, foram realizadas as extrações com fenol saturado (Invitrogen Life Technologies). A fase aquosa foi recuperada e transferida para um novo tubo de microcentrífuga e adicionou-se um volume de clorofane (fenol e clorofil na propoção 1:1). Mas uma vez foi homogenizado e centrifugado a 12000 giros por 15 minutos. A fase aquosa foi recuperada e transferida para um novo tubo de microcentrífuga onde foi adicionado um volume de clorofil (clorofórmio e álcool isoamilico na proporção 24:1), e novamente centrifugado. Recuperou-se mais uma vez a fase aquosa, que foi colocada em outro tubo de microcentrifuga, adicionou-se o NaCl 0,3M e dois volumes de etanol absoluto resfriado a -20⁰C, fase em que foi possível visualizar o DNA precipitado. As amostras foram submetidas novamente a centrifugação a 12000 giros por 15

min, para promover a fixação de DNA de tubo de microcentrífuga. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionou-se etanol 70% e centrifugou-se para lavagem do DNA. O sobrenadante outra vez foi descartado e os tubos invertidos para secagem completa do DNA. Este foi cuidadosamente ressuspendido em tampão TE pH 8,0 (Tris-Hcl 1M e EDTA 0,5) e guardado sob refrigeração a 4⁰C. (Figura 4)

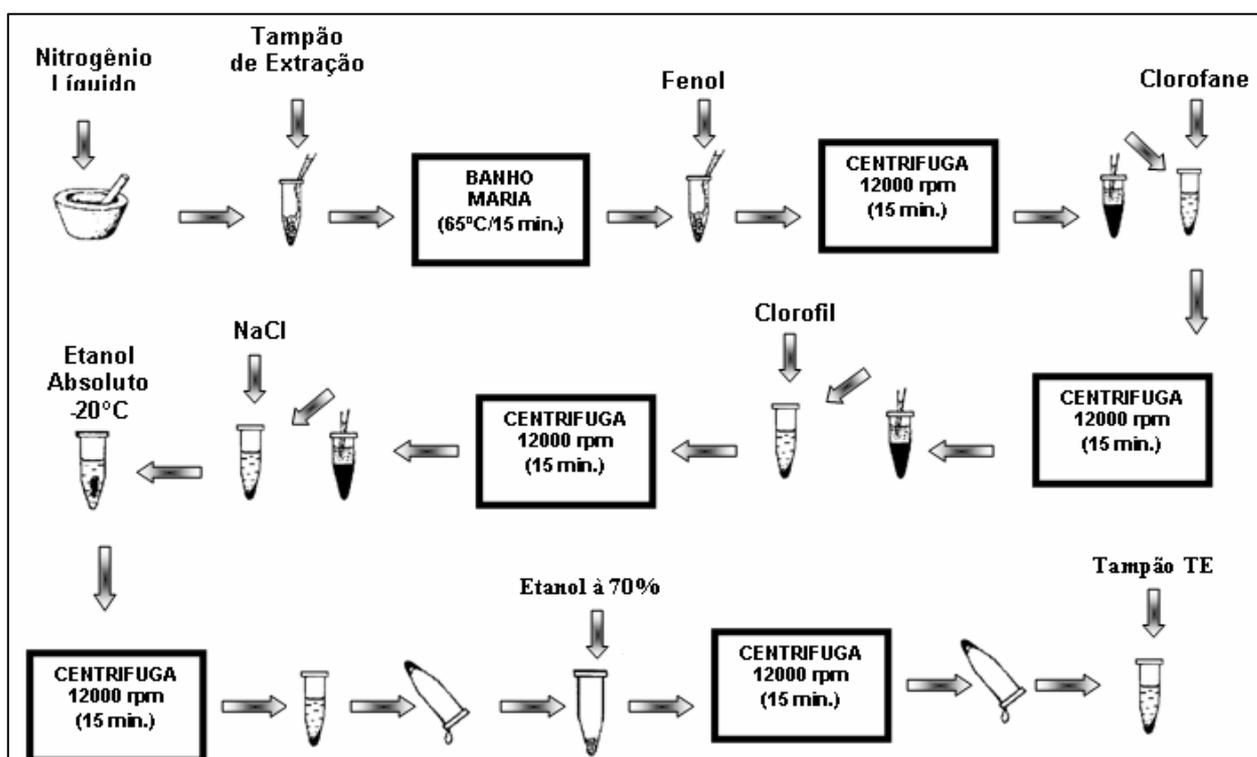


Figura 4. Representação esquemática da técnica de extração de DNA para fungos filamentosos.
Fonte: Brasileiro (2003)

3.5.3. Quantificação do DNA

A quantificação foi realizada por espectrofotometria utilizando-se comprimento de onda de 260nm após diluição das amostras de 1:200. Para o cálculo da concentração de DNA utilizou-se a relação $1 \text{ DO} = 50\mu\text{g/mL}$ (SAMBROOK *et al.* 1989).

3.5.4. Amplificação de DNA pela técnica de PCR

Após quantificação do DNA, as amostras foram diluídas em água milli-Q para uma concentração final de $5\text{ng}/\mu\text{l}$ em um volume de $50\mu\text{l}$. As amostras de DNA foram submetidas a PCR utilizando *primers* descritos na Tabela 1 nas condições descritas abaixo em termociclador MJ Research.

Tabela 1. *Primers* utilizados para amplificar o DNA das linhagens de *Metarhizium*

| Iniciadores | Seqüências | Marcador molecular | Referências |
|---------------------------|---|--------------------|---|
| (GTG) ₅ EI1 | GTGGTGGTGGTGGTG CTGGCTTGGTGTATGT | ISSR Intron | Liecfef <i>et al.</i> (1993) Barros-Lopes <i>et al.</i> (1996) |
| ITS4 ITS5 | TCCTCCGCTTATTGTATGC GGAAGTAAAAGTCGTAACAA | rDNA rDNA | Whit <i>et al.</i> (1990) Whit <i>et al.</i> (1990) |

3.5.4.1 Região ITS do rDNA

As reações de amplificação foram feitas para um volume final de $25\mu\text{L}$: do tampão (Tris-HCl 20mM pH 8,4; KCl 50mM) Mg Cl₂ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, 12,5 pmols do indicador, Taq DNA polimerase 2U (Invitrogen Life Technologies) e 50ng do DNA, conforme descrito por White *et al.* (1990). Para amplificação de região ITS foi utilizado o termociclador (MJ Research) com a seguinte programação: desnaturação inicial 95°C por 4 minutos, 40 ciclos a 92°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de amplificação dos *locus* ITS-5.8S-ITS2 do rDNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% a V/cm em tampão de corrida 1X TBE (pH 8,0), utilizando-se marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen Life Technologies). Os produtos de amplificação foram corados em solução de Brometo de etídio

por 20 minutos em gel de agarose, observado em transluminador ultravioleta e fotografados em sistema Polaroid.

3.5.4.2. Microssatélites (GTG)₅

As reações de amplificação foram feitas para volume final de 25 μ L nas seguintes condições: tampão (Tris-HCl 20mM pH 8,4; KCl 50mM), MgCl₂ 0,75Mm, dNTP 0,25 μ m, 0,25 μ m do primer, *Taq* DNA polimerase 0,1U (Operon Technologies CA) e 50ng de DNA.

Para a amplificação foi utilizando o termociclador (Hibaid) com a seguinte programação: um ciclo de desnaturação de cinco minutos a 94°C seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 90 segundos e extensão final a 72°C por seis minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,3%, a 3 V/cm⁻¹ em tampão de corrida 1X (pH 8,0), utilizando-se marcador de peso molecular 1 Kb(Invetrogen Life Technologies). O gel após a migração eletroforética, foi corado em solução de brometo de etídio por 20 minutos, observado em transluminador ultravioleta e fotografado em sistema Polaroid.

3.5.4.3 Intron Splice Site Primer

As reações de amplificação foram feitas para um volume final de 25 μ m nas seguintes condições: tampão (Tris-HCl 20mM pH 8,4; KCL 50mM), MgCl₂ 3mM, dNTP 0,25 μ m, 0,25 pmols do *primer*, *Taq* DNA polimerase 0,1U (Operon Technologies CA) e 50ng de DNA, como descrito por Barros Lopes et al. (1996). Para a amplificação foi utilizando o termociclador (Hibaid) com a seguinte programação: uma etapa de desnaturação 94°C por 3 minutos seguido de 40 ciclos de 1minuto a 94 °C, 2 minutos a 45°C e 1 minuto e 30 segundos a 74 °C, seguido por uma extensão final de 5 minutos a 74 °C. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,3%, a 3 V/cm⁻¹ em tampão de corrida 1X TBE (pH 8,0), utilizando-se marcador de peso molecular 1Kb (Invetrogen Life Technologies). O gel após a migração eletroforética, foi corado em solução de brometo de etídio por 20 minutos observado em transluminador ultravioleta e fotografado em sistema polaroide.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos pelos três marcadores moleculares foram analisados pelo programa NTSYS-PC (*Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs*) (ROHLF, 1988). Esses dados foram introduzidos na forma de variáveis binárias, ou seja, o número 1(um) indicando a presença de bandas, e o número (zero), ausência. Desse modo, foi construída uma matriz de similaridade, utilizando-se o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1908) calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$J = A/(P-D)$ onde: A = Número de concordância positivas, ou seja, de variáveis presentes;

P = Número total de variáveis;

D = Número de concordâncias negativas, ou seja, variáveis ausentes.

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

3.7. TESTE DE PATOGENICIDADE

3.7.1. Bioensaios

Os bioensaios foram elaborados para avaliar a patogenicidade de *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae* sobre as larvas de 3^o. estágio da mosca-do-figo, sendo realizados em sala climatizada a $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa a $60 \pm 10\%$.

3.7.2. Suspensões de esporos fúngicos

Sacos de prolipropileno contendo 100g de arroz parboilizado, previamente autoclavado, foram inoculados, foi inoculado com 10mL da suspensão de 10^8 conídios/mL dos fungos crescidos durante 12 dias em BDA. Após a inoculação, foi realizada a homogeneização do arroz contido nos sacos e incubados em BOD a $\pm 1^{\circ}\text{C}$, e após 12 dias, foram mensuradas as concentrações utilizadas.

3.7.3. Quantificação do inóculo

A contagem de conídios foi feita com auxílio de câmara de Neübauer, segundo a metodologia de Moraes & Alves (1986). Um grama de arroz, contendo o fungo, foi homogeneizado em 100 mL de água destilada com “Tween” 80 (0,05% v/v). Após agitação, a suspensão foi quantificada e ajustada para uma concentração de 10^8 conídios/mL. A partir desta, foram feitas diluições sucessivas até se obter as concentrações 10^7 , 10^6 , 10^5 e 10^4 conídios/mL.

3.7.4. Infecção “in vitro” de larvas de *Z. indianus*

O bioensaio foi realizado com um grupo controle contendo água destilada com “Tween” 80 (0,05% v/v) e cinco tratamentos nas concentrações de 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 conídios/ml. Para cada concentração testada, foram utilizadas cinco repetições com 10 larvas e cada bioensaio foi repetido 3 vezes. As larvas foram colocadas em placas de Petri contendo 10mL de cada suspensão, durante 1 minuto. Em seguida as placas foram invertidas para o escoamento do excesso da suspensão. As larvas foram mantidas em vidros com o meio para *Drosophila* em BOD a $\pm 25^\circ\text{C}$ para observação diária do percentual de emergência das moscas segundo a técnica de ALVES (1998), modificada.

3.7.5. Reisolamento do fungo a partir das larvas e pupas *Z. indianus*

Uma parcela das larvas e pupas mortas foi lavada em solução de hipoclorito de sódio a 4%, álcool a 70% e água deionizada, por 1 minuto em cada solução. Para cada lavagem, secos em papel de filtro autoclavado e incubados em BOD a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ com 80% de umidade relativa, onde foram observadas a conidiogênese dos fungos. O fungo reisolado foi semeado em BDA de conformidade com ALVES (1998), para obtenção de micélio para extração do DNA genômico.

3.7.6. Análise Estatística

Para análise dos dados foi utilizada técnica de estatística inferencial e foram utilizados os testes: t-Student com variâncias iguais ou desiguais e o teste de Mann-Whitney (para a comparação entre as espécies fúngica em cada concentração com 8 dias de avaliação) e teste F através da técnica ANOVA (para a comparação entre as concentrações em cada espécie fúngica com 8 dias de avaliação) e os testes de comparações pareadas de Tukey com variâncias diferentes para a comparação entre os pares de concentrações em cada espécie.

Os dados foram digitados e processados no programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 11. A margem de erro ou nível de significância utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teste de Patogenicidade

As investigações sobre o percentual de emergência das moscas adultas a partir de larvas de 3º estágio da mosca *Z. indianus* infectadas por *M.anisopliae* var. *acridum* e *M.anisopliae* var. *anisopliae* demonstraram de um modo geral que as duas linhagens apresentaram elevada patogenicidade, diferindo estatisticamente do grupo controle que não foi observada mortalidade causada pelos fungos. O número médio de moscas que emergiram 8 dias pós inoculação está sumarizado na Tabela 2. Os resultados permitiram assegurar que o número de emergência das moscas foi inversamente proporcional à concentração utilizada e que o número de emergência variou de 9,40 e 1,33% nos tratamentos de menor concentração (10^4 conídios/mL) e maior concentrações (10^8 conídios/mL), quando utilizado *M. anisopliae* var. *acridum*. Para *M. anisopliae* var. *anisopliae* o número de emergência variou de 9,33 e 1,33% nas concentrações de 10^4 e 10^8 conídios/mL, não apresentando estatisticamente diferenças significantes entre os dois fungos, com exceção da concentração de 10^5 onde o número de emergência foi de 8,47 e 7,00% para *M.anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae*. No entanto quando feitas comparações pareadas entre as concentrações observou-se que em *M. anisopliae* var. *acridum*, com exceção das comparações do controle (9,87%) com 10^4 (9,40%) e 10^5 (98,47) e das concentrações de 10^7 (2,60%) com 10^8 (1,33%), os demais pares mostraram diferenças significantes. Já em *M. anisopliae* var. *anisopliae* as comparações que não demonstraram diferença significativa foram entre o controle (9,87%) e a concentração de 10^4 (9,33%) e entre as concentrações de 10^7 (1,67%) com 10^8 (1,33%). Esse modo de ação, também, foi reportado por Carswell et al. (1998) com *M. anisopliae* contra a *Musca domestica* e da mosca da fruta *Bactrocera tryoni* obtendo 100% de mortalidade das duas espécies após 9 dias pós-inoculação. Herrera et al. (1999) avaliaram em laboratório 10 isolados de *M. anisopliae* contra *B. tabaci* no campo e observaram bons resultados quando utilizado a concentração de 10^7 conídios/mL de cada isolado aplicado nas ninfas de *B. tabaci*. Freitas et al. (2001) avaliando também a patogenicidade de *M. anisopliae* contra a mosca *B. tabaci* observaram 72,60% de mortalidade contra ninfas tratadas. Athayde et al. (2001), em trabalhos conduzidos sobre estudo da biologia do carrapato bovino (*Boophilus microplus*) sobre a ação de *M. anisopliae*, *Metarhizium flavoviride* (atualmente *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*) e *Beauveria bassiana* em concentrações de 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 conídios/mL e encontrou resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho.

Os dados obtidos sobre o ritmo de emergência de adultos a partir de larvas de 3º estágio infectadas de *Z. indiauns* (Tabela 3) demonstraram que os sintomas de infecção foram observados pela diminuição do ritmo de emergência quando comparado com o controle, visto que no controle foi detectado (23,58%) de emergência no 3º dia, enquanto nas concentrações utilizadas foi detectada emergência de (5,33%) na concentração de 10^4 conídios/mL para *M. anisopliae* var. *acidum* e para *M. anisopliae* var. *anisopliae* foi detectada emergência de (6,00%) e de (2,67%) nas concentrações de 10^4 e 10^5 conídios/mL respectivamente, a partir do 4º dia. Os resultados assemelham-se aos dados relatados por Feijó (2004) ao estudar a biologia de *Chrysomya albiceps* sobre a ação de *M. anisopliae* onde detectou emergência dos adultos a partir do 4º dia. Os dados mostram que durante todo o período de avaliação o percentual de moscas que emergiu variou de uma linhagem para outra, com diferenças entre as concentrações utilizadas, porém, no 8º dia foi observado o mesmo percentual de emergência (13,33%) na concentração 10^8 conídios/mL para as duas linhagens utilizadas. Darwish & Zayed (2002) enfatizaram que os efeitos da infecção em larvas são demonstrados em estágios posteriores, como a redução da emergência de adultos. Os resultados permitiram assegurar também, que 10^8 conídios/mL apresentou o menor índice de emergência de moscas tanto para *M. anisopliae* var. *acidum* quanto para *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Figueiredo et al. (2002) obtiveram resultados semelhantes ao utilizarem a concentração 10^8 conídios/mL de *M. anisopliae* em larvas de *Castnia licus* (broca gigante da cana de açúcar), não observando diferenças significantes entre as linhagens utilizadas no estudo. O trabalho demonstrado por Feijó (2004) sobre a ação de *M. anisopliae* var. *acidum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *B. bassiana* sobre *C. albiceps* assemelha-se ao encontrado nesse trabalho, indicando que a concentração de 10^8 conídios/mL apresentou menores índices de emergências de moscas. Lima (2005) também observou que esta concentração alcançou alto índice de mortalidade em larvas de *Diatraea saccharalis*. O sintoma de infecção também foi observado pela exteriorização dos conídios (conidiogênese) no corpo do inseto colonizado. No início da conidiogênese as larvas e pupas apresentaram coloração branca passando para verde nos dias seguintes, devido o amadurecimento dos conídios.

A capacidade de sobrevivência e virulência desse agente foi ressaltada por Alves (1998), relatando que *M. anisopliae* é o melhor agente fúngico contra insetos nas condições climáticas brasileiras, devido principalmente à variabilidade genética que resulta no aparecimento de muitas linhagens com diferentes níveis de agressividade, especificidade, produção de conídios, resistência à ultravioleta e patogenicidade a vários insetos. Já que as condições ambientais exercem grande influência sobre os entomopatógenos e sendo essas

adversas, o controle microbiano torna-se prejudicado, justificando-se as pesquisas com finalidade de se selecionar, induzir e melhorar linhagens que apresentam características úteis para o êxito de seu emprego no campo (AZEVEDO, 2000).

Os dados obtidos com a utilização de *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae* demonstraram que os fungos têm ação patogênica para *Z. indianus*, expressando elevado potencial de infecção, podendo ser utilizado em programa de controle biológico dessa mosca.

Tabela 2 – Média e desvio do número de moscas que emergiram por vidro, infectadas por *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* após 8 dias avaliação

| Concentração | Fungo | | Valor de p |
|-----------------------|---|--|---------------------------|
| | <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> Média ± Desvio padrão | <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> Média ± Desvio padrão | |
| Controle | 9,87 ^(A) ± 0,35 | 9,87 ^(A) ± 0,35 | p ⁽¹⁾ = 1,0000 |
| 10⁴ | 9,40 ^(A) ± 0,74 | 9,33 ^(A) ± 0,72 | p ⁽¹⁾ = 0,7660 |
| 10⁵ | 8,47 ^(A) ± 2,00 | 7,00 ^(B) ± 1,96 | P ⁽¹⁾ = 0,0510 |
| 10⁶ | 4,80 ^(C) ± 1,21 | 4,87 ^(C) ± 2,39 | P ⁽²⁾ = 0,9240 |
| 10⁷ | 2,60 ^(D) ± 1,59 | 1,67 ^(D) ± 1,29 | P ⁽³⁾ = 0,0890 |
| 10⁸ | 1,33 ^(D) ± 1,59 | 1,33 ^(D) ± 1,50 | P ⁽¹⁾ = 0,9470 |
| Valor de p | p ⁽⁴⁾ < 0,0001* | p ⁽⁴⁾ < 0,0001* | |

Medidas seguidas da mesma letra não diferem estaticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% probabilidade.

Tabela 3 – Percentual do ritmo de emergência de *Zaprionus indianus* infectadas por *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* durante 8 dias avaliação

| Fungo | Concentração | Dias de avaliação | | | | | |
|---|--------------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> | Controle | 23,58 | 24,67 | 58,67 | 86,67 | 94,00 | 98,67 |
| | 10^4 | 0,00 | 5,33 | 28,67 | 59,33 | 82,00 | 94,00 |
| | 10^5 | 0,00 | 0,00 | 23,33 | 58,95 | 77,33 | 84,67 |
| | 10^6 | 0,00 | 0,00 | 20,67 | 36,00 | 42,67 | 48,00 |
| | 10^7 | 0,00 | 0,00 | 2,00 | 18,67 | 24,00 | 26,00 |
| | 10^8 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,33 | 12,00 | 13,33 |
| <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> | Controle | 23,58 | 30,67 | 67,33 | 88,00 | 92,00 | 98,67 |
| | 10^4 | 0,00 | 6,00 | 30,00 | 48,00 | 73,33 | 93,33 |
| | 10^5 | 0,00 | 2,67 | 26,67 | 47,67 | 60,67 | 70,00 |
| | 10^6 | 0,00 | 0,00 | 20,00 | 36,00 | 45,33 | 48,67 |
| | 10^7 | 0,00 | 0,00 | 2,00 | 10,67 | 15,33 | 16,67 |
| | 10^8 | 0,00 | 0,00 | 2,00 | 10,00 | 10,67 | 13,33 |

4.2. ANÁLISE DAS REGIÕES DE MICROSSATELITE, *INTRON* E ITS ANTES DA INFECÇÃO DE *ZAPRIONUS INDIANUS*

O perfil de amplificação das regiões de SSR com o iniciador (GTG)₅ e o perfil de amplificação da região *intron*, utilizando o iniciador EI1 nas linhagens de *M. anisopliae* antes de passar por *Z. indiauns* e *Fusarium solani* esta ilustrado na Figura 5. *M. anisopliae* var. *acridum* apresentou 15 fragmentos variando em torno de 300 a acima de 2070pb. *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou 13 fragmentos variando em torno de 300 a acima de 2070pb e *Fusarium solani* apresentou 14 fragmentos variando de 310pb a acima 2070pb, utilizando o iniciador (GTG)₅. Para o iniciador EI1 foram evidenciados 11 fragmentos variando em torno de 510 pb a 2070pb e 12 fragmentos variando de 510 pb a 1800pb para *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae* respectivamente. *Fusarium solani* apresentou 6 fragmentos variando aproximadamente de 410 a 1100pb.

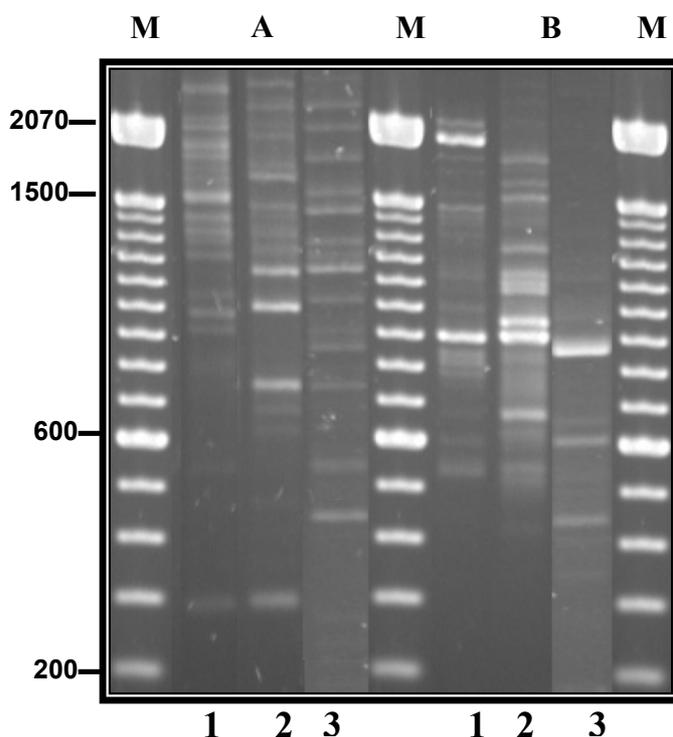


Figura 5. Perfil de amplificação de DNA das 2 linhagens de *Metarhizium anisopliae* e *Fusarium solani* das regiões de (GTG)₅ (A) e *Intron* (B). Nas pistas M, marcador de peso molecular 100 pb; Nas pistas 1, 2 e 3, encontram-se o DNA das linhagens *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Fusarium solani*.

Na análise do dendrograma da região de microssatélite (Figura 6) pode-se observar que o iniciador (GTG)₅ mostrou-se bastante eficiente em detectar variabilidade intraespecífica nas linhagens de *M. anisopliae* e *Fusarium solani*, evidenciando a segregação dos genótipos das linhagens de *Metarhizium* e de *Fusarium solani*. As duas linhagens de *Metarhizium* apresentaram cerca de aproximadamente 60% de similaridade entre si e cerca de 15% de fragmentos comuns com *F. solani*. Resultados semelhantes obteve Lima (2005) analisando o perfil de amplificação com o mesmo marcador constatando que o iniciador (GTG)₅ foi eficiente em detectar diferenças entre linhagens de *M. anisopliae*.

A análise do dendrograma referente à região de *Intron* (Figura 7), mostrou maior variabilidade genética do que a do dendrograma da região de microssatélite entre as linhagens de *Metarhizium* e *Fusarium*, notando-se *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentaram cerca de 60% de similaridade entre si e *F. solani* com cerca de 7% de similaridade com essas linhagens, mostrando alta dissimilaridade com diferenças genômicas que realçam a relação interaespécifica com as linhagens de *Metarhizium* e *F. solani*. A diversidade genética encontrada com os iniciadores EI1, neste trabalho, também foi observada em *Beauveria bassiana* (Pires, 2002) que constatou alta similaridade entre as linhagens. Mavridou et al. (2000) em estudo realizado com *M. anisopliae* var. *anisopliae*, identificou *introns* do grupo I na região 28S do rDNA revelando a presença de 5 grupos distintos desta estrutura em diferentes sítios de inserção. A variabilidade genética encontrada nas regiões de *intron* com *primer* EI1 neste estudo foi também detectada em *S. cerevisiae* no trabalho de Barros-Lopes et al. (1996) que conseguiram demonstrar o polimorfismo genético em linhagens de levedura comerciais via PCR, obtidos com 4 *primers* que são complementares para *intron splice sites* demonstrando o polimorfismo genético, em linhagens de leveduras comerciais. Por outro lado, Pataro et al. (2000) detectaram a alta variabilidade molecular observada entre linhagens isoladas de vários tanques com diferentes idades de fermentação durante a produção de aguardente em 3 destilarias do estado de Minas Gerais, utilizando o *primer* EI1. Brasileiro et al. (2004) também detectou alta variabilidade molecular intraespecífica entre as linhagens de *Fusarium solani* isolados de diferentes hospedeiros, através do iniciador EI1. Lima (2005) empregou o iniciador EI1 e para investigar o polimorfismo entre 15 linhagens de *Metarhizium anisopliae* evidenciando alta similaridade entre as linhagens. A autora também constatou que o iniciador de microssatélite foi mais eficiente em detectar diferenças entre as linhagens, contrastando com os dados obtidos neste trabalho, onde foi evidenciado que os iniciadores de microssatélite (GTG)₅ e *intron* apresentaram a mesma sensibilidade em detectar diferenças, constituindo-se em ferramentas

extremamente úteis e apropriadas para medir e caracterizar a variabilidade genética ao nível inter e intraespecífico.

Barve et al. (2001) utilizaram 13 iniciadores de microsatélites para estudar a variabilidade genética de 4 raças de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*. Estes autores verificaram que apenas os primers (AGT)₅, (ATC)₅ e (GATA)₄ foram polimórficos. Não há referência na literatura corrente sobre o uso do iniciador (GTG)₅ para analisar a diversidade genética inter e intraespecífica em linhagens do gênero *Metarhizium*. Isto sugere que o (GTG)₅ pode apresentar potencial para detectar diferenças genéticas entre linhagens de *M. anisopliae*, como foi postulado para outras espécies de fungos, como *S. cerevisiae* (LIECKFELDT et al., 1993; BALEIRAS COUTO et al., 1996), *Suillus grevillei* (ZHIHUA et al., 2000), *S. paradoxus* (NAUMOVA et al., 2000), *Cenococcum geophilum* (PORTUGAL et al., 2001), *Phytophthora capsici* (YOUN & JIN, 2001), espécies de *Exophiala* (YOUN & KYOUNG, 2002).

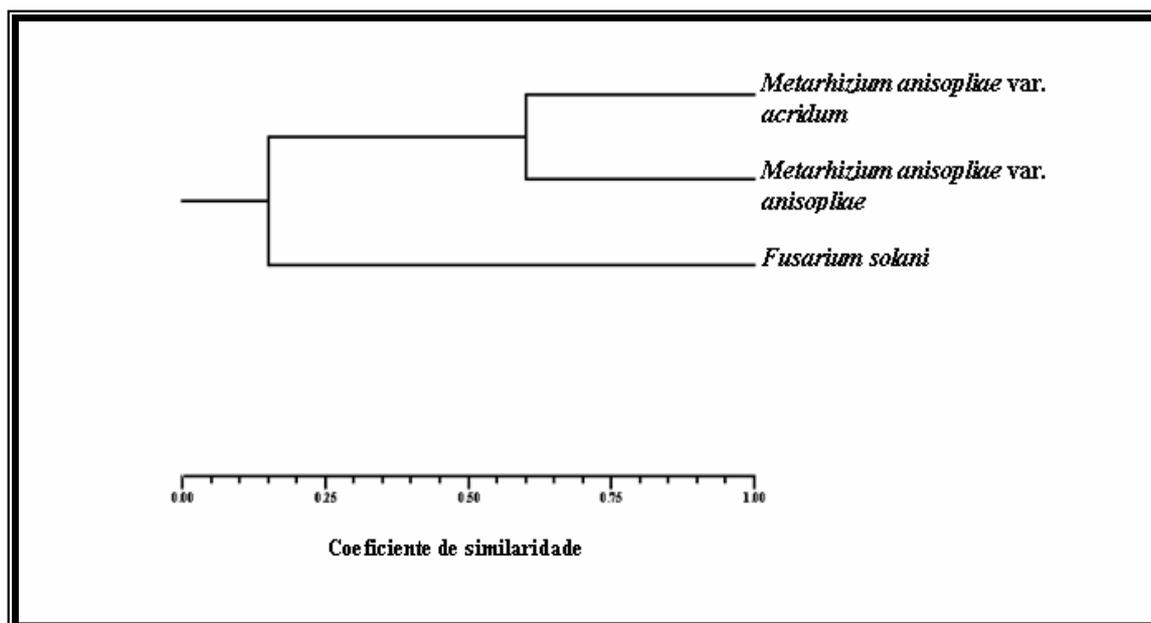


Figura 6. Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard a partir dos perfis de (GTG)₅ obtidos de linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Fusarium solani*.

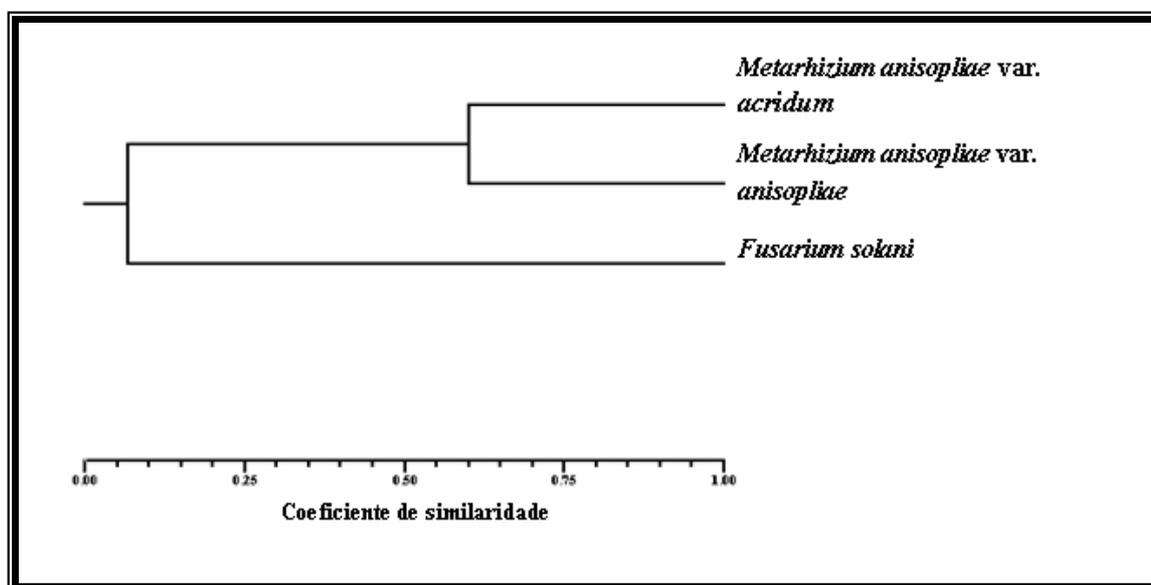


Figura 7. Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard a partir dos perfis de *intron* obtidos de linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Fusarium solani*.

A análise dos produtos de amplificação do *loci* ITS1-5.8-ITS2 do rDNA utilizando os iniciadores ITS4 e ITS5 antes da passagem pela mosca *Z. indianus*, apresentou fragmento de 600pb para as linhagens de *M. anisopliae* enquanto *Fusarium solani* apresentou 500 pb, indicando que não obstante a variabilidade genética detectada nas linhagens de *M. anisopliae*, foi possível confirmar que as linhagens pertence a mesma espécie, como também demonstrou que a sensibilidade da técnica de ITS foi adequada para este estudo, conforme pode ser observado na Figura 8. Lima (2005) obteve o mesmo resultado quando analisando 15 linhagens de *Metarhizium anisopliae*. Por outro lado Curran et al. (1994) usaram amplificação e sequenciamento do gene 5.8S, regiões intergênicas ITS1 e ITS2 e análise filogenéticas e constataram que *M. flavoviride* e *M. ablum* representam a mesma linha evolucionária, porém diferente de *M. anisopliae* possuindo uma linha monofilética.

As técnicas moleculares principalmente os genes ribossomais e suas regiões ITS têm contribuído extremamente para a identificação de espécies, estudos taxonômicos, análise filogenética, que muito auxiliam os estudos morfológicos de identificação de espécies e segregação de linhagens, facilitando e enriquecendo os estudos biológicos dos fungos entomopatogênicos (DRIVER et al., 2000; MARTÍNEZ-CULEBRAS et al., 2000; HAJEK et al. 2003; ENKERLI et al., 2005).

Esses resultados reforçam a eficiência do emprego desses marcadores, para demonstrar a diversidade genética entre as linhagens de espécies entomopatogênicas de Anamorfos. Visto que para muitos desses fungos já foi detectada a parassexualidade, fenômeno que está envolvido diretamente com a variabilidade genética (AZEVEDO, 1998a;b; 2005) a exemplo de *M. anisopliae* que teve o ciclo parassexual descrito em 1980 (MESSIAS & AZEVEDO 1980) e *Beauveria bassiana* em 1991 (PACOLA-MEIRELES & AZEVEDO 1991).

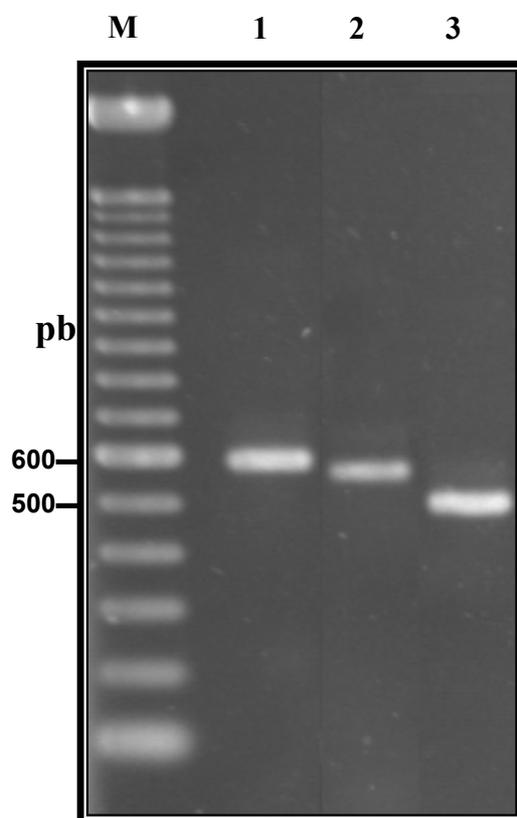


Figura 8. Perfil da região ITS do rDNA dos isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Fusarium solani*, pelos *primers* ITS4 e ITS5, em gel de agarose. Na pista M, marcador de peso molecular 100 bp, nas pistas 1, 2 e 3 encontra-se o DNA das linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Fusarium solani*.

4.3. ANÁLISE DAS REGIÕES DE MICROSSATELITE, *INTRON* E ITS APÓS O REISOLAMENTO DE *ZAPRIONUS INDIANUS* PÓS-INFECÇÃO EXPERIMENTAL.

O perfil de amplificação das regiões de SSR com o iniciador (GTG)₅ e o perfil de amplificação da região *intron*, utilizando o iniciador EI1 das linhagens de *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae*, está ilustrado na Figura 9. Os produtos do *loci* ITS1 e ITS2 do rDNA utilizando os iniciadores ITS4 e ITS5 nas linhagens de *Metarhizium anisopliae* são mostrados na Figura 10. Os resultados permitem assegurar que os fenótipos reisolados que causaram a infecção na mosca, foram os mesmos recuperados depois de utilizados para infectar as moscas, portanto não havendo diferença genética antes e pós a passagem pelo inseto.

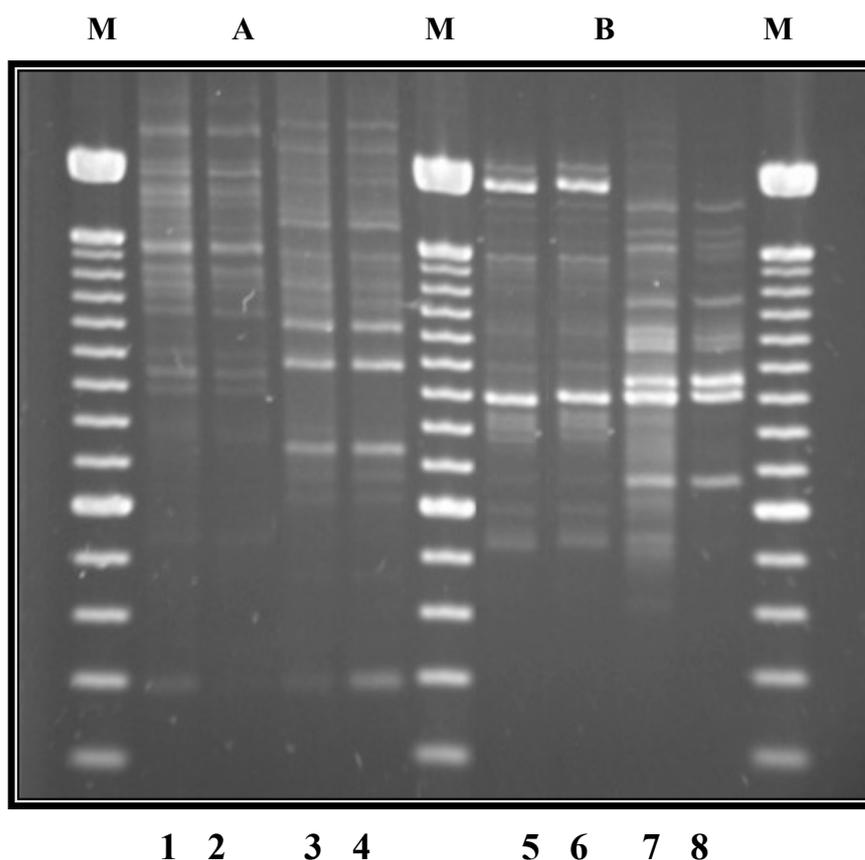


Figura 9. Perfil de amplificação de DNA das 2 linhagens *Metarhizium* das regiões de (GTG)₅ (A) e Intron (B). Nas pistas M, marcador de peso molecular 100 pb; nas pistas 1 e 5 encontra-se o DNA da linhagem *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* antes da passagem pela mosca e na pistas 2 e 6 o DNA após passagem pela mosca; nas pistas 3 e 7 encontra-se o DNA da linhagem *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* antes da passagem pela mosca e nas pistas 4 e 8 encontram-se o DNA após a passagem pela mosca .

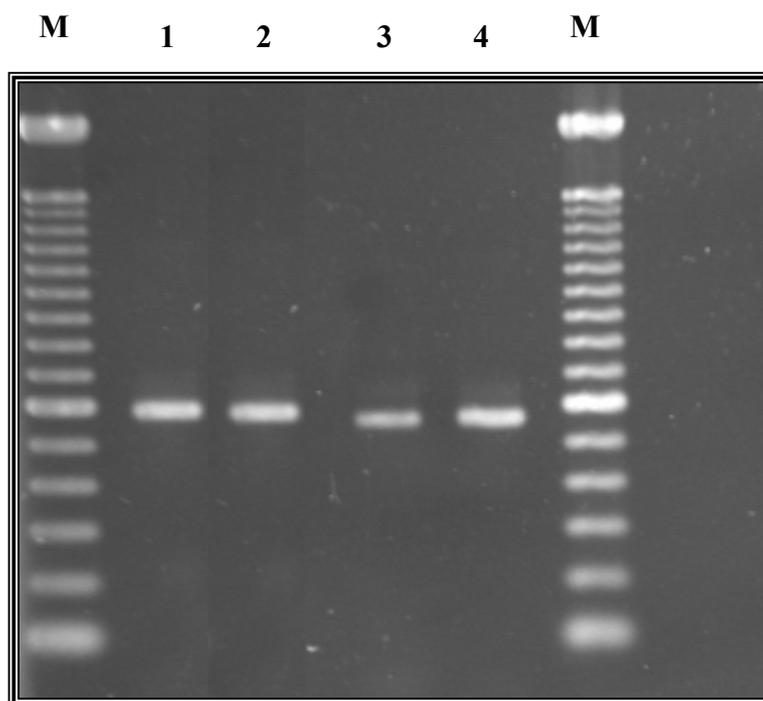


Figura 10. Perfil da região ITS do rDNA dos isolados de *Metarhizium anisopliae*, pelos primers ITS4 e ITS5, em gel de agarose. Na pista M, marcador de peso molecular 100pb, nas pistas 1 e 2, encontra-se o DNA das linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* antes e após passagem por *Zaprionus indianus*; nas pistas 3 e 4 o DNA de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

A aplicação das técnicas moleculares em bioensaio permite uma maior agilidade na detecção e identificação levando a um diagnóstico precoce da micose no inseto (DESTÉFANO et al., 2004). Os dados obtidos neste trabalho reforçam a necessidade de monitorar os fenótipos ao nível de genoma fúngico, antes e após a aplicação do fungo no campo, a fim de que seja obtida uma resposta ecológica e uma segurança na certificação da ação efetiva e específica das linhagens ao nível de gênero e espécie, utilizadas no controle biológico desta mosca, principalmente quando for utilizado um grande número de linhagens, visto que os estudos morfológicos e moleculares juntos, só irão dar maior confiabilidade ao emprego de agentes entomopatogênicos em programa de controle biológico no campo.

5. CONCLUSÕES

- *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae* causaram infecção em larvas e pupas de *Z. indianus*, podendo ser utilizados no controle biológico dessa mosca.
- *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae* diminuíram a percentagem de emergência dos adultos oriundos das larvas infectadas.
- *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae* aumentaram o tempo de metamorfose atrasando a eclosão
- O menor percentual de emergência foi registrado no tratamento utilizando a concentração de 10^8 conídios/mL.
- Os marcadores moleculares (GTG)₅ e EI1 mostraram-se eficientes em demonstrar o polimorfismo genético entre as linhagens de *Metarhizium*.
- Os marcador (GTG)₅ e o EI1 demonstram a mesma sensibilidade em detectar a diversidade genética das duas linhagens utilizada no trabalho.
- Os marcadores moleculares *Intron slice site primer* e ISSR confirmaram a variabilidade genética reconhecida em *Metarhizium*.
- O marcador EI1 foi mais eficiente em detectar a variabilidade genética entre as linhagens de *Metarhizium anisopliae* e *Fusarium solani*.
- A análise ITS confirmou que as linhagens *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae* pertencem a mesma espécie.
- As técnicas utilizadas mostraram eficientes em monitorar os fenótipos ao nível de genoma fúngico, antes e após a passagem por *Z. indianus*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBURQUEQUE, A. C.; PEREIRA, K. C. A.; CUNHA, F. M.; VEIGA, A. F. S. L. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgreen) Isoptera:Termitidae. **Neotropical Entomology**. v.34, p.585-591, 2005.

ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Editora FEALQ, São Paulo, 1998, 1163p.

ARTHURS, S.; THOMAS, M. B. Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78, p.59-65, 2001.

ATHAYDE, A. C. R. **Patogenicidade de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviride* sobre ovos, larvas e adultos de *Boophilus microplus* da região semi-árida paraibana**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), UFPE, Recife, 138p, 2002.

ATHAYDE, A. C. R.; FERREIRA, U. L.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. Fungos entomopatogênicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. v. 21, p. 12 – 15, 2001.

AVENONT, H.; DONGO, A.; BATAILLÉ-SIMONEAU, N.; IACONIC-VASILESEU, B.; HAMON, B.; PELTIER, D.; SIMONEAU, P. Isolation of 12 polymorphic mecosatellite loci in the phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*. **Molecular Ecology Notes**. v.10, p.1471-1486, 2005.

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

AZEVEDO, J. L. Controle microbiano de insetos-praga e seu melhoramento genético. In, MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. EMBRAPA, Jaguariúna. p.69-96, 1998b.

AZEVEDO, J. L. O uso de fungos na biotecnologia. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na Agricultura e na Pecuária**. Livraria e Editora Agropecuária Ltda. Guaíba. p.93-152, 2001.

AZEVEDO, J. L. Genética de fungos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. EDUSCS, Caxias do Sul. p.173-212, 2005.

AZEVEDO, J. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Melhoramento de fungos de importância na agricultura. In: MELO, J. S.; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. **Recursos Genéticos e Melhoramento- Microrganismos**. EMBRAPA, Jaguariúna. p.233-355, 2000.

AZEVEDO, J. L.; WOLFF, J. L. C. A moderna biotecnologia como auxiliar no controle microbiano de pragas da agricultura. In: AZEVEDO, J. L.; MELO, J. S. **Controle Biológico**. EMBRAPA, Jaguariúna. p.326-347, 2000.

BALEIRAS COUTO, M. M.; HARTOG, B. J.; HUIS INT'T VELD, J. H. J.; HOFSTRA, H.; VAN DER VOSSSEN, J. M. B. M. Identification of spoilage yeasts in food-production chain by microsatellite polymerase chain reaction fingerprinting. **Food Microbiology**. v.13, p.59-67, 1996.

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

BARVE, M. P.; HAWARE, M. P.; SAINANI, M.N.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, V. S. Potential of microsatellites to distinguish four races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* prevalent in India. **Theoretical Applied Genetic**. v.102, p. 138-147, 2001.

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

BEGON, M. Yeast and *Drosophila*. In: ASHBURNER, M; CARSON, H. L.; THOMPSON JR, J. N. (Eds.), The genetics and biology of *Drosophila*, **Academic Press**, London, v. 3b, p.345-384, 1982.

BLANFORD, S.; THOMAS, M. B. Adult survival maturation, and reproduction of the desert locust *Schistocerca gregaria* infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.78, p.1-8, 2001.

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

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

BROWNBRIDGE, M., COSTA, S., JARONSKI, S. T. Effects of in vitro passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.77, p.280-283, 2001.

BUSCOT, F.; WIPH, D.; MENCH, J.C.; BOTTON, B.; MARTIN, F.; DE BATISTA, C. DNA polymorfism in morels: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite – primed PCR. **Mycological Research**. v.100, p.63-71, 1996

CAMPOS, S. R. S. L. C. **Fotomapa dos cromossomos politênicos e localização dos genes *HSP70* e *HSP83* de *Zaprionus indianus***. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), UFPE, Recife, 2003, 44p.

CAMPOS, S. R. S. L. C. **Homologia entre os cromossomos politenicos dos gêneros *Drosophila* e *Zaprionus*: fotomapa e mapeamento gênico por hibridização *in situ* em *Zaprionus indianus***. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Genética), UFPE, Recife, 82p, 2005.

CARSWELL, I.; COSTA, S.; JARONSKI, R. J. Laboratory susceptibility of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) and *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera:Tephritidae) to an isolate of *Metarhizium anisopliae* (metsch) Sorokin. **Australian Journal of Entomology**. v.37, p.281-284, 1998.

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

CHANDLER, D. Seletion of an isolate of insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* virulent to the lettuce root aphid, *Pemphigus bursarius*. **Biocontrol Science and Technology**. v.7, p.95-104, 1997.

CHASSAGNARD, M. T. H.; KRAAIJEVELD, A. R. The occurrence of *Zaprionus sensu stricto* in the Palearctic region (Diptera: Drosophilidae). **Annales de la Société Entomologique de France**. v.27, p.495-496, 1991.

CHEN, Z.; FENG, H. Y.; SHI, L. C.; LIU, Y.G.; PAN, L. C.; WAMG, G. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* for control of *Lissarhoptrus oryzophilus*. **Chinese Journal of Biological Control**. v.16, p.53-55, 2000.

COQUILLET, D. W. New Diptera from Southern Africa. **Proceedings Nationnal Museum**. v.24, p.27-32, 1901.

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

DARWISH, E., ZAYED, A. Pathogenicity of two entomopathogenic hyphomycetes, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, to the housefly *Musca domestica*. **Journal of Egyptian Society of Parasitology**, v.32, p.785-796, 2002.

DESTÉFANO, R. H. R.; DESTÉFANO, S. A. L.; MESSIAS, C. L. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. **Genetics and Molecular Biology**. v. 27, 2, p. 245-252, 2004.

DRIVER, F.; MILNER, R. F.; TRUEMAN, W. H. A. taxonomic revision of *Metarhizium* based on phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequence data. **Mycological Research**, v. 14; p. 134-150, 2000.

EDEL, V.; STEINBERG, C.; GALTHERON, N. & ALABOUVETTE, C. Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)- amplified ribosomal DNA for identification of *Fusarium* species. **Mycological Research**. V. 101, p.179-187, 1996.

ENKERLI, J.; KOLLIKER, R.; KELLER, S.; WIDMER, F. Isolation and characterization of microsatellite markers from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Molecular Ecology Notes**. v.5, p.384-386, 2005.

ENKERLI, J.; WIDMER, F.; GESSLER, C.; KELLER, S. Strain-specific microsatellite markers in the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*, **Molecular Ecology Notes**. v.9, p.1079-1087, 2001.

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

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

FEIJÓ, F. M. C. **Ação de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride* no desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya albiceps* sob condições de laboratório.** Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas), UFPE, Recife, 126 p, 2004

FEIJÓ, F. M. C., MELO, E. H. M., MACIEL, M. V., ATHAYDE, A. C. R., LUNA-ALVES LIMA, E. A. **Efeito de *Beauveria bassiana* sobre *Chrysomya albiceps* em condições de laboratório.** *Scientia Agricola*, **in press**, 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. **Introdução ao Uso de Marcadores RAPD e RFLP em Análise Genética.** 3ª ed. EMBRAPA, Brasília, 1998, 200p.

FERRON, P. Biological control of insect pest by entomogenous fungi. **Annuals Review of Entomology**, v. 23, p. 409-442, 1978.

FERRON, P. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: BURGESS, H. D. **Microbial Control of Pest and Plant Disease 1970-1980.** Academic Press Inc. London, p.465-498, 1981.

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

FIGUEIRÊDO, M. F. S.; MARQUES, E. J.; LIMA, R. O. R.; OLIVEIRA, J. V. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin contra a broca gigante de cana-de-açúcar *Castnia licus* (Drury) (Lepidóptera: Castniidae). **Neotropical Entomology**. v.31, p.397-403, 2002.

FORTINI, M. E.; BONINI, N. M. Modeling human neurodegenerative diseases in *Drosophila*. **Trends Genetics**. v.16, p.161-167, 2000.

FREITAS, F. M. R.; FERREIARA, U.L.; ATHAYDE, A. C. R.; LUNA-ALVES LIMA, E.A. Controle biológico da mosca branca (*Bemisia* sp) pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. In: Congresso Brasileiro de Micologia, III, Águas de Lindóia, 2001. **Anais**. Sociedade Brasileira de Micologia, 2001, p.43.

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

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

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

GARDES, M.; BRUNS, T.D. ITS-RFLP matching for identification of fungi. In: CLAPP, J. P. (Ed) Species diagnostics protocols: PCR and other nucleic acid methods. **Human Press**. Totowa. p.177-186, 1996.

GILLESPIE, J. P.; BURNETT, C.; CHARNLEY, A. K. The immune response of desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Journal of Insect Physiology**. v. 46, p.429-437, 2000.

GOMES, L. H.; ECHEVERRIGARAY, S.; CONTI, J. H.; LOURENÇO, M. V. M.; DUARTE, K. M. R. Presence of the yeast *Cândida tropicalis* in figs infected by the fruit fly *Zaprionus indianus* (Díptera:Drosophilidae). **Brazilian Journal of Microbiology**. v.34, p.5-7, 2005.

GRIMALDI, D. A. A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). **Bulletin of American Museum of Natural History**. v.197, p.1-139, 1990.

GROPPE, K.; SANDERS, J.; WIEMKEN, A. & BOLLER, T. A microsatellite maker for studying the ecology and diversity of fungal endophytes (*Epichloe* spp.) in Grasses. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, p. 3943-3949, 1995.

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

GUIMARÃES, P. M.; SÁ, M. F. G. O uso de PCR na diagnose e caracterização de microrganismo. In; MELO, I. S.; VALADARES, M. C. NASS, L. L. VALOIS, A. C. C. **Recurso Genéticos e Melhoramento-Microrganismo**. EMBRAPA, Jaguariúna. p.129-147, 2002.

GUPTA, J. P. Description of new species of *Phorticella zaprionus* (Drosophilidae) from india. **Proceedings of Indian Natural Sciences Academy**. v.36, p.62-70, 1970.

GUY-FRANCK, R. & PÂQUES, F. Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. **EMBO Reports**. v.11, p. 122-126, 2000.

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

HAMMIL, T. M. Electron microscopy of phloconidiogenesis in *Metarhizium anisopliae*. **American Journal of Botany**, v. 59, p. 317-326, 1972.

HAN, Q.; INGLIS, G. D.; HAUSNER, G. Phylogenetic Relationships among strains of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea riley*, as revealed by partial β -tubulin sequences and inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. **Letters in Applied Microbiology**. v. 34, p. 376-383, 2002.

HEGEDUS, D. D. & KHACHATOURIANS, G. G. Identification and differentiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.67, p.289-299, 1996.

HENRION, B., CHEVALIER, G., MARTÍN, F. Typing truffles species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. **Mycological Research**. v.98, p. 37-43, 1994.

HERRERA, F.; CARBALLO, M.; SHANNON, P. Efficacy of native entomopathogenic fungal strains against *Bemisia tabaci* in the laboratory. **Manejo Integrado de Plagas**, v.54, p.37-43, 1999.

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

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

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

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution horale. **Bulletin de la Societé Vand des Sciences Naturalles**. v. 44, p. 223-270 ,1908

KAAYA, G. P.; MUNYINYI, D. M. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.66, p.237-241, 1995

KAAYA, G. P.; OKECH, M. A. Horizontal transmission of mycotic infection in adult tsetse, *Glossina morsitans morsitans*. **Entomophaga**. v.35, p.89 – 600, 1990.

KANGA, L. H. B.; JAMES, R. R.; BOUCIAS, D. G. *Hirsutella thmpsonii* and *Metarhizium anisopliae* as potencial microbial agents of *Varroa destructor*, a honey bee parasite. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.81, p.175-184, 2003.

KASHI, Y.; KING, D. & SOLLER, M. Simple sequence repeats as source of quantitative genetic variation. **Trends in Genetics**. v. 13, p. 74-78, 1997.

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

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

KUKLINSKY, J. W.; LUNA-ALVES LIMA, E. A., ARAÚJO, J. M., AZEVEDO, J. L. Genetic variability in regenerated *Metarhizium flavoviride* protoplasts. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.47, p.1-14, 2004

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

LEAL-BERTIOLI, S. C. M. 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. RAPP**. v.6, p.197-230, 1998.

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

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.

LUNA-ALVES LIMA, E. A., 1985. **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. Aspectos Taxonômicos e Citológicas de Hyphomycetes (Deuteromycotina) entomopatogênicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, suplemento III, p.17-20, 1989.

LUNA-ALVES LIMA E.A., TIGANO, M.S. Citologia de estruturas leveduriformes de *Beauveria bassiana* em meios de culturas líquidos e na hemolinfa de *Spodoptera furgiperda*. **Revista de Microbiologia**. v. 28, p. 85-94, 1989.

MACIEL, M. V.; LUNA-ALVES LIMA, E. A.; ALVES, N. D.; FEIJÓ, F. M. C. Ação de *Beauveria bassiana* no desenvolvimento pós-embrionário de *Cochliomyia macellaria* (Dipter:Caliphoridae) em laboratório. **Caatinga**. v.18, p.1-15, 2005.

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

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

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

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

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

MENDONÇA, A. F. **Cigarrinhas da cana-de-açúcar Controle Biológico**. INSECTA, Maceió, 2005, 317p.

MELO, I. S. SCHINEIDER, R. P.; INGLIS, P. W.; VALARADARES-INGLIS, M. C. In: MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, C. M., NASS, L. L. VALOIS, A. C. C. Recursos **Genéticos Melhoramento-Microrganismos**. EMBRAPA. Jaguariúna. p.149-176, 2002.

MILNER, R. J.; MILLER, L.; LUTTON, G.G; DRIVER, F. 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**. v.37, p.155-162, 1996.

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

MONTEIRO, S. G. BITTENCOURT, V. R. E. P.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. Effect of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on eggs of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Ciência Rural**. v.28, p.699-709, 1998.

MORAES, S. A., ALVES, S. B. Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. In: Alves, S. B. (Ed.), **Controle Microbiano de Insetos**. Editora FEALQ, Piracicaba, p. 765-777, 1986.

NAUMOVA, E. S.; NAUMOV, G. I.; MOLINA, F. I. Genetic variation among European strains of *Saccharomyces paradoxus*: results from DNA fingerprinting. **Systematic and Applied Microbiology**. v.23, p.86-92, 2000.

NASCIMENTO, F. B. S. **Ação de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e parâmetros biológicos após passagem em *Rhipicephalus sanguineus***. Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos). UFPE, Recife, 2003, 50p.

NEUVÈGLISE, C.; BRYGOO, Y.; VERCAMBRE, B.; RIBA, G. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. **Mycological Research**, v. 98, p. 233-328, 1994.

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

ONOFRE, S. B.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Pathogenicity of *Metarhizium falvoviride* var. *flavoviride* (Gams & Rozpal) and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin over bovine tick *Boophilus microplus* (Can., 1887). **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 1478-1480, 2001.

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

OROZCO-SANTOS, M., FARIAS-LARIOS, J., LÓPEZ-PÉREZ, J., RAMÍREZ-VAZQUEZ, N. R. Uso de *Beauveria bassiana* para el control de *Bemisia argentifolii* en melón. **Manejo Integrado de Plagas**, Costa Rica. v. 56, p.45-51, 2000.

OUEDRAGO, R. M.; CUSSON, M.; GOTTEL, M. S.; BRODEUR, J. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locust, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.82, p.103-109, 2003.

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

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

PATARO, C.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**. v.89, p.24-31, 2000.

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

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

PORTUGAL, A.; MARTINHO, P.; VIEIRA, R.; FREITAS, H. Molecular characterization of *Cenococcum geophilum* isolates from an ultramafic soil in Portugal. **South African Journal of Science**. v.97, p.617-619, 2001.

POTERCORVO, G.; ROPER, J.; HEMMONS, L. M.; MACDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulas*. **Advances in Genetics**, v.5, p-140-148, 1953.

PATARO, C., GUERRA, J. B., PETRILLO-PEIXOTO, M. L., MENDONÇA-HAGLER, L. C., LINARDI, V. R., ROSA, C. A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal Applied Microbiology**, v.89, p.24- 31, 2000

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

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

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

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

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. **Journal Invertebrate Pathology**. v.90, p.55-58, 2005.

REIS, R. J. S.; EBERT, R. H. Genetics of aging: Current animal models. **Experimental Gerontology**. v.31, p.69-81, 1996.

REITHINGER, R., DAVIES, C. R., CADENA, H., ALEXANDER, B. Evaluation of the fungus *Beauveria bassiana* as a potential biological control agent against Phlebotomine sand flies in Colombian coffee plantations. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.20, p.131-135, 1997

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

RICHARD, G. F.; HENNEQUIN, A. T.; DUJON, B. Trinucleotide repeats and other microsatellites in yeast. **Research Microbiology**. v. 150, p.589-602, 1999.

ROHLF, F. J. NTSYS – PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system. **Applied Biostatistics, Inc.** Exeter Publishing, New York .1998, 218p.

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

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. 2th. Cold Spring Harbor: New York, 1989, 89p.

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

SANTOS, J. F., RIEGER, T. T., CAMPOS, S. R. C., NASCIMENTO, A. C. C., FÉLIX, P. T., SILVA, S. V. O., FREITAS, F. M. R. Colonization of Northeast region of Brazil by the drosophilid flies *Drosophila malerkotliana* and *Zaprionus indianus*, a new potential insect pest for Brazilian fruitculture. ***Drosophila Information Service***, v.86, p. 92-95, 2003.

SHADDUCK, J. A., ROBERTS, D. W., LAUSE, S. Mammalian safety tests of *Metarhizium anisopliae*: preliminary results. ***Environmental Entomology***, v.11, p.189-192, 1982

SOUSA, A. C. B., **Diversidade genética revelada através de microssatelites em *Colletotrichum gloeosporioides***. Monografia (Especialização em Micologia), UFPE, Recife, 2004, 34p.

SOUZA, A. M. **Biologia em Laboratório dos estágios imaturos de espécies de Calliphoridae e Sarcophagidae (Diptera) de importância médico legal na região de Campinas, SP**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Parasitologia), UNICAP, Campinas. 1999, 99p.

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

STEIN, C. P.; TEIXEIRA, E. P.; NOVO, J. P. S. Mosca do figo- *Zaprionus indianus*. Disponível em: <http://www.iac.br/~centif/artigos/zaprionus>. (1999).

STEINKRAUS, D. C., GEDEN, C. J., RUTZ, D. A., KRAMER, J. P. First report of the natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Journal Medical Entomology**, v.27, p.309-312, 1990.

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

TIDON, R.; LEITE, D. F.; LEÃO, B. F. D. Impact of the colonization of *Zaprionus* (Diptera: Drosophilidae) in different ecosystems of the Neotropical Region: 5 years after the invasion. **Biological Conservation**. v.112, p.299-305, 2003.

TSCSAS, L. *Zaprionus indianus* Gupta, 1970, Nouveau nom pour le plus commun des *Zaprionus africains* (Diptera, Drosophilidae). **Annales de la Société Entomologique de France**. v.21, p.343-344, 1985.

TSACAS, L.; CHASSAGNARD, M. T. H. Les espèces du genre *Zaprionus* à femurs antérieurs spinuleux (Diptera:Drosophilidae). **Annales de la Société Entomologique de France**. v.26, p.461-487, 1990

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

VILELA, C. R. Is *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera:Drosophilidae) Currently colonizing the Neotropical region?. **Drosophila Information Service**. v.82, p.37-39, 1999.

VILELA, C. R., TEIXEIRA, E. P., STEIN, C. P., Nova praga nos figos: *Zaprionus indianus* Gupta, 1970. **Informativo da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.24, p.2, 1999.

VILELA, C. R., ZUCCHI, R. A., CANTOR, F. **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Holos Ed., Ribeirão Preto, p.48-51, 2001.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.;

SNINSKY, J. J. & WHITE, T. J. **PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications**. Academic Press. New York. p.315-322, 1990.

WHEELER, M. R. The Drosophilidae: a taxonomic overview. In: ASBURNER, M.; CARSON, H. L.; THOMPSON, Jr., J. N. **The genetics and Biology of *Drosophila***. Academic Press. New York. v.3c, p.1-97, 1981.

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

XAVIER-SANTOS, S.; MAGALHÃES, B. P.; LUNA-ALVES, E. A. Infectivity of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozspal (Deuteromycotina:Hyphomycetes) against grasshopper *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera:Acrididae) in the laboratory. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v.28, p.359-363, 1999b.

YOUN, C. H.; JIN, J. H. Estimation of genetic variation of Korean isolates of *Phytophthora capsici* by using molecular markers. **Mycobiology**. v.29, p.43-47, 2001.

YOUN, C. H.; KYOUNG, K. Y. Molecular analysis of *Exophiala* species using molecular markers. **Mycobiology**. v.30, p.1-4, 2002.

ZACHARUK, R. Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (Coleoptera). IV. Development within the host. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 17, p. 525-529, 1971.

ZAKI, F. N., Efficiency of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Bals), against *Aphis crassivora* Koch and *Bemisia tabaci*, Gennadius. **Journal Applied Entomology**. v.122, p.397-399, 1998.

ZHANG, Z.; MIWA, M.; HOGESTSU, T. Genetic distribution of ectomycorrhizal fungus *Suillus grevillei* populations in two *Larix kaempferi* stands over two years. **Journal Plant Research**. v.113, p.365-376, 2000.

Carneiro Leão, Mariele Porto

Caracterização molecular (PCR) e infecção de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* em *Zaprionus indianus* / Mariele Porto Carneiro Leão. – Recife: O Autor, 2006.

72 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Micologia, 2006.

Inclui bibliografia.

1. Fungos - patologia 2. *Metarhizium anisopliae* 3. Genética – marcadores moleculares 4. *Zaprionus indianus* I. Título.

582.28
579.5

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

UFPE
CCB – 2006 - 032

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

MARIELE PORTO CARNEIRO LEÃO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR (PCR) E INFECÇÃO DE
Metarhizium anisopliae var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var.
anisopliae EM *Zaprionus indianus*

RECIFE
2006