

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

***Metarhizium* spp.: caracterização de isolados com potencial
para biocontrole de pragas**

Patrícia Silva Gôlo

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

***Metarhizium* spp.: CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS COM
POTENCIAL PARA BIOCONTROLE DE PRAGAS**

PATRÍCIA SILVA GÔLO

Sob a Orientação da Professora
Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt
E co-orientação dos Professores
Éverton Kort Kamp Fernandes e Donald Wilson Roberts

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de concentração: Parasitologia Veterinária

Seropédica, RJ
Julho de 2014

632.96

Gôlo, Patrícia Silva, 1987-

G627m

T

Metarhizium spp.: caracterização de isolados com potencial para biocontrole de pragas / Patrícia Silva Gôlo. - 2014.

132 f.: il.

Orientador: Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2014.

Inclui bibliografia.

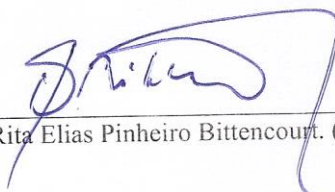
1. Pragas - Controle biológico - Teses. 2. Carrapato - Controle biológico - Teses. 3. Metarhizium anisopliae - Teses. 4. Fungos endofíticos - Teses. 5. Fungos patogênicos - Teses. 6. Parasitologia veterinária - Teses. I. Bittencourt, Vânia Rita Elias Pinheiro, 1959- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

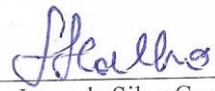
PATRÍCIA SILVA GÔLO

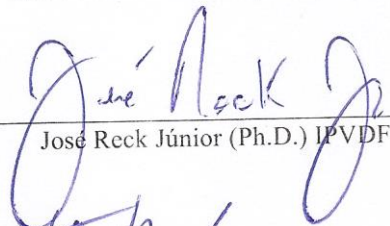
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Veterinária.

TESE APROVADA EM 22/07/2014


Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. (Ph.D.) UFRRJ


Isabele da Costa Angelo (Ph.D.) UFRRJ


Irene da Silva Coelho (Ph.D.) UFRRJ


José Reck Júnior (Ph.D.) UFVDF


Walter Orlando Beys da Silva (Ph.D.) UNIVATES

Dedico esse trabalho a todos os amigos e familiares
que me acompanharam nessa jornada fascinante!
Foi mais que especial...

In memoriam da amada avó Diomar Pequena de Jesus da Silva
e do querido tio Pedro de Sousa Andrade.

“And in the end, the love you take is equal to the love you make”

The Beatles

AGRADECIMENTOS

O meu primeiro obrigado vai para Deus e para o meu anjo da guarda, obrigado por estar sempre ao meu lado, mesmo quando eu fazia questão de não te ver. Obrigado por nunca me abandonar!

Agradeço aos meus pais *Marco Antônio de Paula Gôlo* e *Josedilma Silva Gôlo*. Pai e mãe eu amo vocês, ontem, hoje e sempre. Obrigado por sempre me apoiarem, pela ajuda de toda uma vida, pelo amor incondicional, pelos conselhos e por sempre me ouvirem! Obrigado ao meu amor *Alexandre Kaczmarkiewicz*, te encontrar foi a melhor coisa que poderia ter me acontecido. Seu carinho, dedicação e paciência (principalmente nos momentos finais da defesa) foram essenciais para que isso se tornasse realidade. TE AMO. Obrigado aos meus irmãos *Paulo Henrique Silva Gôlo* e *Marcos Paulo Silva Gôlo* pelo apoio de sempre. Obrigado a minha cunhada *Lilian Rafaele Santos de Oliveira* pelo presente maravilhoso que me deu no dia 14 de Janeiro de 2014, a minha pequena e amada sobrinha *Laura de Oliveira Gôlo*.

Gostaria de agradecer imensamente a minha orientadora *Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt* por me instruir em tantas situações, por me acalmar, por me alertar e aconselhar sempre da melhor maneira possível. Você é um espelho pra mim. Muitas vezes mais que uma orientadora. Muito obrigado mesmo! Te admiro imensamente.

Obrigado ao Dr. *Donald Wilson Roberts* pela co-orientação. Don, I know you are reading this (and probably want edit), but all I want to say is thank you for everything. Thanks for having pushed me up when I needed, guided me, taught me how to be a real scientist, for brilliant ideas and advices. Thank you for think about “how destruxins could be harmful for insects if inside plants” (that will change my life). I admire the way you teach people using parables. Thank to *JoAnn Starks*, *Carmina Moore* and *Sam Sherwood*. I express my sincere gratitude to all of you for having supported and helped me during 12 months.

Obrigado ao professor *Éverton Kort Kamp Fernandes* pela co-orientação, ensinamentos, por sempre me ajudar quando eu estava em Logan. Obrigado a professora *Walquiria Arruda* pela ajuda com os experimentos de microscopia! Valeu Grupo Centro-Oeste!

Obrigado as minhas amigas *Mariana Guedes Camargo* e *Simone Quinelato* pelas conversas, conselhos e ajuda nos experimentos. Serei sempre grata e dificilmente pagarei essa dívida. Obrigado aos amigos e vizinhos de laboratório *Maristela Peckle Peixoto* e *Marcus Sandes Pires* pelas conversas, reflexões, ajuda, apoio, palavras e amizade em todos os momentos, mesmo e principalmente quando eu estava longe. Amo vocês!

Obrigado a minha querida amiga *Isabele da Costa Angelo* pela ajuda e disponibilidade de sempre. Obrigado também ao *Huarrisson Azevedo Santos* pela essencial ajuda com o capítulo IV.

Obrigado aos meus amigos e companheiros de laboratório *Wendell Marcelo de Souza Perinotto*, *Fillipe Araujo de Sá*, *Caio Marcio de Oliveira Monteiro*, *Caio Junior Balduino Coutinho Rodrigues*, *Michel Ruam dos Santos Nogueira*, *Allan Felipe Marciano*, *Jéssica Fiorotti de Paulo*, *Maria Clemente* e *Sabrina Rezende* pela ajuda com os experimentos!

Obrigado também a todos os funcionários, colegas e professores da Estação Experimental W. O. Neitz, do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, da Utah State University e da Universidade Federal de Goiás. Obrigado ao CNPq e à CAPES pelo auxílio financeiro que foi primordial para a execução deste trabalho.

A todos vocês meu MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

Patrícia Silva Gôlo, filha de Marco Antônio de Paula Gôlo e Josedilma Silva Gôlo, nasceu em 10 de Abril de 1987, na cidade de Santa Isabel do Ivaí, Paraná.

Em maio de 2005 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Medicina Veterinária, concluindo-o em fevereiro de 2010. Durante esses anos foi estagiária do Laboratório de Controle Microbiano na UFRRJ por um período de oito meses e bolsista de iniciação científica PIBIC-CNPq, no mesmo laboratório, por dois anos e meio.

Durante o período de graduação, em 2008 e 2009, foi premiada duas vezes com o XI e XII Prêmios de Iniciação Científica pelos trabalhos apresentados, respectivamente, durante a XVIII e XIX Jornadas de Iniciação Científica da UFRRJ. Em 2008, também, foi premiada com menção honrosa durante a XVIII Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ.

Em março de 2010 foi aprovada no processo de seleção ao nível de mestrado, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, onde foi bolsista CAPES durante 18 meses. Em 2011 ingressou no doutorado na mesma instituição também sob a orientação da professora Vânia Ria Elias Pinheiro Bittencourt. Em 2012 foi contemplada com uma bolsa do CNPq para realização de doutorado sanduíche, durante 12 meses, na Utah State University, em Logan nos EUA.

Possui 18 artigos completos publicados em periódicos científicos e durante o doutorado participou de diversos congressos e simpósios. Atualmente é estudante representante da Microbial Control Division da Society for Invertebrate Pathology.

RESUMO

GÔLO, Patrícia Silva. ***Metarhizium* spp.: caracterização de isolados com potencial para biocontrole de pragas.** 2014. 116p Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Área de Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Metarhizium anisopliae sensu lato (s.l.) tem sido amplamente utilizado em programas de controle de insetos e apresenta resultados promissores em testes contra carrapatos, especialmente *Rhipicephalus microplus*. Os níveis de virulência de diferentes espécies e isolados de *M. anisopliae* s.l. podem estar relacionados com a produção de enzimas, produção de metabolitos secundários, e tolerância aos efeitos abióticos como altas temperaturas e intensa radiação solar. Dessa maneira, a presente tese objetivou: 1) determinar, em 20 isolados fúngicos de *Metarhizium*, os níveis de tolerância à radiação UV-B quando estes foram suspensos em água ou formulados com óleo; 2) avaliar os níveis de produção *in vitro* de destruxinas nestes mesmos isolados fúngicos e a presença de destruxinas em larvas de *Galleria mellonella* utilizando dois isolados fúngicos de espécies diferentes; 3) verificar a virulência contra larvas de *R. microplus* e larvas de insetos (*G. mellonella* e *Tenebrio molitor*) desses mesmos isolados; 4) correlacionar a expressão de *pr1* e a virulência de *Metarhizium anisopliae* s.l. para *R. microplus*; 5) avaliar a resposta no perfil proteico de ovos de *R. microplus* após tratamento fúngico das fêmeas; e 6) quantificar níveis de produção de destruxina *in planta* [*Vigna unguiculata* (feijões) e *Cucumis sativus* (pepinos)]. As formulações a base de óleo mineral (10%) contendo conídios de diferentes espécies e isolados de *Metarhizium* claramente protegeram o fungo do efeito causado pela exposição à radiação UV-B (i.e., atraso na germinação), o que sugere que a adição de óleo mineral às suspensões fúngicas pode conferir melhor desempenho de fungos entomopatogênicos quando aplicados a campo. Quando os resultados obtidos com a produção *in vitro* de destruxinas dos isolados de *Metarhizium* spp. foram correlacionados com os seus potenciais virulentos, observou-se que a presença desses metabólitos secundários nas culturas fúngicas não está relacionada aos níveis ou à velocidade de mortalidade dos insetos estudados. Destruxinas não foram detectadas em larvas de *G. mellonella*. Os valores elevados de expressão de *pr1* nos conídios produzidos em carrapatos não induziram níveis de mortalidade larval maiores do que conídios produzidos em meio artificial. Cinquenta e duas proteínas foram identificados nos ovos de *R. microplus*, dentre essas, alguns inibidores de serino proteases (Serpinas) estão possivelmente relacionados a uma resposta adaptativa, já que foram identificados somente em ovos do grupo de fêmeas exposto ao fungo. Houve detecção de destruxinas quando feijões foram endofiticamente colonizados por *M. robertsii*. Essa característica pode ser significativamente positiva para o seu uso de fungos contra pestes da agricultura, caracterizando-se como uma nova e promissora abordagem no controle biológico de artrópodes-pestes, isto é, o uso de fungos artropodopatogênicos produzidos *in planta* para modificar negativamente o comportamento de pestes agrícolas. O presente estudo foi o primeiro relato da detecção de destruxinas em plantas colonizadas por *M. robertsii* e descreve, também pela primeira vez, a positividade na colonização de *M. acridum* em plantas (feijão *cowpea* e pepino), após inoculação em sementes, e a colonização endofítica de *M. brunneum* em feijões após aplicação foliar.

Palavras-chave: fungos artropodopatogênicos, radiação UV-B, destruxinas, Pr1, fungos endofíticos.

ABSTRACT

GÔLO, Patrícia Silva. ***Metarhizium* spp.: characterization of isolates with potential for biocontrol of pests.** 2014. 116p Thesis (Doctor Science in Veterinary Sciences, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Metarhizium anisopliae sensu lato (s.l.) has been widely used in insect control programs and shows promising results in tests against ticks, especially *Rhipicephalus microplus*. Virulence levels of different species of *M. anisopliae* s.l. may be related to the production of enzymes, secondary metabolite and tolerance to abiotic effects such as high temperatures and intense solar irradiation. Accordingly, the present thesis aimed: 1) determine UV-B tolerance levels of 20 different *Metarhizium* spp. isolates in aqueous or oil-based formulation; 2) assess levels of destruxins production *in vitro* by the same fungal isolates and *in vivo* production in *Galleria mellonella* larvae using two fungal isolates from different species; 3) verify virulence against *Rhipicephalus microplus* larvae and insect larvae (*G. mellonella* and *Tenebrio molitor*) when the same isolates were suspended in water; 4) correlate the expression of *pr1* and *Metarhizium anisopliae* sensu lato virulence for *R. microplus* larvae; 5) evaluate the response in the protein profile of *R. microplus* eggs after fungal treatment of females; and 6) quantify levels of destruxins production *in planta* [*Vigna unguiculata* (cowpea beans) and *Cucumis sativus* (cucumbers)]. Formulations based on 10% mineral oil containing conidia of different *Metarhizium* isolates clearly protected conidia from the effect caused by UV-B radiation (i.e., delayed germination), suggesting that the addition of mineral oil to fungal suspensions may improve their performance under field conditions. Comparisons between the results obtained with *in vitro* destruxins production and fungal virulence, showed that the presence or absence of these secondary metabolites in fungal cultures was not related to the level or rate of arthropod mortality. Destruxins were not detected in *G. mellonella* larvae, suggesting that these insect larvae detoxified quickly the produced compounds. The high values of Pr1 in conidia produced on ticks did not induce higher levels of larval mortality in comparison with conidia produced on artificial media. Fifty-two proteins were identified in *R. microplus* eggs, among these, some inhibitors of serine proteases (Serpins) are possibly present as an adaptive tick response to the fungus, since they were only identified in the group of eggs from females exposed to the fungus. Destruxins were detected when beans were endophytic colonized by *M. robertsii*. This finding might be significantly positive for fungal use to control agriculture pests, representing a promising new approach for biological control of arthropod pests, i.e., the use of arthropodpathogenic fungi grown *in planta* to adversely modify the behavior of agricultural pests. This study was the first report of destruxins detection in plants colonized by *M. robertsii* and also describes, for the first time, the positive endophytic colonization of *M. acridum* in plants (cowpea beans and cucumber after seed inoculation), and colonization of *M. brunneum* in cowpea beans after foliar application.

Key-words: arthropodthogenic fungi, UV-B irradiation, destruxins, Pr1, endophitic fungi.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1. Isolados de *Metarhizium* spp., origem, substrato e identificações de acordo com Bischoff e colaboradores (2009). 24

Tabela 2. Percentual de mortalidade (media \pm erro padrão) de larvas de *Tenebrio molitor*, 5 dias após o tratamento e de larvas de *Galleria mellonella*, 3 dias após o tratamento. 38

Tabela 3. Percentual médio* \pm desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 5 dias após a exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ$ C e umidade relativa $\geq 80\%$ 42

Tabela 4. Percentual médio* \pm desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 10 dias após a exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ$ C e umidade relativa $\geq 80\%$ 42

Tabela 5. Percentual médio* \pm desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 15 dias após a exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ$ C e umidade relativa $\geq 80\%$ 43

Tabela 6. Concentração letal (CL₅₀ e CL₉₀) dos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. obtida nos ensaios biológicos de larvas de *Rhipicephalus microplus* 5 dias após o tratamento, Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ$ C e umidade relativa $\geq 80\%$ 44

CAPITULO II

Tabela 1. Nome do gene, sequência dos *primers* e eficiência da PCR dos genes utilizados no presente estudo. 63

Tabela 2. Percentual médio (%) de mortalidade e desvio padrão de larvas de *Rhipicephalus microplus* expostas a conídios cultivados em BDA ou em cadáveres de carrapatos. 66

CAPITULO III

Tabela 1. Identificação das proteínas encontrados no gel bidimensional de ovos de *Rhipicephalus microplus* após exposição das fêmeas a suspensão fúngica de *Metarhizium anisopliae*. 83

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Isolados fúngicos cultivados em meio batata dextrose agar e extrato de levedura a 0,01%, após 10 dias de crescimento a 28°C em escotofase. **A:** *Metarhizium pingshaense* ARSEF 552; **B:** *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 729; **C:** *Metarhizium a.* s.l. ARSEF 759; **D:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 782; **E:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 1449; **F:** ARSEF 1882; **G:** *M. anisopliae* senso strictu ARSEF 1883; **H:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 760; **I:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 929 **J:** *Metarhizium robertsii* ARSEF 724; **K:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 3479; **L:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 3918; **M:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 3641; **N:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 3643; **O:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 2211; **P:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 2521; **Q:** *M. pingshaense* ARSEF 1448; **R:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 1885; **S:** *M. robertsii* ARSEF 2575; **T:** *Metarhizium acridum* ARSEF 324. 25

Figura 2. **A:** conídios de *Metarhizium pingshaense* ARSEF 552 no interior da gotícula de óleo. As gotículas foram observadas em microscópio estereoscópio num aumento de 400×; **B:** Conídios germinados e não germinados do isolado de *M. pingshaense* ARSEF 552 48 horas após exposição à radiação UV-B. A placa foi incubada à 28 °C e corada com azul de metil. 31

Figura 3. Comparação entre o percentual de germinação relativa de 20 isolados de *Metarhizium* spp. formulados em 10% de óleo mineral (barras vermelhas) ou suspensos em solução aquosa (Tween 80 0,01%) (barras azuis) 24 horas após exposição à radiação UV-B por 1,5 horas (4.01 kJ m⁻²). 32

Figura 4. Comparação entre o percentual de germinação relativa de 20 isolados de *Metarhizium* spp. formulados em 10% de óleo mineral (barras vermelhas) ou suspensos em solução aquosa (Tween 80 0,01%) (barras azuis) 48 horas após exposição à radiação UV-B por 1,5 horas (4.01 kJ m⁻²). 32

Figura 5. Produção *in vitro* de destruxinas por 12 isolados de *Metarhizium* spp. As barras representam as médias dos valores ± os valores de erro padrão após 5 dias de crescimento em meio líquido (150 rpm). A produção de destruxinas a, B e E (DTX A, DTX B, e DTX E) foi determinada quantitativamente por HPLC-UV. Os ensaios foram repetidos 3 vezes. 33

Figura 6. Produção *in vitro* de destruxinas (DTX) A, B, e E pelo isolado de *Metarhizium robertsii* ARSEF 2575 do primeiro ao quinto dia de cultivo. A produção de destruxinas foi determinada quantitativamente por HPLC-UV. Os valores são expressos em mg de destruxina por grama de micélio seco. 34

Figura 7. Produção *in vitro* de destruxinas (DTX) A, B, e E pelo isolado de *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 759 do primeiro ao quinto dia de cultivo. A produção de destruxinas foi determinada quantitativamente por HPLC-UV. Os valores são expressos em mg de destruxina por grama de micélio seco. 35

Figura 8. Produção *in vitro* de destruxinas (DTX) A, B, e E pelo isolado de *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 729 do primeiro ao quinto dia de cultivo. A produção de destruxinas

foi determinada quantitativamente por HPLC-UV. Os valores são expressos em mg de destruxina por grama de micélio seco. 36

Figura 9. Produção *in vitro* de destruxinas (DTX) A, B, e E pelo isolado de *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 1885 do primeiro ao quinto dia de cultivo. A produção de destruxinas foi determinada quantitativamente por HPLC-UV. Os valores são expressos em mg de destruxina por grama de micélio seco. 36

Figura 10. Lagartas de *Galleria mellonella* dois dias após exposição à conídios de *Metarhizium robertsii* ARSEF 2575. (A) Placa de Petri com larvas infectadas. (B) Amplificação da porção da figura A. As setas vermelhas indicam a melanização da cutícula da larva, representando sinais precoce da infecção fúngica. 37

Figura 11. Percentual de mortalidade (%) médio de lagartas de *Galleria mellonella* após exposição a fungos artropodopatogênicos do complexo *Metarhizium anisopliae* na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} . A figura representa os 4 primeiros dias após o ensaio biológico. Os experimentos foram repetidos três vezes. 40

Figura 12. Percentual de mortalidade (%) médio de larvas de *Tenebrio molitor* após exposição a fungos artropodopatogênicos do complexo *Metarhizium anisopliae* na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} . A figura representa os 4 primeiros dias após o ensaio biológico. Os experimentos foram repetidos três vezes. 40

CAPÍTULO II

Figura 1. Níveis de expressão relativa (acompanhados dos respectivos desvios padrões) do gene *pr1* de conídios cultivados em meio artificial batata dextrose ágar (BDA) ou em cadáveres de carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus*. Os genes *gpd*, *tef* e *try* foram usados como genes de referência. As quantidades relativas foram baseadas nos níveis de expressão de conídios cultivados em BDA (geNorm qbase^{PLUS}). 65

CAPÍTULO III

Figura 1. Gel bidimensional de proteínas dos ovos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* expostas ou não ao fungo artropodopatogênico *Metarhizium anisopliae* senso latu (s.l.) usando tiras IPG (pH 3-10) e SDS-PAGE 15%. A: ovos do quinto dia de postura do grupo controle (fêmeas não tratadas); B: ovos do quinto dia de postura de fêmeas tratadas com *M. anisopliae* s.l. Os círculos em cada gel representam os spots analisados por MALDI-TOF-TOF. 81

CAPÍTULO IV

Figura 1. Estágio e condições de desenvolvimento de (A) *Vigna unguiculata* e (B) *Cucumis sativus* em laboratório após 12 dias de crescimento. 100

Figura 2. (A) Aplicação de suspensão fúngica em uma das folhas de *Vigna unguiculata* utilizando pincel previamente esterilizado por imersão etanol 70%. (B) Câmara superúmida para induzir a germinação do fungo artropodopatogênico. 102

Figura 3. Exemplos representativos da colonização endofítica de diferentes espécies de *Metarhizium* em feijão (*Vigna unguiculata*) e pepino (*Cucumis sativus*). Plantas controle sem crescimento fúngico (A, D, G, e J). *M. robertsii* crescendo em raízes (B) e folhas (E) de feijão que tiveram a superfície esterilizada; *M. robertsii* crescendo em raízes (H) e folhas (K) de pepino que tiveram a superfície esterilizada. *M. acridum* crescendo em raízes (C) e folhas (F) de feijão que tiveram a superfície esterilizada. *M. acridum* crescendo em raízes (I) e folhas (L) de pepino que tiveram a superfície esterilizada. 104

Figura 4. Perfil cromatográfico (HPLC-MS) do extrato de feijões (*Vigna unguiculata*) para a detecção de destruxinas. (A) Plantas não colonizadas por *Metarhizium robertsii* (controle negativo); (B) plantas colonizadas por *M. robertsii*; e (C) plantas não colonizadas por fungos mas pulverizadas com padrões de destruxinas (controle positivo). Ambas as sementes (com ou sem o fungo) foram incubadas por 12 dias em placas de Petri contendo filtro de papel umidificado sob condições controladas. Destruxinas foram extraídas utilizando-se metanol e cartuchos de extração em fase sólida. 105

Figura 5. Eletromicrografia de varredura de folhas de *Vigna unguiculata* 24 horas após aplicação foliar de suspensões de *Metarhizium brunneum* (A; C) e *Metarhizium robertsii* (B; D), com (A; B) ou sem (C; D) prévia aplicação de meio artificial batata dextrose ágar acrescido de cloranfenicol 0,05% e benomyl 0,002%. 106

Figura 6. Eletromicrografia de varredura de folhas de *Vigna unguiculata* 48 horas após aplicação foliar de suspensões de *Metarhizium brunneum* (A; B) e *Metarhizium robertsii* (C; D) sem prévia aplicação de meio artificial batata dextrose ágar acrescido de cloranfenicol e benomyl. 107

Figura 7. Microscopia óptica de fluorescência de folhas de *Vigna unguiculata* 72 horas após aplicação foliar de suspensões de *Metarhizium brunneum* isolado ARSEF 1095 (A) e *Metarhizium robertsii* isolado ARSEF 2575 (B) sem prévia aplicação de meio artificial. A seta indica a formação de apressório. 108

Figura 8. Re-isolamento fúngico em folhas de feijão cowpea (*Vigna unguiculata*) após aplicação foliar de suspensão aquosa de conídios de *Metarhizium brunneum*. (A): ausência de crescimento fúngico em raiz de feijão cowpea; (B): ausência de crescimento fúngico em caule de feijão cowpea; (C): uma das placas que apresentou ausência de crescimento fúngico em folha de feijão cowpea expostas a *M. brunneum*; (D, E, F): pedaços de folhas de *V. unguiculata* após esterilização superficial com crescimento aparente de *Metarhizium*. 109

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA	2
REFERÊNCIAS	10
CAPITULO I	18
“Caracterização de isolados de <i>Metarhizium</i> spp. em relação à tolerância à radiação UV-B, produção <i>in vitro</i> de destruxinas e virulência para <i>Galleria mellonella</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Rhipicephalus microplus</i> ”	
Resumo	19
Abstract	20
1 Introdução	21
2 Material e métodos	24
2.1 Local e período de execução dos experimentos	24
2.2 Isolados fúngicos	26
2.3 Preparo das suspensões e formulações fúngicas para o teste de tolerância à radiação UV-B	26
2.5 Produção <i>in vitro</i> de destruxinas	27
2.6 Detecção <i>in vivo</i> de destruxinas	28
2.7 Avaliação <i>in vitro</i> da virulência de isolados de <i>Metarhizium</i> spp. sobre larvas de insetos	28
2.8 Avaliação <i>in vitro</i> da virulência de isolados de <i>Metarhizium</i> spp. sobre larvas do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	29
2.9 Re-isolamento dos isolados fúngicos após ensaio biológico	30
3 Resultados	30
3.1 Germinação relativa dos isolados após exposição à radiação UV-B quando formulados ou não em óleo mineral	30
3.2 Produção <i>in vitro</i> de destruxinas	33
3.3 Detecção <i>in vivo</i> de destruxinas	37
3.4 Viabilidade dos isolados utilizados nos ensaios biológicos	37
3.5 Isolamento dos fungos após ensaios biológicos	37
3.6 Percentual de mortalidade das larvas de insetos	38
3.7 Percentual de mortalidade das larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	41
3.8 Comparação da virulência dos isolados sobre larvas de artrópodes	45
3.9 Comparação entre a produção de destruxinas e virulência fúngica	45
4 Discussão	46
Referências	50
CAPITULO II	58
“A influência da Pr1 conidial na virulência de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. contra <i>Rhipicephalus microplus</i> ”	
Resumo	59
Abstract	60
1 Introdução	61
2 Material e métodos	61
2.1 Local e período de execução dos experimentos	61
2.2 Isolado estudado e obtenção dos conídios	61

2.3 Atividade específica de Pr1	62
2.4 Expressão gênica de <i>pr1</i>	63
2.5 Ensaio biológico com larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	63
2.6 Isolamento do fungo após ensaios biológicos	64
3 Resultados	64
3.1 Viabilidade dos conídios	64
3.2 Atividade específica de Pr1	64
3.3 Expressão gênica de <i>pr1</i>	64
3.4 Ensaio biológico com larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	65
3.5 Re-isolamento fúngico	66
4 Discussão	66
Referências	68
CAPITULO III	72
“Perfil proteico de ovos provenientes de fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i> expostas a <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.”	
Resumo	73
Abstract	74
1 Introdução	75
2 Material e métodos	76
2.1 Local de realização dos experimentos	76
2.2 Manutenção da colônia de <i>Rhipicephalus microplus</i>	76
2.3 Obtenção e manutenção do isolado fúngico	76
2.4 Preparo da Suspensão de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	76
2.5 Viabilidade dos conídios	77
2.6 Infecção das fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	77
2.7 Re-isolamento fúngico	77
2.8 Dosagem de proteínas dos ovos	77
2.9 Eletroforese bidimensional	78
2.10 Digestão com tripsina	79
2.11 Espectrometria de massas - MALDI-TOF-TOF	79
2.12 Identificação das proteínas	79
3 Resultados	80
3.1 Viabilidade dos conídios utilizados na infecção das fêmeas	80
3.2 Confirmação da infecção de fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	80
3.3 Eletroforese bidimensional	80
3.4 Identificação das proteínas	82
3.5 Proteínas relacionadas à resposta imune em ovos de <i>Rhipicephalis microplus</i>	82
4 Discussão	91
Referências	92
CAPITULO IV	95
“Colonização endofítica de <i>Metarhizium</i> spp. em <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Cucumis sativus</i> ”	
Resumo	96
Abstract	97
1 Introdução	98
2 Material e métodos	99
2.1 Local e período de execução dos experimentos	99
2.2 Isolados fúngicos utilizados	99

2.3 Experimentos de inoculação fúngica em sementes de <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Cucumis sativus</i>	99
2.3.1 Inoculação dos fungos artropodopatogênicos <i>Metarhizium robertsii</i> e <i>Metarhizium acridum</i> em sementes de feijões e pepinos	99
2.3.2 Re-isolamento fúngico	99
2.3.3 Detecção de destruxinas <i>in planta</i> após inoculação de <i>Metarhizium</i> spp.	100
2.3.4 Efeito da presença de destruxinas no peso seco das plantas	101
2.4 Aplicação de <i>Metarhizium</i> spp. em folhas de <i>Vigna unguiculata</i>	101
2.5 Microscopia eletrônica de varredura de folhas de <i>Vigna unguiculata</i> após aplicação <i>Metarhizium brunneum</i> e <i>Metarhizium robertsii</i>	102
2.6 Microscopia óptica de fluorescência de folhas de <i>Vigna unguiculata</i> 72 horas após inoculação com <i>Metarhizium brunneum</i> e <i>Metarhizium robertsii</i>	102
2.7 Re-isolamento de <i>Metarhizium brunneum</i> em feijões após inoculação foliar	102
3 Resultados	103
3.1 Re-isolamento fúngico de plantas após inoculação de <i>Metarhizium robertsii</i> e <i>Metarhizium acridum</i> em sementes	103
3.2 Detecção de destruxinas <i>in planta</i> após inoculação fúngica em sementes de feijão e pepino	105
3.3 Efeito da presença de fungos artropodopatogênicos no peso seco das plantas	105
3.4 Análise da germinação de <i>Metarhizium brunneum</i> e <i>Metarhizium robertsii</i> 24 e 48 horas após aplicação sobre folhas de <i>Vigna unguiculata</i> através de MEV	105
3.5 Microscopia óptica de fluorescência de folhas de <i>Vigna unguiculata</i> 72 horas após inoculação com <i>Metarhizium brunneum</i> e <i>Metarhizium robertsii</i>	107
3.6 Re-isolamento de <i>Metarhizium brunneum</i> em feijões 15 dias após inoculação foliar	108
4 Discussão	110
Referências	112
CONCLUSÕES GERAIS	115
CONSIDERAÇÕES FINAIS	116

INTRODUÇÃO GERAL

O parasitismo pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* sobre bovinos está relacionado com a redução na produção de carne, leite e couro, menor desenvolvimento dos animais e transmissão de agentes patogênicos que causam doenças e mortalidade. O uso de produtos químicos é o principal método de controle de carrapatos. Os impactos ambientais causados pelo uso inadequado de produtos químicos juntamente com as crescentes preocupações com a segurança e a saúde humana estão conduzindo estudos que visam o controle alternativo de carrapatos, incluindo o uso de fungos artropodopatogênicos.

Metarhizium anisopliae sensu lato (s.l.) tem sido amplamente utilizado em programas de controle de insetos e apresenta resultados promissores contra carrapatos. A virulência de *M. anisopliae* s.l. pode estar relacionada com a produção de enzimas e metabólitos secundários. Dessa maneira, a caracterização de fatores de virulência contribui para a seleção de isolados mais adequados ao biocontrole. Informações relacionadas ao processo de infecção fúngica e à resposta imune dos carrapatos infectados também são aspectos que precisam ser explorados para que se possa compreender melhor os efeitos da infecção fúngica. Condições ambientais desfavoráveis, tais como alta incidência de radiação solar e altas temperaturas, são fatores que restringem o uso de fungo artropodopatogênicos a campo, afetando a viabilidade do conídio.

Com o objetivo de reunir alguns desses aspectos relacionados à ecologia e infectividade de *Metarhizium*, a presente tese apresenta seis capítulos abordando diferentes temáticas inseridas no contexto do uso de *Metarhizium* spp. no controle biológico de artrópodes, especialmente de *R. microplus*. No primeiro capítulo, objetivou-se classificar diferentes isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. quanto a tolerância à radiação UV-B. O segundo capítulo mostrou os diferentes níveis de produção de metabólitos secundários (i.e.: destruxinas) pelos mesmos isolados de *M. anisopliae* s.l. Já o terceiro capítulo apontou os diferentes níveis de virulência desses isolados para larvas de insetos e carrapatos. O quarto capítulo buscou associar os níveis de expressão e atividade enzimática da Pr1 com a virulência de um isolado de *M. anisopliae* s.l. para larvas de carrapato. Aspectos relacionados à resposta imune de ovos de *R. microplus* após tratamento fúngico de fêmeas foram relatados no quinto capítulo e novas perspectivas de aplicabilidade explorando o potencial endofítico de *Metarhizium* spp. foram investigadas no sexto e último capítulo da presente tese.

REVISÃO DE LITERATURA

Rhipicephalus microplus Canestrini, 1888 (Acari: Ixodidae) (MURREL; BARCER, 2003) conhecido como carrapato dos bovinos, é um artrópode hematófago responsável por causar enormes danos econômicos. O parasitismo está relacionado com a diminuição da produção de carne, leite e danos ao couro e também à morte de animais altamente infestados (GRISI et al., 2002). Este carrapato é vetor de importantes patógenos como *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* que juntamente com *Anaplasma marginale* são os agentes da tristeza parasitária bovina (HORN; ARTECHE, 1985). Para controlar este carrapato são usados principalmente acaricidas químicos e, embora a seleção progressiva das populações de carrapatos resistentes tenha estimulado a criação de novos produtos e associações, a resistência aos acaricidas vem progressivamente aumentando como resultado de seu uso intensivo e inadequado (GEORGE et al., 2004). Além disso, os efeitos residuais de vários acaricidas e a contaminação do meio ambiente, associados às crescentes preocupações com a segurança e a saúde humana estão conduzindo estudos para melhorar os métodos de controle alternativo incluindo o controle biológico (CHANDLER et al., 2000; FURLONG et al., 2007).

O uso de micro-organismos para o controle de pragas e insetos vetores foi proposto primeiramente em meados do século XIX (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Segundo Alves (1998), os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados no controle microbiano, isso porque aproximadamente 80% das doenças em insetos têm como agentes patogênicos estes agentes, pertencentes a mais de 700 espécies agrupadas em cerca de 90 gêneros.

Dentre os diversos métodos utilizados no controle biológico de carrapatos, a utilização de fungos artropodopatogênicos é uma das opções mais promissoras devido à capacidade de dispersão, espectro de hospedeiros e capacidade de penetrar via cutícula dos carrapatos (SAMISH; REHACEK, 1999; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008). As crescentes preocupações sobre a segurança do meio ambiente, a saúde humana, o aumento dos custos relacionados a produtos químicos, a crescente demanda por produtos orgânicos, a morte de organismos não-alvo e o aumento da resistência de carrapatos aos acaricidas químicos são fatores que tornam o uso de fungos artropodopatogênicos uma atraente alternativa (ALONSO-DÍAZ et al., 2007; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008).

Os fungos que apresentam patogenicidade para ácaros e carrapatos formam, provavelmente, um subgrupo dentro do grupo de fungos patogênicos para insetos, organizando-se filogeneticamente da mesma forma, porém com uma variedade menor de hospedeiros. Os carrapatos são hospedeiros em potencial para organismos como os fungos, pois geralmente habitam ambientes úmidos e ao abrigo do sol favorecendo a infecção e a transmissão desses patógenos (CHANDLER et al., 2000).

Os ascomicetos *Beauveria bassiana* s.l. e *Metarhizium anisopliae* s.l. são os fungos artropodopatogênicos mais bem caracterizados e amplamente utilizados em programas de controle biológico de pragas (ALVES, 1998; ZIMMERMANN, 2007a, 2007b; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Além destas espécies, outras como *Beauveria brongniartii* s.l., *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*), *Isaria farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*) e *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) também apresentam potencial patogênico contra

carrapatos e ácaros, além de insetos (ALVES, 1998; CHANDLER et al., 2000; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; ANGELO et al., 2010).

Beauveria bassiana s.l. é a mais largamente distribuída espécie do gênero e é geralmente encontrada em insetos infectados tanto em regiões de clima temperado quanto em regiões de clima tropical (ZIMMERMANN, 2007a). Vários trabalhos reportam o potencial patogênico desse fungo contra o carrapato *R. microplus* e seus respectivos estágios de vida (BITTENCOURT et al., 1996; CASTRO et al., 1997; PAIÃO et al., 2001; FERNANDES et al., 2003; POSADAS; LECUONA, 2009). Atualmente *B. bassiana* s.l. também é considerado um complexo de espécies (REHNER et al., 2011).

Metarhizium Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) é um gênero mundialmente distribuído e frequentemente isolado do solo e de artrópodes infectados. Este fungo é responsável por causar uma doença comumente conhecida como “muscardine verde” devido à proliferação de conídios verdes sobre os cadáveres dos artrópodes atingidos (ROBERTS; ST LAGER, 2004). Este gênero pode ser encontrado facilmente nos solos, nas rizosferas de plantas ou em cadáveres de artrópodes e possui uma distribuição mundial que vai dos trópicos ao ártico (ZIMMERMANN, 2007b; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). No solo é capaz de sobreviver por longos períodos e acredita-se que ocorra naturalmente em mais de 300 espécies de insetos, incluindo importantes pragas (ALVES, 1998). Trabalhos atuais vêm mostrando que isolados de *M. anisopliae* possuem uma variabilidade genética tal indicando que *M. anisopliae* não é uma espécie, mas sim um grupo ou complexo de espécies (BIDOCHKA et al., 2005; FERNANDES et al., 2010). Bischoff e colaboradores (2009) propuseram uma reorganização para o gênero *Metarhizium* caracterizando *M. anisopliae* como um complexo composto por nove espécies: *Metarhizium pingshaense*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium robertsii*, *Metarhizium brunneum*, *Metarhizium majus*, *Metarhizium guizhounse*, *Metarhizium lepidiotae*, *Metarhizium acridum* e *Metarhizium globosum*. Portanto o isolado de *M. anisopliae* que não tenha sido identificado de acordo com Bischoff e colaboradores (2009) deve ser referido como *M. anisopliae* senso lato (s.l.); fungo que vem sendo utilizado como sistema modelo para estudos da interação fungo-artrópode. *Metarhizium* spp. é capaz de se proliferar em várias espécies de insetos, carrapatos e até raízes de plantas (COSTA et al., 2002; ROBERTS; ST LAGER, 2004; FERNANDES et al., 2010; SASAN; BIDOCHKA, 2012).

O controle biológico de carrapatos utilizando fungos artropodopatogênicos

O uso de fungos artropodopatogênicos no controle de carrapatos tem sido alvo de diversas pesquisas (CHANDLER et al., 2000; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; CAMARGO et al., 2012). As espécies do complexo *M. anisopliae* estão entre os agentes mais comumente usados no biocontrole de insetos praga (ALVES, 1998; ROBERTS; ST LAGER, 2004) e também apresentaram resultados promissores em testes *in vitro* contra *R. microplus* (CAMARGO et al., 2012; QUINELATO et al., 2012). Embora a virulência deste fungo artropodopatogênico contra *R. microplus* tenha sido demonstrada sob condições laboratoriais, existem poucos estudos relacionando características fúngicas intrínsecas (i.e.: níveis de produção de destruxinas, níveis de expressão de enzimas proteolíticas) que possam ser associadas aos níveis de virulência contra carrapatos.

O processo de infecção causado por *M. anisopliae* s.l. começa com esporos especializados se aderindo ao hospedeiro, germinando e penetrando através do tegumento. De acordo com Bittencourt e colaboradores (1999), após se aderir e sob condições apropriadas de temperatura e umidade, a germinação começa na cutícula de *R. microplus*. Para ultrapassar a cutícula do hospedeiro, o fungo artropodopatogênico deve secretar proteases, quitinases e lipases para degradação de seus principais constituintes (proteínas, quitina e lipídios), permitindo a penetração da hifa (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Santi e colaboradores (2010) reportaram atividades proteolítica e lipolítica associadas às proteínas de superfície conidial que seriam importantes para os estágios iniciais da infecção fúngica. Após a hipertrofia do conídio, ocorre o desenvolvimento dos tubos germinativos e do apressório (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). O apressório é uma estrutura que funciona como uma ancora para facilitar a penetração fúngica através de pressão mecânica e secreção enzimática (DÍAS et al., 2006). De acordo com Hajek e St Leger (1994), o apressório representa uma adaptação para concentrar energia física e enzimas líticas sobre uma pequena área permitindo uma maior eficiência no processo de penetração. *M. anisopliae* s.l. produz uma série de proteases como subtilisinas (Pr1), tripsinas (Pr2), cisteínas proteases (Pr4) e metaloproteases; e essa produção enzimática pode estar diretamente relacionada ao aumento na virulência (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

Em insetos, após a invasão fúngica, as hifas presentes na hemolinfa passam a se diferenciar em blastosporos (células unicelulares). O hospedeiro morre em decorrência dos danos físicos causados pelo crescimento fúngico e ação de toxinas, como as destruxinas (HAJEK; ST LEGER, 1994; ROBERTS; ST LEGER, 2004). Ao mesmo tempo, o hospedeiro objetiva parar o processo infeccioso ativando seu sistema imune, desencadeando processos como a fagocitose, formação nodular, melanização, encapsulamento além da síntese de substâncias antimicrobianas (DÍAS et al., 2006). Contudo, para burlar os mecanismos de relacionados à resposta imune, o fungo artropodopatogênico produz enzimas e toxinas, envolvidas com a modificação da integridade estrutural, inibição de processos seletivos e a interferência nos sistemas regulatórios do hospedeiro (HAJEK; ST. LEGER, 1994).

Destruxinas: metabólitos secundários produzidos por *Metarhizium* spp.

As destruxinas são hexadepsipeptídeos compostos por cinco resíduos de aminoácidos e um α -hidroxil ácido; esses compostos podem ser produzidos por várias espécies fúngicas, tanto artropodopatogênicas quanto fitopatogênicas (PEDRAS et al., 2002; LIU; TZENG, 2012) e estão entre os mais estudados metabólitos secundários produzidos por fungos. O nome destruxina é derivado de “destructor”, da espécie *Oospora destructor*, o fungo artropodopatogênico de onde esses metabólitos foram primeiramente isolados. Mais tarde *O. destructor* foi renomeado *M. anisopliae* s.l., mas o nome destruxina permaneceu. Diferentes destruxinas estruturalmente relacionadas têm sido isoladas de culturas de *Aschersonia aleyrodis*, *Alternaria brassicae*, *Beauveria felina*, *Nigrosabulum globosum* e *M. anisopliae* s.l. (LIU; TZENG, 2012). A literatura reporta 39 análogos que se diferenciam pelo grupamento R do resíduo hidroxil ácido e apesar da aparente sobreposição possuem diferentes efeitos biológicos (PAL et al., 2007). Estes efeitos incluem ação inseticida, herbicida, citotóxico, imunossupressivo, fitotóxico e antiviral (VILCINSKAS et al., 1997; HU; REN, 2004; RUIZ-SANCHEZ et al., 2010,

LIU; TZENG, 2012). As destruxinas são os mais prevalentes dos metabólitos secundários produzidos por *M. anisopliae* s.l. em fermentação (MOON et al., 2008). Os órgãos alvo destes peptídeos cíclicos em insetos incluem geralmente o intestino, túbulos de Malpighi e hemócitos circulantes (DUMAS et al., 1996). A literatura também relata diferentes modos de ação, como contato, inanição, regulação no crescimento, imunossupressão e ativação dos canais musculares de cálcio (DUMAS et al., 1996; MOON et al., 2008; LIU; TZENG, 2012).

Existem dois modos para produzir destruxinas: através de fontes naturais ou quimicamente. Bayley e colaboradores (1996) sugeriram o envolvimento de peptidossintetases multifuncionais não ribossômicas na biossíntese destes metabólitos secundários; o que foi confirmado por Wang e colaboradores (2012). Estes autores reportaram que um grupamento de genes é responsável pela codificação de enzimas (*dtxS1*, *dtxS2*, *dtxS3* e *dtxS4*) capazes de sintetizar a toxina e seus análogos. Wang e colaboradores (2012) interromperam genes-alvo de *M. anisopliae* (isolado reclassificado por Bischoff e colaboradores (2009) como *M. robertsii*) objetivando esclarecer o processo de biossíntese, sugerindo ainda que a aquisição desse grupamento de genes responsáveis pela produção de destruxina em linhagens de *Metarhizium* é coordenada pela evolução da especificidade fúngica ao hospedeiro.

Recentemente, Donzelli e colaboradores (2012) reportaram as bases genéticas de produção de destruxina. Segundo esses autores, a produção desses compostos possui um padrão que começa com níveis baixos de detecção nas fases iniciais de crescimento fúngico e aumenta com o tempo. Eles também observaram através do nocaute do gene (transformação mediada por *Agrobacterium*) responsável pela síntese de destruxinas que mutantes que não sintetizavam esses compostos foram tão virulentos quanto o isolado controle (que possuía e expressava o gene capaz de produzir destruxinas) em bioensaios com larvas de *Spodoptera exigua*, *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor* sugerindo que destruxinas não estão associadas à virulência de *Metarhizium* nesses hospedeiros. Até a presente data, existe apenas um estudo que trata dos efeitos de destruxina A sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (GOLO et al., 2011). Os autores reportaram que os parâmetros biológicos analisados não diferiram entre os grupos controle e os tratados.

Fatores abióticos que influenciam a patogenicidade fúngica

Os estresses ambientais como a radiação UV, o calor e a umidade relativa representam sérios entraves no uso de fungos artropodopatogênicos a campo, uma vez que esses fatores afetam total ou parcialmente a taxa de germinação, particularmente a radiação ultravioleta (incluindo os componentes UV-A e UV-B) (FARGUES et al., 1996; BRAGA et al., 2001 a,b). Portanto, a ação promissora de fungos artropodopatogênicos (i.e., *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp.) depende não somente das características intrínsecas do isolado fúngico (i.e., produção de enzimas, toxinas) mas também da susceptibilidade do hospedeiro e das condições ambientais.

Radiação solar é o termo empregado à energia emitida pelo sol. A radiação solar é dividida em radiação infravermelha (comprimento de onda de 700 nm a 1 mm), espectro visível (de 400 nm a 700 nm), e radiação ultravioleta (UV) (de 15 nm a 400 nm). Por sua vez a radiação UV também é dividida em 3 partes: a radiação UV-A (de 400 nm a 320 nm), UV-B (de 320 nm a 280 nm), e UV-C ou germicida (de 280 nm a 100 nm). A totalidade da radiação UV-C é absorvida pelo oxigênio e ozônio presentes na atmosfera; a maior

parte (não a totalidade) da radiação UV-B também é absorvida pelo ozônio; portanto a maior parte (cerca de 99%) da radiação UV emitida pelo sol é representada pela UV-A.

A porção UV-B é muito mais prejudicial do que a UV-A. A radiação UV-B pode causar graves danos a nível celular através da indução à formação de dímeros de pirimidina nas moléculas de DNA (SLIEMAN; NICHOLSON, 2000). As células possuem enzimas capazes de identificar e reparar estes danos. Entretanto, a exposição prolongada à esse tipo de radiação leva a formação de uma quantidade excessiva de dímeros de pirimidina, e a célula já não consegue responder ao problema o que leva o aparecimento de mutações e a interrupção no processo de transcrição (GRIFFITHS et al., 1998). Quando comparado com a UV-A, a UV-B é muito mais severa, já que ela está diretamente ligada à sobrevivência do conídio.

A susceptibilidade à radiação UV-B nos fungos artropodopatogênicos varia consideravelmente (FERNANDES et al., 2007; RANGEL et al., 2004). Essa tolerância à radiação UV envolve também o tipo de substrato e o favorecimento nutricional nos quais os conídios são produzidos. De acordo com Rangel e colaboradores (2004), conídios de *M. anisopliae* s.l. produzidos sobre cadáveres de insetos foram significativamente mais sensíveis à radiação UV-B quando comparados com conídios produzidos em meio batata dextrose agar (BDA) acrescido de extrato de levedura. Conídios produzidos em meio Czapek e Emerson YpSs ou em grãos de arroz obtiveram maior tolerância à radiação UV-B (RANGEL et al., 2004). Dessa maneira, a seleção de isolados intrinsecamente tolerantes à UV-B, associada a manipulação nutricional do fungo e à adição de substâncias protetoras na formulação fúngica são aspectos essenciais para melhorar o potencial de utilização de fungos artropodopatogênicos a campo. As formulações, de uma maneira geral, contribuem para uma maior tolerância do micro-organismo às condições abióticas estressantes do meio ambiente. Sabendo que a resposta de diferentes isolados fúngicos à adição de óleo numa formulação pode variar, o estudo envolvendo a caracterização da tolerância à radiação ultravioleta em conídios formulados ou não é também de extrema importância.

O sistema imune de carrapatos

Para atingir um organismo invertebrado, o patógeno deve transpor uma série de barreiras físicas e químicas. Além disso, alguns aspectos comportamentais dos invertebrados também dificultam as infecções. O tegumento e o intestino representam as primeiras barreiras de uma maneira geral. À medida que micro-organismos conseguem transpor essas barreiras uma série de reações ao nível celular e humoral ocorrem (TAYLOR, 2006).

Acreditava-se, entretanto, que os invertebrados defendiam-se das infecções através de um sistema imune inato sem conseguir estabelecer memória imunológica (HOFFMANN, 2003), entretanto, respostas de memória imunológica foram descritas em organismos invertebrados (MULLER et al., 2008; RODRIGUES et al., 2010). Rodrigues e colaboradores (2010) estimularam a nível sistêmico o sistema imune de *Anopheles gambiae* utilizando protozoários do gênero *Plasmodium*, e após uma re-estimulação a resposta ao parasito foi mais efetiva, uma vez que o mosquito pôde adaptar-se modulando a quantidade e capacidade de resposta das diferentes populações de hemócitos.

Taylor (2006) fez uma ampla revisão sobre o sistema imune de carrapatos e destacou as respostas mediadas por células (hemócitos) e a resposta humoral. Os

hemócitos estão relacionados aos processos de fagocitose, formação de nódulos e encapsulamento. A fagocitose é responsável por remover da hemolinfa invasores circulantes através do reconhecimento, englobamento e destruição intracelular (SILVA et al., 2006; LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). A nodulação e o encapsulamento foram verificados no carrapato *Dermacentor variabilis* e são mecanismos de suma importância na resposta imune mediada por células (EGGENBERGER et al., 1990; CERAUL et al., 2002). O encapsulamento está relacionado ao aprisionamento de partículas ou invasores maiores que os hemócitos e utiliza-se de várias camadas de células afim de isolá-los da circulação ativa (TAYLOR, 2006).

Cinco classes de hemócitos foram identificadas em carrapatos: pro-hemócitos, que possivelmente são células precursoras dos outros hemócitos (SONENSHINE, 1991); plasmatócitos, responsáveis pelo processo de fagocitose, exibindo respostas não específicas a antígenos corpusculares, partículas inertes e células estranhas (PEREIRA et al., 2001; SILVA et al., 2006); granulócitos I e II, envolvidos no processo de fagocitose, encapsulamento e deposição de substâncias na superfície do invasor que impedem sua união aos tecidos do hospedeiro; esferulócitos e oenocitóides (SONENSHINE, 1991).

Três principais tipos de respostas humorais têm sido caracterizados em artrópodes: o encapsulamento humoral, hemaglutinação e produção de substâncias antimicrobianas (TAYLOR, 2006). O encapsulamento humoral envolve a formação de um agregado frouxo de material melanótico que vai sendo acumulado ao redor da partícula ou organismo invasor, tornando-se cada vez mais denso até envolver totalmente o material estranho (TAYLOR, 2006). As hemaglutininas (ou lectinas) presentes nos invertebrados estão envolvidas nos processos de adesão celular, opsonização, fagocitose e citólise (VASTA; MARCHALONIS, 1983). As lectinas nos carrapatos atuam, aparentemente, da mesma forma que em outros invertebrados e vertebrados, ligando-se a invasores, facilitando a fagocitose ou a citólise (TAYLOR, 2006). Apesar de ainda não estar muito bem caracterizado, sugere-se que as lectinas possam mediar o processo de nodulação (MARMARAS; LAMPROPOULOU, 2009).

As substâncias antimicrobianas são capazes de afetar um grande número de micro-organismos, como vírus, bactérias e alguns fungos. Apesar do modo de ação dos peptídeos antimicrobianos não estar totalmente esclarecido, aparentemente as interações lipoprotéicas e os processos mediados por reconhecimento de receptores são as principais maneiras de ação dessas substâncias. Os peptídeos antimicrobianos interagem com componentes de membranas citoplasmáticas e podem também atuar em alvos intracelulares sem, necessariamente, romper a membrana celular (MOOKHERJEE; HANCOCK, 2007).

Proteínas e peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos estão largamente distribuídos na natureza, presentes em insetos, carrapatos, plantas e em animais que possuem sistema imune mais complexo (MOOKHERJEE; HANCOCK, 2007) e representam uma resposta humoral efetiva a partículas/organismos estranhos atacando diretamente esses micro-organismos invasores. Esses fatores antimicrobianos podem ser expressos naturalmente (constitutivos) (FOGAÇA et al., 2004, ESTEVES et al., 2009) ou transcritos devido ao estímulo provocado por infecção (JOHNS et al., 2001). Além disso, são traduzidos e/ou estão presentes em diversos órgãos de carrapatos, incluindo glândulas salivares

(VALENZUELA et al., 2002; LIMA et al., 2006), intestino (FOGAÇA et al., 1999; SONENSHINE et al., 2005; ZHOU et al., 2006), corpo gorduroso (órgão biossintético análogo ao fígado dos vertebrados) (HYNES et al., 2005; LIMA et al., 2006), hemócitos (HYNES et al., 2005; FOGAÇA et al., 2006; ZHOU et al., 2006), ovários (FOGAÇA et al., 2004; LIMA et al., 2006) e hemolinfa (JOHNS et al., 1998, 2001; FOGAÇA et al., 2004).

Dentre as principais proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana encontrados em carrapatos destacam-se as lisozimas, cistatinas, defensinas, fragmentos de hemoglobina e microplusinas. As lisozimas são enzimas que podem ser encontradas em grande parte dos organismos e são responsáveis pela hidrólise de peptidoglicanos presentes na parede celular de bactérias (WOHLKÖNIG et al., 2010). As lisozimas foram o primeiro fator antimicrobiano a ser estudado na hemolinfa de insetos e vem sendo identificadas também em carrapatos (SONENSHINE et al., 2005; TAYLOR, 2006).

As cistatinas são inibidores reversíveis de cisteíno-proteases amplamente estudadas em vertebrados devido a sua função de mediar a proteólise nos lisossomos e prevenir danos causados por cisteíno-proteases encontradas fora dessas vesículas enzimáticas (TAYLOR, 2006). Lima e colaboradores (2006) mostraram que genes de cistatina eram expressos nos ovários e corpo gorduroso de fêmeas engurgitadas de *R. microplus*. Segundo esses autores, cistatinas foram detectadas em géis de poliacrilamida dos ovários, corpo gorduroso e glândulas salivares, entretanto não foram detectadas em extratos de ovos e larvas.

Dos peptídeos antimicrobianos descritos em carrapatos, quatro já foram caracterizados em *R. microplus*: defensina, ixodidina, Hb 33-61 e microplusina (FOGAÇA et al., 1999; 2004; 2006; ESTEVES et al., 2009). Fogaça e colaboradores (2004) isolaram um peptídeo antimicrobiano com massa molecular de 4285 Da e seis resíduos de cisteína da hemolinfa de *R. microplus* com similaridade aos membros da família de defensinas de insetos. A análise de sua sequência gênica demonstrou que esse peptídeo antimicrobiano é expresso na forma de pró-pré-peptídeo assim como as defensinas dos insetos. A ixodidina foi isolada de hemócitos e possui 7103 Da e dez resíduos de cisteína (FOGAÇA et al., 2006). Este peptídeo antimicrobiano foi capaz de inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*. A microplusina foi identificada na hemolinfa de *R. microplus* e a expressão de seu gene foi observada em ovários, corpo gorduroso e hemócitos desse carrapato (FOGAÇA et al., 2004). Esteves e colaboradores (2009) reportaram a presença desse mesmo peptídeo antimicrobiano no macerado e na superfície de ovos de *R. microplus*. A microplusina tem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos (ESTEVES et al., 2009) e é expressa na forma de pré-peptídeo com um peptídeo sinal composto de 20 aminoácidos (FOGAÇA et al., 2004).

O peptídeo antimicrobiano Hb 33-61 foi purificado do tubo digestivo de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. A sequência de aminoácidos que dá origem a esse peptídeo foi obtida e observou-se que havia semelhança com um fragmento da cadeia α da hemoglobina bovina. O Hb 33-61 possui 3205,7 Da, é obtido através da ação de enzimas digestivas específicas do carrapato e apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos (FOGAÇA et al., 1999).

A maior parte dos estudos sobre o sistema imunológico de carrapatos se concentram, principalmente, nos estágios de ninfa e adulto (TAYLOR, 2006;

SONENSHINE; HYNES, 2008). Até o momento, não foram encontrados na literatura estudos que identifiquem componentes da resposta imune nos ovos de carrapatos após infecção fúngica das fêmeas; entretanto, o avanço do controle desses ectoparasitos com o uso de fungos artropodopatogênicos requer profundo conhecimento do processo de patogenicidade e suas correspondentes características durante todos os estágios de desenvolvimento.

A capacidade endofítica de fungos artropodopatogênicos

Na busca por diferentes abordagens que possam contribuir para avanços no controle biológico de artrópodes praga, atentou-se para a capacidade que alguns fungos artropodopatogênicos tem de se desenvolver no interior de plantas ou na sua rizosfera, e o papel benéfico que esses fungos podem representar para a planta hospedeira (BEHIE et al. 2012; SASAN; BIDOCHKA, 2012). De acordo com esses autores a presença de *Metarhizium robertsii* no interior de plantas contribui para o desenvolvimento nutricional da planta e pode atuar na transferência de nitrogênio de insetos infectados para o interior da planta.

Segundo reportado na literatura, *B. bassiana* (VEGA et al., 2008; GURULINGAPPA et al., 2010; PARSA et al., 2013), *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*) (PETRINI 1981; GURULINGAPPA et al., 2010), *Isaria farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*) (BILLS; POLISHOOK, 1991) e *M. robertsii* (SASAN; BIDOCHKA, 2012) podem se desenvolver no sistema vascular de plantas ou de parte delas, como as raízes. *B. bassiana* pode ser isolada de plantas naturalmente infectadas (VEGA et al., 2008), e também re-isolada após inoculação artificial em várias espécies de plantas importantes na agricultura como: banana, feijão, café, milho, algodão, tomate, e trigo (GURULINGAPPA et al., 2010). Bing e Lewis (1991) reportaram que o aparecimento de túneis (tunelamento) no milharal em decorrência da infestação por larvas de *Ostrina nubilalis* (broca europeia do milho) foi reduzido quando as plantas estavam endofiticamente colonizadas por *B. bassiana*.

Embora a maioria dos trabalhos envolvendo fungos artropodopatogênicos relacionem a redução dos danos causados por insetos a sua morte em decorrência da infecção fúngica direta, Vega e colaboradores (2008) sugeriram que essa supressão observada por Bing e Lewis (1991) fosse resultado do efeito do fungo presente na plantação que causaria inanição nas larvas; inanição esta que estaria relacionada à produção de metabólitos secundários, como as destruxinas. Mais recentemente, Gurulingappa e colaboradores (2010) estudaram os efeitos de endófitos (*B. bassiana*, *L. lecanii* e *Aspergillus parasiticus*) na reprodução e crescimento de *Aphis gossypii* (piolho-do-algodão) e *Chortoicetes terminifera* (gafanhotos australianos). Eles reportaram que a presença dos endófitos reduziu significativamente a reprodução dos afídios e a taxa de crescimento dos gafanhotos, mas a morte desses insetos não pode ser observada diretamente.

Até a presente data nenhum trabalho reportou a relação entre a capacidade endofítica de *Metarhizium* com a mortalidade ou alterações nos parâmetros biológicos de artrópodes praga. Akutse e colaboradores (2013) reportaram, entretanto que nenhum dos dois isolados de *Metarhizium* estudados foram capazes de colonizar as plantas *Vicia faba* (fava) e *Phaseolus vulgaris* (feijão comum).

REFERÊNCIAS

- AKUTSE, K.S.; MANIANIA, N.K.; FIABOE, K.K.M.; VAN DEN BERG, J.; EKESI, S. Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on life history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). **Fungal Ecology**, v. 6, p. 293-301, 2013.
- ALONSO-DIAZ, M.A., GARCIA, L., GALINDO-VELASCO, E., LEZAMA-GUTIERREZ, R., ANGEL SAHAGUN, C.A., RODRIGUEZ-VIVAS, R.I., FRAGOSO-SANCHEZ, H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 3-4, p. 336-340, 2007.
- ALVES, S.B., 1998, **Fungos entomopatogênicos**, In: Alves, S.B. (Ed.) Controle Microbiano de Insetos. FEALQ, Piracicaba, pp. 289-382.
- ANGELO, I.C.; FERNANDES, E.K.K.; BAHIENSE, T.C.; PERINOTTO, W.M.S.; MORAES, A.P.R.; TERRA, A.L.M.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 3-4, p. 317-322, 2010.
- BAILEY, A.M.; KERSHAW, M.J.; HUNT, B.A.; PATERSON, I.C.; CHARNLEY, A.K.; REYNOLDS, S.E.; CLARKSON, J.M. Cloning and sequence analysis of an intron-containing domain from a peptide synthetase- encoding gene of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v. 173, p. 195-197, 1996.
- BEHIE, S.W.; ZELISKO, P.M.; BIDOCHKA, M.J. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. **Science**, v. 336, p. 1576-1577, 2012.
- BIDOCHKA, M.J.; SMALL, C.L.; SPIRONELLO, M. Recombination within sympatric cryptic species of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Environmental Microbiology**, v.7, n. 9, p.1361-1368, 2005.
- BILLS, G.F.; POLISHOOK, J.D. Microfungi from *Carpinus caroliniana*. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 1477-1482, 1991.
- BING, L.A.; LEWIS, L.C. Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepdoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. **Environmental Entomology**, v. 20, p. 1207-1211, 1991.
- BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v.101, n. 4, p.512-530, 2009.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato

Boophilus microplus (Canestrini, 1887). **Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 17, p. 83-88, 1995.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; PERALVA, S.L.E.S.; VIEGAS, E.C.; ALVES, S.B. Avaliação dos efeitos do contato de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com ovos e larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.5, p. 81-84, 1996.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 29, p. 351-354, 1999.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MESSIAS, C.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Effects of UVB irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. **Photochemistry and Photobiology**, v.73, p.140-146, 2001a.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, p. 734-739, 2001b.

CAMARGO, M.G.; GOLO, P.S.; ANGELO, I.C.; PERINOTTO, W.M.S.; SA, F.A.; QUINELATO, S. BITTENCOURT, V.R.E.P. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 140-147, 2012.

CASTRO, A.B.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E.; VIEGAS, E.C. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, Seropédica, v.19, p.73-82, 1997.

CERAUL, S.M.; SONENSHINE D.E.; HYNES, W.L. Resistance of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) following challenge with the bacterium *Escherichia coli* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 2, p. 376–378, 2002.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J.K.; BALL, B.V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K.D. Fungal biocontrol of Acari. **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, p. 357-384, 2000.

COSTA, G.L.; SARQUIS, M.I.M.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 154, n. 4, p. 207-209, 2002.

DÍAZ, M.P.; MACÍAS, A.F.; NAVARRO, S.R.; TORRE, M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. **Interciencia**, v. 31, p. 856-860, 2006.

DONZELLI, B.G.G.; KRASNOFF, S.B.; SUN-MOON, Y.; CHURCHILL, A.C.L.; GIBSON, D.M. Genetic basis of destruxin production in the entomopathogen *Metarhizium robertsii*. **Current Genetics**, v. 58, p. 105-116, 2012.

DUMAS, C.; RAVALLEC M.; MATHA V.; VEY A. Comparative study of the cytological aspects of the mode of action of destruxins and other peptidic fungal metabolites on target epithelial cells. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, p. 137-146, 1996.

EGGENBERGER, L.R.; LAMOREAUX, W.J.; COONS, L.B. Hemocytic encapsulation of implants in the tick *Dermacentor variabilis*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 9, n. 279-287, 1990.

ESTEVEZ, E.; FOGAÇA, A. C.; MALDONADO, R.; SILVA, F.D.; MANSO, P.P.A.; PELAJO-MACHADO, M.; VALLE, D.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, n. 8, p. 913-919, 2009.

FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L.A.; LOMER, C.J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. **Mycopathologia**, v. 135, p. 171-181, 1996.

FERNANDES, E.K.K.; COSTA, G.L.; SOUZA, E.J.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. *Beauveria bassiana* isolated from engorged females and tested against eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 393-398, 2003.

FERNANDES, É.K.K.; RANGEL, D.N.E.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ROBERTS, D. W. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 237-243, 2007.

FERNANDES, É.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, p.71-93, 2008.

FERNANDES, É.K.K.; KEYSER, C.A.; CHONG, J.P.; RANGEL, D.E.N.; MILLER, M.P.; ROBERTS, D.W. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, n. 1, p.115-128, 2010.

FOGACA, A.C.; DA SILVA P.I.; TERESA J.R.M.; MIRANDA M.; BIANCHI, A.G.; MIRANDA, A.; RIBOLLA, P.E.M.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 36, p. 25330-25334, 1999.

FOGACA, A.C.; LORENZINI, D.M.; KAKU, L.M.; ESTEVES, E.; BULET, P.; DAFFRE, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of three cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 3, p. 191-200, 2004.

FOGACA, A.C.; ALMEIDA, I.C.; EBERLIN, M.N.; TANAKA, A.S.; BULET, P.; DAFFRE, S. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. **Peptides**, 27, n. 4, p. 667-674, 2006.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.; PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v. 27, p. 1-7, 2007.

GEORGE, J.E.; POUND, J.M.; DAVEY, R.B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S353-S366, 2004.

GOLO, P.S.; ANGELO, I.C.; CAMARGO, M.G.; PERINOTTO, W.M.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Effects of destruxin A on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, in press, 2011.

GRIFFITHS, H.R.; MISTRY, P.; HERBERT, K.E.; LUNEC, J. Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 35, p. 189-237, 1998.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA-BORJA, G.E.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, p. 8-10, 2002.

GURULINGAPPA, P.; SWORD, G.A.; MURDOCH, G.; MCGEE, P.A. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effect on two insect pests when *in planta*. **Biological Control**, v. 55, p. 34-41, 2010.

HAJEK, A.E.; ST. LEGER, R.J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**, v. 39, p. 293-322, 1994.

HYNES, W. L.; CERAUL, S.M.; TODD, S.M.; SEGUIN, K.C.; SONENSHINE, D.E. A defensin-like gene expressed in the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 19, n. 4, p. 339-344, 2005.

HOFFMANN, J.A. The immune response of *Drosophila*. **Nature**, v. 426, n. 6962, p. 33-38, 2003.

HORN, S.C.; ARTECHE, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A hora Veterinária**, v. 4, p. 12-32, 1985.

HU, Q.; REN, S. Review of destruxins of *Metarhizium anisopliae* Sorokin. **Chinese Journal of Biological Control**, v. 20, p. 234-242, 2004.

JOHNS, R.; SONENSHINE, D.E.; HYNES, W.L. Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 4, p. 458-464, 1998.

JOHNS, R.; SONENSHINE, D.E.; HYNES, W.L. Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 9, p. 857-865, 2001.

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster* **Annual Review of Immunology**, v.25, p.697-743, 2007.

LIMA, C.A.; SASAKI, S.D.; TANAKA, A.S. Bmcystatin, a cysteine proteinase inhibitor characterized from the tick *Boophilus microplus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 347, n.1, p. 44-50, 2006.

LIU, B-L; TZENG, Y-M. Development and applications of destruxins: a review. **Biothechnology Advances**, v. 30, p. 1242-1254, 2012.

MARMARAS. V.J.; LAMPROPOULOU, M. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. **Cellular Signalling**, v.21, n. 2, p.186-195, 2009.

MOON, Y-S.; DONZELLI, B.G.G.; KRASNOFF, S.B.; McLANE, H.; GRIGGS, M.H.; COOKE, P.; VANDENBERG, J.D.; GIBSON, D.M.; CHURCHILL, A.C.L. *Agrobacterium*-mediated disruption of a nonribosomal peptide synthetase gene in the invertebrate pathogen *Metarhizium anisopliae* reveals a peptide spore factor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 4366-4380, 2008.

MOOKHERJEE, N.; HANCOCK, R.E. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n.7-8, p. 922-933, 2007

MULLER, U.; VOGEL, P.; ALBER, G.; SCHAUB, G. **The innate immune system of mammals and insects**. Egesten A, Schmidt A, Herwald H (eds). In: Trends in innate Immunity. Contributions to Microbiology. Basel, Karger, v. 15, p. 21-44, 2008.

MURREL, A.; BARKER, S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, p. 169-172, 2003.

PAIÃO, J.C.V.; MONTEIRO, A.C.; KRONKA, S.N. Susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. **World Journal of Microbiology and Biochemistry**, v. 17, n. 3, p. 245-251, 2001.

PAL, S.; LEGER, R.J.S.; WU, L.P. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 8969-8977, 2007.

PARSA, S.; ORTIZ, V.; VEGA, F.E. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. **Journal of Video Experiments**, v. 74, e50360, 2013.

PETRINI, O. Endophytische pilze in *Epiphytischen araceae*, *Bromeliaceae* and *Orchidiaceae*. **Sydowia**, v. 34, p. 135-148, 1981.

PEDRAS, M.S.C.; ZAHARIA, L.I.; WARD, D.E. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. **Phytochemistry**, v. 59, p. 579-596, 2002.

PEREIRA, L.S.; OLIVEIRA, P.L.; BARJA-FIDALGO, C.; DAFFRE, S. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 66-72, 2001.

POSADAS, J.; LECUONA, R. Selection of native isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for the microbial control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 2, p. 284-291, 2009.

QUINELATO, S.; GOLO, P.S.; PERINOTTO, W.M.S.; SÁ, F.A.; CAMARGO, M.G.; ANGELO, I.C.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 556-565, 2012.

RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D. ; ANDERSON, A.J. ; ROBERTS, D.W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, p. 77-83, 2004.

REHNER, S.A.; MINNIS, A.M.; SUNG, G.H.; LUANGSA-ARD, J.J.; DEVOTTO, L.; HUMBER, R.A. Phylogeny and systematics of the anamorphic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v. 103, p. 1055-1073, 2011.

ROBERTS, D.W.; ST LEGER, R.J. *Metarhizium spp.*, cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. **Advances in applied microbiology**, v. 54, p. 1-70, 2004.

RODRIGUES, J.; BRAYNER, F.A.; ALVES, L.C; DIXIT, R.; BARILLAS-MURY, C. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. **Science**, v.329, n. 5997, p.1353-1355, 2010.

RUIZ-SANCHEZ, E.; ORCHARD, I.; LANGE, A.B. Effects of the cyclopeptide mycotoxin destruxin A on the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus* (Stål). **Toxicon** v. 55, p. 1162-1170, 2010.

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

SANTI, L.; BEYS DA SILVA, W.O.; BERGER, M.; GUIMARÃES, J.A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**, v. 55, p. 874-880, 2010.

SASAN, R.K.; BIDOCHKA, M. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. **American Journal of Botany**, v. 99, p. 101-107, 2012.

SILVA, S.B.; SAVASTANO, G.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Tipos celulares envolvidos na resposta imune de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* inoculadas com *Metarhizium anisopliae* e *Penicillium* sp. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n.3, p.129-131, 2006.

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

SLIEMAN, T.A.; NICHOLSON, W.L. Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane pyrimidine dimers in *Bacillus subtilis* spore DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 107, p. 1476-1484, 2000.

SONENSHINE, D.E. **Biology of ticks**. Old Dominion University, Norfolk, Virginia. Oxford University Press, 1991. 447 p. v. 1. ISBN 0-19-505910.

SONENSHINE, D.E.; HYNES, W.L.; CERAUL, S.M.; MITCHELL, R.; BENZINE, T. Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor variabilis* contribute to bacterial control. **Experimental & Applied Acarology**, v. 36, n. 3, p. 207-223, 2005.

SONENSHINE, D.E.; HYNES, W.L. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 18, p. 7046-7063, 2008.

TAYLOR, D. Innate immunity in ticks: A review. **Journal of the Acarological Society of Japan**, v. 15, n. 2, p. 109-127, 2006.

VALENZUELA, J.G.; FRANCISCHETTI, I.M.; PHAM, V.M.; GARFIELD, M.K.; MATER, T.N.; RIBEIRO, J.M. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. 18, p. 2843-2864, 2002.

VASTA, G.R.; MARCHALONIS, J.J. Humoral recognition factors in the arthropoda. The specificity of chelicerate serum lectins. **Integrative and Comparative Biology**, v. 23, n. 1, p. 157-171, 1983.

VEGA, F.E.; POSADA, F.; AIME, M.C.; PAVA-RIPOLL, M.; INFANTE, F.; REHNER, S.A. Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control**, v. 44, p. 72-82, 2008.

VILCINSKAS, A.; MATHA, V.; GOTZ, P. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. **Journal of Insect Physiology**, v. 43, p. 475-483, 1997

WANG, B.; KANG, Q.; LU, Y.; BAI, L.; WANG, C. Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 1287-1292, 2012.

WOHLKÖNIG, A.; HUET, J.; LOOZE, Y.; WINTJENS, R. Structural relationships in the lysozyme superfamily: significant evidence for glycoside hydrolase signature motifs. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e15388, 2010.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 9, n. 5-6, p. 553-596, 2007a.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 879-920, 2007b.

ZHOU, J.; UEDA, M.; UMEMIYA, R.; BATTSETSEG, B.; BOLDBAATAR, D.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 7, p. 527-535, 2006.

CAPITULO I

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Metarhizium* spp. EM
RELAÇÃO À TOLERÂNCIA À RADIAÇÃO UV-B, PRODUÇÃO *in*
vitro DE DESTRUXINAS E VIRULÊNCIA PARA *Galleria mellonella*,
Tenebrio molitor E *Rhipicephalus microplus***

RESUMO

A ação promissora dos fungos artropodopatogênicos depende não somente da virulência do isolado fúngico mas também da susceptibilidade do hospedeiro e de sua tolerância a condições ambientais adversas, como baixa umidade, altas temperaturas e intensa radiação ultravioleta (UV). Dentro desse âmbito, o presente capítulo objetivou caracterizar a tolerância de diversos isolados de *Metarhizium* à radiação UV-B que respondessem de maneira ótima à adição de óleo mineral na suspensão fúngica. O capítulo objetivou também avaliar os níveis de produção *in vitro* de destruxina A, B, e E em isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. além de realizar um estudo *in vivo* com lagartas de *Galleria mellonella* vivas e infectadas com diferentes espécies de *Metarhizium*. Os mesmo isolados de *Metarhizium* foram testados em larvas de *Rhipicephalus microplus*, *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor* com o objetivo de identificar os isolados mais virulentos para utilização em futuros programas de controle microbiano. Houve grande variação na tolerância à radiação UV-B nas suspensões fúngicas testadas, com germinação relativa variando entre 5,2% (ARSEF 3479) e 88,2% (ARSEF 759). A germinação relativa dos conídios formulados em óleo foi comparada com a germinação relativa dos conídios suspensos em água. A adição de óleo mineral claramente protegeu o fungo do efeito negativo causado pela exposição à radiação UV-B (i.e., atraso ou ausência de germinação). A seleção de isolados mais tolerantes à radiação UV-B em conjunto com a análise do efeito da adição de um adjuvante protetor é um passo fundamental para a melhora na performance de isolados de *Metarhizium* a campo. Uma grande variação (de 0.31 mg de destruxina A/g de peso seco de micélio do isolado ARSEF 1885 a 32 mg de destruxina E/g de micélio seco do isolado ARSEF 3643) foi observada após 5 dias de crescimento entre os isolados produtores de destruxinas. Além do isolado de *M. acridum* ARSEF 324 não produziram destruxinas *in vitro*. A detecção primária de destruxinas foi observada no terceiro dia após o início da incubação (com exceção do isolado ARSEF 759, onde a detecção ocorreu no segundo dia de incubação). Não foi possível detectar a produção de destruxinas *in vivo*. Também houve grande variação na virulência dos diferentes isolados testados, bem como na susceptibilidade dos hospedeiros, mas de maneira geral lagartas de *G. mellonella* foram mais susceptíveis que as larvas de *Tenebrio* e estas por sua vez, mais susceptíveis que as larvas de *R. microplus*. Em geral, a mortalidade das diferentes larvas ocorreu de forma diretamente proporcional à concentração de conídios testada. Os isolados *M. anisopliae* s.l. ARSEF 782, *M. robertsii* ARSEF 2575, *M. anisopliae* s.l. ARSEF 3641 e ARSEF 3643 apresentaram alta virulência para as três espécies de artrópode. Os isolados de *M. anisopliae* s.l. ARSEF 729 e ARSEF 3819 apresentaram resultados mais promissores em larvas de *R. microplus* quando sua virulência foi comparada com os resultados contra as larvas de inseto. Dentre os fungos estudados, ARSEF 782, ARSEF 2575 e ARSEF 3643 destacaram-se por apresentar resultados positivos nas diferentes características estudadas, isto é, alta tolerância à radiação UV-B, altos níveis de virulência e produção *in vitro* de destruxinas.

Palavras chave: formulação fúngica, radiação UV-B, metabólitos secundários.

ABSTRACT

The promising action of arthropodopathogenic fungi depends not only on the virulence of the fungal isolate but also on host susceptibility and tolerance to adverse environmental conditions such as low humidity, high temperatures and intense ultraviolet radiation (UV). Accordingly, this chapter aimed to characterize the UV-B tolerance of several Brazilian *Metarhizium* spp. isolates and also their optimal response to the addition of mineral oil in the fungal suspension. In addition, the chapter evaluated the levels of *in vitro* production of destruxin A, B, and E by these Brazilian *Metarhizium* spp. isolates and an *in vivo* study with *Galleria mellonella* larvae was performed after infection with two different *Metarhizium* species. The same *Metarhizium* spp. isolates were tested against larvae of *Rhipicephalus microplus*, *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor* aiming to identify virulent isolates for future use in microbial control programs. There was a wide variation in the UV-B tolerance of fungi tested. Conidia had relative germination ranging from 5.2% (ARSEF 3479) and 88.2% (ARSEF 759). Relative spore germination formulated oil was compared with the relative germination of spores suspended in water. The addition of mineral oil in the fungal suspensions clearly protected conidia from the negative effect caused by UV-B radiation exposure (i.e., delayed or no germination). Characterization of isolates more UV-B tolerant in addition to the analysis of the addition of an adjuvant represents a key study for the improvement of *Metarhizium* use in the field. Destruxins A, B and E could be detected in the culture of 12 isolates (ranging from 0.31 mg destruxin A/ g dry weight of mycelium for isolate ARSEF 1885 and 32 mg destruxin E/ g dry mycelium for isolate ARSEF 3643) after 5 days of growth. Besides *M. acridum* ARSEF 324, other seven isolates did not produce destruxins *in vitro*. The primary detection of destruxins was observed on the third day after the start of incubation (with the exception of isolate ARSEF 759, where the detection occurred on the second day of incubation). There was no detection of destruxins in insect larvae. There was also great variation in the virulence of the different isolates that were tested, as well as the susceptibility levels depending on the host, but in general *G. mellonella* larvae were more susceptible than *T. molitor* and these more likely than *R. microplus* larvae. Generally, larval mortality occurred in direct proportion to the conidial concentration. *M. anisopliae* s.l. ARSEF 782, *M. robertsii* ARSEF 2575, *M. anisopliae* s.l. ARSEF 3641 and ARSEF 3643 showed high virulence for the three species of arthropods. *M. anisopliae* s.l. ARSEF 729 and ARSEF 3819 showed more promising results against *R. microplus* larvae when their virulence was compared with insect larvae results. Among the isolates that were studied, ARSEF 782, ARSEF 2575 and ARSEF 3643 stood out for presenting positive results in the different studied traits, namely their high tolerance to UV-B radiation, high *in vitro* destruxins production and elevated levels of virulence.

Key words: fungal formulation, UV-B irradiation, secondary metabolites

1 INTRODUÇÃO

A utilização de fungos artropodopatogênicos para o controle de insetos vem sendo utilizada e estudada, com diferentes enfoques, por mais de 100 anos (ROBERTS; ST LEGER, 2004). *Metarhizium* spp., juntamente com *Beauveria* spp. estão entre as espécies fúngicas mais frequentemente usadas no controle biológico de insetos praga. Além disso, *Metarhizium* spp. se tornou um modelo para estudos moleculares que enfocam a interação inseto-patógeno (ROBERTS; ST LEGER, 2004; FERNANDES et al., 2010; GAO et al., 2011).

Pode-se dizer que o controle biológico de artrópodes praga, especialmente de insetos, tem suas raízes nos primeiros registros de doenças que afetavam insetos. De acordo com Steinhaus (1975), os registros de doenças em abelhas data de vários séculos antes de Cristo (aproximadamente 700 a.C.). Problemas com a morte de bichos-da-seda nas sericulturas também foram motivo de grande estudo na Europa de séculos passados. Primeiramente os homens objetivavam combater as “muscardines” (verde e branca, em menção às cores dos fungos que produziam a doença: hoje conhecidos como *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp.). Contudo, foi a partir desse conhecimento de que microorganismos eram capazes de acometer e matar insetos, que o homem passou a utilizar esses causadores de doenças em insetos para controlar pragas que assolavam suas culturas alimentícias, e assim nasce o controle biológico com a utilização de fungos entomopatogênicos (STEINHAUS, 1975).

Atualmente, surgem cada vez mais produtos formulados a base de fungos para controlar artrópodes pragas ao redor do mundo. Segundo Faria e Wraight (2007), dentre 171 pesticidas destinados ao controle de ácaros e insetos, 33,9% são à base de *Metarhizium anisopliae* s.l. O uso deste artropodopatógeno é considerado seguro, apresentando riscos mínimos para vertebrados, humanos e ao meio ambiente (ZIMMERMANN, 2007).

No Brasil o primeiro relato de ocorrência natural de *M. anisopliae* s.l. infectando fêmeas do carrapato *Rhipicephalus microplus* foi realizado por Costa e colaboradores (2002). Testes *in vitro* e de estábulo demonstraram que diversos isolados de *M. anisopliae* s.l. possuem alta virulência contra carrapatos, incluindo *R. microplus* (BITTENCOURT et al., 1994; REIS et al., 2001; BAHIENSE et al., 2007; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; QUINELATO et al., 2012); entretanto, no Brasil ainda não existem produtos a base de fungos artropodopatogênicos para controle específico de carrapatos.

A virulência das diferentes espécies de artropodopatógenos para carrapatos varia não somente entre as espécies fúngicas mas também entre os isolados de uma mesma espécie (FERNANDES et al., 2011; QUINELATO et al., 2012). Dessa maneira, determinar a virulência dos isolados artropodopatogênicos selecionando fungos com maior virulência para *R. microplus* ou qualquer outra espécie de artrópode representa um passo fundamental para avanços no controle biológico.

A radiação ultravioleta (UV) é uma radiação eletromagnética com um comprimento de onda menor que o da luz visível. A maior parte da radiação UV emitida pelo sol é absorvida pela atmosfera terrestre e quase a totalidade (cerca de 99%) dos raios UV que efetivamente chegam a superfície da Terra são do tipo UV-A. A radiação UV-B (280 nm a 320 nm) (INGLIS et al., 1995) é parcialmente absorvida pelo ozônio da

atmosfera e sua parcela que chega à Terra é prejudicial a todos os micro-organismos (TEVINI, 1993) inclusive os fungos. A energia de um fóton de radiação está inversamente relacionada com o seu comprimento de onda, e por conseguinte, a radiação UV-C é a mais enérgica das três bandas de frequências. A radiação UV-C é fortemente absorvida pelo oxigênio e ozônio presente na atmosfera, e por isso não penetra através da atmosfera (ROBERTS; FLINT, 2002). As porções UV-B e UV-A penetram na biosfera, embora uma enorme parcela da radiação UV-B seja absorvida pelo ozônio da atmosfera.

A luz solar apresenta variações nos graus de intensidade luminosa e conteúdo espectral; esses parâmetros apresentam variações de acordo com a estação do ano, hora do dia, altitude, localização, e condições atmosféricas (ROBERTS; FLINT, 2002). Os efeitos negativos da radiação solar na germinação e crescimento fúngico (reflexo da indução à formação de dímeros de pirimidina que podem levar a mutações ou falhas no processo de transcrição), principalmente os efeitos negativos da radiação UV-B, tem sido reportados para diversas espécies de fungos artropodopatogênicos (i.e., *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp. e *Paecilomyces* spp.) (FARGUES et al., 1996; BRAGA et al., 2001a,b; FERNANDES et al., 2007). Esses trabalhos reportam que os danos causados pelos componentes da radiação UV que atravessam a atmosfera podem ser letais para esses organismos.

Algumas substâncias são utilizadas com o intuito de proteger e aumentar a eficácia de propágulos de fungos entomopatogênicos, como óleos minerais e vegetais (MOORE et al., 1993; INGLIS et al., 1995; ANGELO et al., 2010; CAMARGO et al., 2012). Isso vem sendo cada vez mais explorado uma vez que fatores abióticos como a baixa umidade, as altas temperaturas e principalmente a radiação ultravioleta representam condições limitantes para uso desses agentes a campo.

A maioria dos produtos a base de fungos artropodopatogênicos disponíveis no mercado tem como propágulos os conídios (FARIA; WRAIGHT, 2007). O conídio é uma estrutura de propagação e dispersão facilitada, em comparação com as hifas, possui uma limitação na adaptação a respostas a efeitos abióticos (ST LEGER et al., 1989; D'ENFERT, 1997). A pré-existência de mRNA e proteínas em conídios é provavelmente necessária para que o conídio seja tolerante a estresses ambientais (BARROS et al. 2010; TEUTSCHBEIN et al., 2010).

É esperado que diferentes isolados fúngicos não respondam igualmente à adição de óleo mineral na formulação, podendo apresentar diferentes graus de tolerância à radiação UV-B. Dessa maneira, a identificação de isolados naturalmente tolerantes à radiação UV-B e que adicionalmente possuam boa resposta a adição de óleo é fundamental para subsidiar a adição desse composto como adjuvante em formulações fúngicas

Nos estudos desenvolvidos por Kodaira em 1961 e 1962, o autor descreveu a produção de toxina pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium*. As destruxinas foram então descritas e caracterizadas como compostos inseticidas por este autor, e até hoje tem seu potencial estudado por diversos pesquisadores. Destruxinas são hexadepsipeptídeos compostos por cinco resíduos de aminoácidos e um α -hidroxi ácido produzidos por várias espécies fúngicas (LIU; TZENG, 2011); estes compostos estão entre os mais estudados metabólitos secundários produzidos por fungos. O nome destruxina é derivado de “destructor”, da espécie *Oospora destructor*, o fungo entomopatogênico de onde esses metabólitos foram primeiramente isolados. Mais tarde *O. destructor* foi renomeado *M.*

anisopliae, mas o nome destruxina permaneceu. Uma recente revisão (LIU; TZENG, 2011) reportou 39 análogos que se diferenciam pelo grupamento R do resíduo hidroxil ácido e, apesar da aparente sobreposição, possuem diferentes efeitos biológicos (PAL et al., 2007).

Os efeitos das destruxinas em insetos incluem: paralisia tetânica (SAMUELS et al., 1988a,b), inibição da síntese de DNA e RNA em linhagens de células *in vitro* (QUIOT et al., 1985), inibição da secreção fluídica dos túbulos de Malpighi (JAMES et al., 1993), bloqueio da atividade da ATPase (MUROI et al., 1994) e supressão da resposta de defesa em insetos (HUXHAM et al., 1989; CERENIUS et al., 1990; VILCINSKAS et al., 1997; VEY et al., 2002; HAN et al., 2013). Essas características sugerem claramente um potencial inseticida desses compostos. Contudo, Donzelli e colaboradores (2012) mostraram que um mutante de *M. robertsii* com sintetases de destruxinas anuladas foi tão virulento quanto o tipo selvagem, em ensaios onde conídios foram aplicados topicamente em larvas de insetos. De fato Kershaw e colaboradores (1999) reportaram previamente que isolados de *Metarhizium* spp. poderiam ser patogênicos para insetos tendo ou não a capacidade de produzir destruxinas *in vitro*; e sugeriram diferentes estratégias de virulência para *Metarhizium* spp.: a “estratégia de toxina” e a “estratégia de crescimento”. Apesar desses estudos indicarem pouca participação das destruxinas na patogenicidade fúngica, esses compostos puderam ser detectados em invertebrados ainda vivos, infectados por fungos artropodopatogênicos (SUZUKI et al., 1971, SAMUELS et al., 1988a), o que indica que as destruxinas, sob certas condições, podem participar no processo patogênico dos fungos em insetos. Vários fatores (i.e., susceptibilidade do hospedeiro, capacidade de detoxificação, estratégia de virulência fúngica, a participação de outras toxinas e enzimas, entre outros fatores) devem ser considerados ao se definir o papel das destruxinas no modo de ação de *Metarhizium* spp. quando infecta o artrópode.

As destruxinas podem ser produzidas através de fontes naturais ou quimicamente. Bayley e colaboradores (1996) sugeriram o envolvimento de péptido-sintetases multifuncionais não ribossomais na biossíntese destes metabólitos secundários; o que foi confirmado recentemente por Wang e colaboradores (2012). Estes autores reportaram que um grupamento de genes é responsável pela codificação de enzimas (*dtxS1*, *dtxS2*, *dtxS3* e *dtxS4*) capazes de sintetizar a micotoxina e seus análogos. Wang e colaboradores (2012) interromperam genes-alvo de *M. anisopliae* (isolado re-classificado como *M. robertsii*) objetivando esclarecer o processo de biossíntese, sugerindo que a aquisição desse grupamento de genes responsáveis pela produção de destruxina em linhagens de *Metarhizium* é coordenada pela evolução da especificidade fúngica ao hospedeiro.

O presente capítulo estudou diferentes isolados fúngicos de *Metarhizium* spp. com o objetivo de caracterizar a tolerância à radiação UV-B desses isolados e os níveis de produção *in vitro* (culturas submersas sob agitação) das destruxinas A, B, e E. Além disso análises para detecção *in vivo* de destruxinas também foram realizadas com lagartas de *Galleria mellonella* infectadas com *M. robertsii* (ARSEF 2575) ou com *M. acridum* (ARSEF 324). O capítulo também aborda a virulência desses mesmos isolados para lagartas de *Galleria mellonella* (traça da cera), larvas de *Tenebrio molitor* (bicho-da-farinha) e larvas de *R. microplus* buscando comparar a virulência desses isolados para os diferentes artrópodes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e período de execução dos experimentos

Os experimentos com radiação UV-B e com a produção de destruxinas foram realizados na Utah State University, Departamento de Biologia, Logan, UT, EUA, no laboratório do Dr. Donald W. Roberts. O período de realização dos experimentos se deu entre os meses de Agosto de 2012 a Abril de 2013.

Os experimentos com insetos também foram realizados na Utah State University entre os meses de Janeiro de 2013 a Maio de 2013. Os experimentos com larvas de *R. microplus* foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médico Veterinária, no Instituto de Veterinária (IV) da UFRRJ, entre o período de Novembro de 2013 a Março de 2014.

2.2 Isolados fúngicos

Vinte e dois isolados fúngicos do complexo *Metarhizium anisopliae* foram utilizados no presente capítulo (Tabela 1); 21 foram obtidos da Agriculture Research Service Collection of Entomopathogenic Fungi (ARSEF), Laboratório de Plantas, Solo, e Nutrição (Ithaca, NY, EUA) e o isolado ESALQ 959 foi cedido pelo Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP.

Tabela 1. Isolados de *Metarhizium* spp., origem, substrato e identificações de acordo com Bischoff e colaboradores (2009).

Isolado	Hospedeiro/ Substrato	Origem	Espécie
ARSEF 324	<i>Austracris guttulosa</i> (Orthoptera: Acrididae)	QLD, Australia	<i>Metarhizium acridum</i>
ARSEF 552	Lepidoptera	MG, Brasil	<i>Metarhizium pingshaense</i>
ARSEF 724	<i>Cerotoma arcuata</i> (Coleoptera: Chrysomelidae)	GO, Brasil	<i>Metarhizium robertsii</i>
ARSEF 729	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera: Cercopidae)	GO, Brasil	<i>Metarhizium anisopliae</i> <i>sensu lato</i> (s.l.)
ARSEF 759	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera: Cercopidae)	GO, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l.
ARSEF 760	<i>Cerotoma arcuata</i> (Coleoptera: Chrysomelidae)	GO, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l.
ARSEF 782	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera: Cercopidae)	GO, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l.
ARSEF 929	<i>Chalcodermus aeneus</i> (Coleoptera: Curculionidae)	GO, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l.
ARSEF 1095	<i>Carpocapsa pomonella</i> [Lepidoptera: Olethreutidae]	Austria	<i>Metarhizium brunneum</i>
ARSEF 1448	<i>Scaptomyza castanea</i> (Hemiptera: Cydnidae)	GO, Brasil	<i>Metarhizium pingshaense</i>
ARSEF 1449	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera: Cercopidae)	PA, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l.
ARSEF 1882	<i>Tibraca limbativentris</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	GO, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l.
ARSEF 1883	<i>Tibraca limbativentris</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	GO, Brasil	<i>Metarhizium anisopliae</i> <i>sensu stricto</i>
ARSEF 1885	<i>Diabrotica</i> sp. (Coleoptera: Chrysomelidae)	GO, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l.
ARSEF 2211	Solo	SP, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l.
ARSEF 2521	<i>Deois</i> sp. (Homoptera: Cercopidae)	PR, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l.
ARSEF 2575	<i>Curculio caryae</i> (Coleoptera: Curculionidae)	SC, EUA	<i>Metarhizium robertsii</i>
ARSEF 3479	(Coleoptera: Scarabaeidae)	DF, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l.
ARSEF 3641	Solo	GO, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l.
ARSEF 3643	Solo	GO, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l.
ARSEF 3918	Solo	PR, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l.
ESALQ 959	<i>Rhipicephalus microplus</i>	RJ, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l.

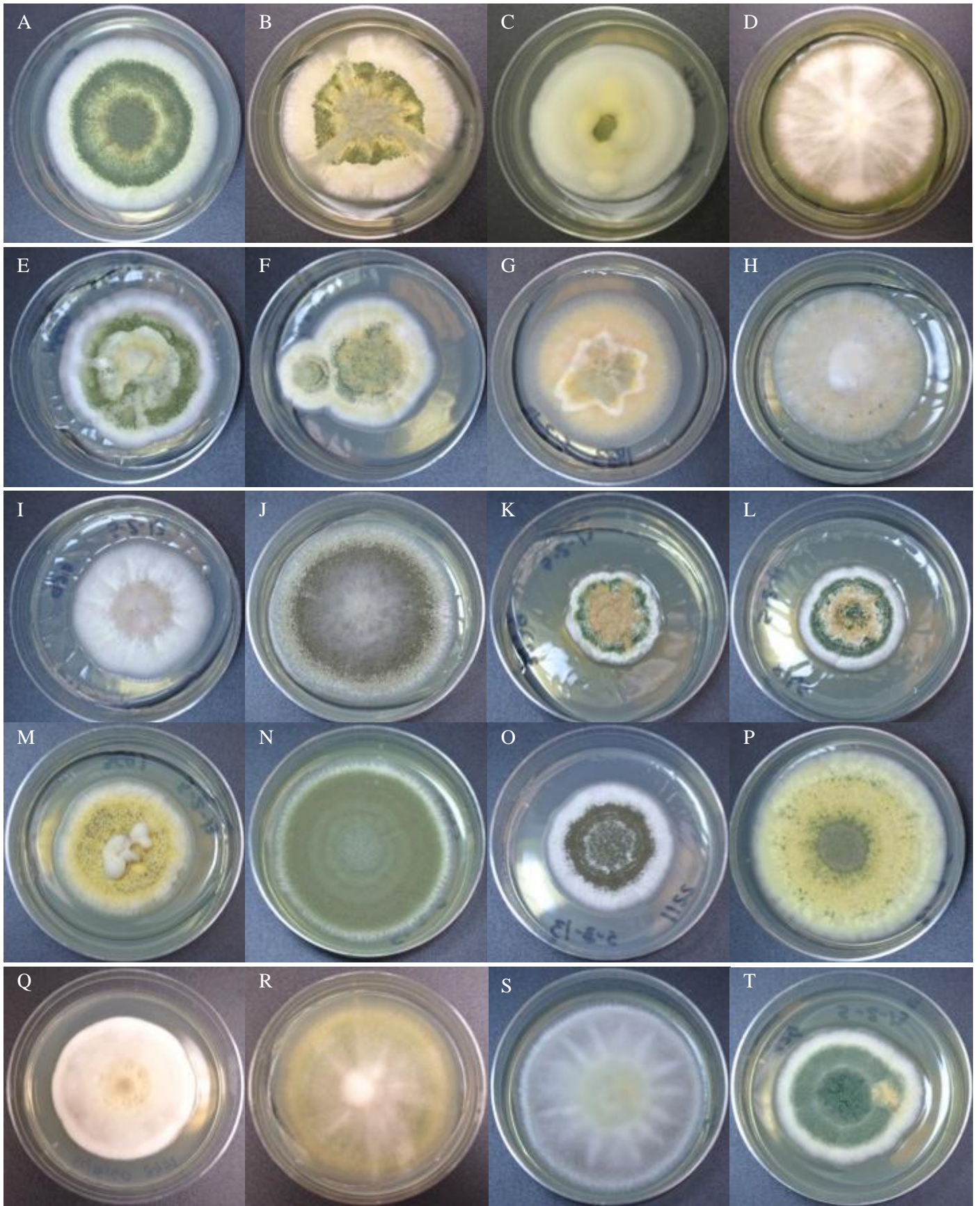


Figura 1: Isolados fúngicos cultivados em meio batata dextrose agar e extrato de levedura a 0,01%, após 10 dias de cultivo a 28°C em escotofase (contínua).

Figura 1 (continuação): A: *Metarhizium pingshaense* ARSEF 552; B: *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 729; C: *M. anisopliae* s.l. ARSEF 759; D: *M. anisopliae* s.l. ARSEF 782; E: *M. anisopliae* s.l. ARSEF 1449; F: ARSEF 1882; G: *M. anisopliae* senso strictu ARSEF 1883; H: *M. anisopliae* s.l. ARSEF 760; I: *M. anisopliae* s.l. ARSEF 929 J: *Metarhizium robertsii* ARSEF 724; K: *M. anisopliae* s.l. ARSEF 3479; L: *M. anisopliae* s.l. ARSEF 3918; M: *M. anisopliae* s.l. ARSEF 3641; N: *M. anisopliae* s.l. ARSEF 3643; O: *M. anisopliae* s.l. ARSEF 2211; P: *M. anisopliae* s.l. ARSEF 2521; Q: *M. pingshaense* ARSEF 1448; R: *M. anisopliae* s.l. ARSEF 1885; S: *M. robertsii* ARSEF 2575; T: *Metarhizium acridum* ARSEF 324.

2.3 Preparo das suspensões e formulações fúngicas para o teste de tolerância à radiação UV-B

Os isolados (Tabela 1, Figura 1), exceto os isolados ARSEF 1095 e ESALQ 959, foram cultivados em meio batata dextrose ágar (Difco Laboratories, Detroit, MI) suplementado com 0.1g L⁻¹ de extrato de levedura (BDAL) (0,01% [p/v]) em placas de Petri (polipropileno, 90 × 15 mm, Fisherbrand) no escuro a 28 ± 1°C e por 14 dias. Os conídios foram raspados das placas de cultura e suspensos em uma solução de água estéril e Tween 80 a 1%. As suspensões foram ajustadas para a concentração de 1 x 10⁵ conídios mL⁻¹. As suspensões foram filtradas com membrana porosa (poros de 8 µm, Nucleopore, Acton, MA, EUA) para impedir a agregação de conídios.

As formulações oleosas foram preparadas com as seguintes proporções: 89% de suspensão aquosa, 10% de óleo mineral (Sigma[®], #M8410, light oil, cell-culture grade) e 1% de monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80[®]). Uma alíquota de 20 µL de cada suspensão aquosa ou formulação oleosa foi inoculada em 4 mL de meio BDAL acrescido de 0,002% (p/v) de benomyl com 25% de ingrediente ativo (Hi-Yield Chemical Company, Bonham, TX) (BRAGA et al., 2001a,b) em placas de Petri (35 x 10 mm, Fisher[®]). A baixa concentração de Benomyl impede o crescimento exacerbado do tubo germinativo sem afetar negativamente o processo de germinação, possibilitando a contagem dos conídios germinados e não germinados.

2.4 Efeito da radiação UV-B sobre a germinação relativa de conídios suspensos em água ou formulados em óleo

Os experimentos foram conduzidos em câmara de crescimento Percival com temperatura controlada (Boone, Iowa). A radiação UV foi fornecida por duas lâmpadas fluorescentes TL 20W/12 RS (Filipinas, Eindhoven, Holanda). A temperatura interna da câmara foi mantida constante (27 ± 1°C). Foram avaliadas suspensões aquosas e formulações oleosas contendo 10% de óleo mineral.

Após a inoculação das suspensões e formulações nas placas de Petri, estas foram imediatamente expostas à radiação UV-B por 1 hora e 30 minutos (4.01 kJ m²). As placas foram cobertas com uma membrana de diacetato de celulose de 0,13 mm de espessura que bloqueou a radiação com comprimento de onda inferior a 290 nm. Isso permitiu a passagem da maior parte das radiações UV-A e UV-B, mas preveniu a exposição à UV-C (< 280 nm) e comprimentos curtos de UV-B. As distribuições espectrais dos filtrados das lâmpadas na câmara estão demonstrados em Braga e colaboradores (2001a). O espectro de ação de dano ao DNA (dimerização de pirimidinas) desenvolvido por Quate e colaboradores (1992) e normalizado para a unidade a 300 nm foi utilizado para calcular as irradiâncias UV (BRAGA et al., 2002). As placas do grupo controle foram cobertas

com folha de papel alumínio para bloquear qualquer radiação ultravioleta, e mantidas a $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

Após irradiação, as placas foram incubadas por 24 e 48 horas a 27°C em ausência de luz. A germinação relativa ($GR = (TC/CG) \times 100$, onde TC representa o número de conídios germinados em placa exposta à UV-B e CG representa a quantidade de conídios germinados em placa não exposta) (BRAGA et al., 2001a) dos conídios foi observada utilizando microscópio a $400\times$ após coloração com azul de metil. Todos os experimentos foram repetidos 3 vezes, utilizando-se novas placas de conídios a cada repetição.

2.5 Produção *in vitro* de destruxinas

Os isolados (Tabela 1), exceto os isolados ARSEF 1095 e ESALQ 959, foram cultivados em BDAL (0,01% [p/v]) em placas de Petri (polipropileno, 90×15 mm, Fisherbrand) no escuro a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa (UR) $\geq 80\%$ por 14 dias. Os conídios foram raspados das placas de cultura e suspensos em uma solução de água estéril e Tween 80 a 0.01%. Um mL de 1×10^6 conídios mL^{-1} foram adicionados a 99 mL de meio líquido Czapek-Dox (30 g L^{-1} de sacarose; 2 g L^{-1} de NaNO_3 ; 1 g L^{-1} de K_2HPO_4 ; 0.5 g L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot \text{WH}_2\text{O}$; 0.5 g L^{-1} de KCL e 0.01 g L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot \text{WH}_2\text{O}$) contendo 5 g L^{-1} de peptona. A viabilidade (germinação relativa) das suspensões fúngicas utilizadas foi verificada em meio BDAL após 18 h de crescimento.

Após incubação em meio líquido a 150 rpm por 1, 2, 3, 4 ou 5 dias, as culturas foram filtradas utilizando-se papel filtro Whatman[®] No. 1. O peso seco do micélio produzido por cada isolado fúngico foi obtido através de secagem em forno a 80°C por 48 h. A produção de destruxinas (A, B e E) foi quantificada no sobrenadante (1000 x g por 20 minutos) utilizando-se cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Primeiramente o filtrado foi submetido à pré-extração utilizando-se cartuchos de extração em fase sólida C-18 (SPE-C18) (100 mg; Agilent[®] Bond Elut #12102001). Os cartuchos foram condicionados com 3 mL de metanol (100%), seguido pelo mesmo volume de água ultra-pura. Cinco mL do sobrenadante foram utilizados em cada cartucho. Após carregados, os cartuchos foram lavados com 10 mL de água ultra-pura e eluídos com 5 mL de metanol (DONZELLI et al., 2012).

O material extraído foi diluído 50% em água ultra-pura e alíquotas de 10 μL foram injetadas em coluna C18 Betasil de fase reversa (100 mm x 2.1 mm, Thermo Fisher[®]) utilizando-se uma coluna de guarda de fase idêntica e eluição em gradiente de acetonitrila e água. Um sistema modular de HPLC (Shimadzu[®] Corp., Kyoto, Japão) foi utilizado. A eluição foi obtida com os seguintes passos do solvente A (acetonitrila) e B (água): 0 – 10 min (25% de A para 60% de A); 10 – 13 min (60% A); 13 – 15 min (60% de A para 25% de A) a um fluxo de 0.3 mL/min . A detecção foi feita a uma absorbância de 220 nm. Após a corrida estar completa a coluna foi re-equilibrada por 5 min. Os padrões de destruxinas A, B e E foram cedidos pelo Dr. Stuart B. Krasnoff (Biological Integrated Pest Management Research Unit, USDA-ARS, Ithaca, NY). Os níveis de destruxinas A, B, e E foram medidos baseados em curvas padrões estabelecidas para cada composto de acordo com Krasnoff e colaboradores (2006), e as soluções padrão (estoques) foram preparadas a 1 mg/mL de metanol.

Os padrões de calibração foram preparados por diluição de 20 μL de cada estoque padrão em 0,94 mL de metanol a 50%, seguidos por diluições seriadas para atingir as

concentrações de 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62 e 0.31 µg/mL. O limite de detecção (LOD) foi estimado em 0.10 µg/mL baseado na razão S/N de 3 para a detecção UV a 220 nm.

2.6 Detecção *in vivo* de destruxinas

Larvas de *Galleria mellonella*, obtidas da empresa Speedy Worm & Minnesota Muskie Farms Inc. (Alexandria, MN, EUA) foram usadas como hospedeiros para dois isolados fúngicos (*M. robertsii* ARSEF 2575 e *M. acridum* ARSEF 324). Grupos contendo 50 larvas cada foram pulverizados com suspensão fúngica de 1×10^6 conídios mL⁻¹. A viabilidade dos conídios utilizados nas suspensões foi verificada em meio artificial BDAL. A germinação relativa dos conídios foi observada após 18 horas de crescimento. Insetos que não foram expostos aos fungos (controle negativo) foram pulverizados com solução de água e Tween 80 0,01%. Para verificar a acurácia dos experimentos, padrões de destruxinas (A, B e E - 16µg de cada) foram pipetados sobre a cutícula das larvas não infectadas no momento da extração (controle positivo). Após 1, 2, 3, 4 ou 5 dias, larvas de cada tratamento (controle negativo, controle positivo, larvas tratadas com *M. robertsii* e larvas tratadas com *M. acridum*) foram congeladas com nitrogênio líquido, maceradas e submersas em 10 mL de metanol *overnight*. Insetos mortos foram removidos dos grupos infectados e somente insetos moribundos foram analisados. Cinco larvas de cada grupo infectado com fungo foram transferidas para placas contendo papel filtro umidificado para confirmar a infecção fúngica através da observação da exteriorização dos conídios.

Após serem submersas em metanol *overnight*, água ultra pura foi adicionada à suspensão contendo as larvas trituradas até um volume final de 15 mL. As suspensões foram filtradas (papel filtro Whatman® No. 1). O filtrado foi purificado usando-se cartuchos em fase solida SPE-C18 e submetido à espectrometria de massas (LC-MS).

O sistema de espectrometria de massas (LCQ Advantage Max mass spectrometer) (Thermo Electron® Corp., San Jose, CA, EUA) estava acoplado a um sistema de HPLC e consistia numa coluna C18 Betasil em fase reversa (100 x 2.1 mm, Thermo Fisher) e uma coluna de guarda de mesma fase, acoplada a um Surveyor MS Pump Plus, um injetor automático Surveyor Auto Sampler Plus e um detector de UV PDA em linha com o espectrômetro de massas e uma fonte de ionização *electrospray*. Cinco µL de cada amostra foram injetados no aparelho. O gradiente utilizado foi o mesmo usado para as análises de HPLC-UV (item 2.5). Íons pseudomoleculares das destruxinas A, B e E foram observados à *m/z* 578, 594 e 594, respectivamente, com os seguintes tempos e retenção: 7,05 min (destruxina A), 9,12 min (destruxina B) e 5,03 (destruxina E). A quantificação das destruxinas foi feita utilizando-se uma curva padrão construída para cada padrão de destruxina.

2.7 Avaliação *in vitro* da virulência de isolados de *Metarhizium* spp. sobre larvas de insetos

Os bioensaios foram feitos com *G. mellonella* e *T. molitor*. Conídios de cada isolado (Tabela 1), exceto dos isolados ARSEF 1095, e ESALQ 959, foram removidos das placas de Petri após 14 dias de cultivo em BDAL, mantidos a 27°C e 80% de umidade relativa (UR). Os conídios foram suspensos em solução de Tween 80 a 0,01% e as concentrações conidiais foram determinadas usando-se hemocitômetro e ajustadas para 1×10^7 e 1×10^5 conídios mL⁻¹. A viabilidade de cada suspensão conidial foi verificada

através do cultivo de 20 µL das suspensões em meio BDAL. A germinação foi observada após 18 horas de incubação a 28°C, avaliando-se um mínimo de 300 conídios.

Lagartas de *G. mellonella*, foram obtidas da empresa Speedy Worm & Minnesota Muskie Farms Inc. (Alexandria, MN, EUA) e larvas de *T. molitor*, foram obtidas da empresa Fluker Farms (Port Allen, LA, EUA). Grupos de 10 larvas de *Tenebrio* e 8 larvas de *Galleria* foram alocadas separadamente em placas de Petri contendo papel filtro (P4, média porosidade, taxa de fluxo fina, Fisherbrand®) e pulverizadas com suspensões fúngicas. Grupos controles foram pulverizados com soluções de Tween 80 a 0.01%. As placas foram incubadas a 28°C e a mortalidade das larvas foi verificada diariamente pelo período de 10 dias. Os bioensaios foram repetidos 3 vezes.

A média da mortalidade das larvas de cada grupo foi obtida. Comparações entre as diferentes mortalidades foram feitas utilizando-se o teste não-paramétrico Kruskal Wallis. O teste Student-Newman-Keuls foi usado para comparação entre as médias. As análises foram feitas no programa BioEstat, versão 4.0. *P* valores menores que 0,05 foram considerados significantes (SAMPALIO, 2010).

2.8 Avaliação *in vitro* da virulência de isolados de *Metarhizium* spp. sobre larvas do carrapato *Rhipicephalus microplus*

Para realização dos bioensaios, foram utilizadas fêmeas de *R. microplus* oriundas de infestações artificiais, feitas periodicamente, em bezerros mantidos em baias localizadas na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz, IV, UFRRJ. Vinte e um dias após a infestação, fêmeas ingurgitadas foram coletadas do piso das baias. No laboratório, sofreram assepsia da cutícula (imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% durante três minutos) e, posteriormente, foram secas em papel toalha estéril. Estas fêmeas foram mantidas em placas de Petri e acondicionadas em câmara climatizada com temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ para obtenção de ovos.

Ovos provenientes do primeiro ao décimo dia de postura foram pesados em alíquotas de 50 mg, acondicionados em tubos de ensaio vedados com algodão hidrófilo e mantidos em câmara climatizada, sob as mesmas condições descritas para as fêmeas, até a eclosão total das larvas. Os tubos que não apresentaram eclosão superior a 95% foram excluídos do experimento. Os tratamentos ocorreram no 15º dia após a eclosão total das larvas.

Conídios dos isolados (Tabela 1) (exceto do isolado ARSEF 1449) foram suspensos em 30 ml de água destilada estéril e Tween 80 a 0,01%. Em seguida, esta solução foi homogeneizada e quantificada em microscópio óptico com o auxílio da câmara de Neubauer. A suspensão foi ajustada à concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios mL⁻¹, segundo Alves (1998). As demais concentrações (10^7 , 10^6 e 10^5 conídios mL⁻¹) foram preparadas através de diluições seriadas a partir da concentração de 10^8 conídios mL⁻¹. A viabilidade das suspensões de 1×10^5 conídios mL⁻¹ foi verificada através do cultivo de 20 µL dessas suspensões em meio BDAL. A germinação foi observada após 18 horas de incubação a 28°C, avaliando-se um mínimo de 300 conídios.

Os tratamentos foram realizados através da imersão das larvas, aproximadamente 1000, de cada tubo de ensaio em 1 mL de suspensão de conídios, por um período de três minutos. Após esse tempo, os tubos foram invertidos para que o excesso de suspensão fosse absorvido pelo algodão que os vedava. A mesma metodologia foi utilizada para o grupo controle (tratados com suspensão de 0,01% de Tween 80). Os tubos foram

devidamente identificados e mantidos em câmaras climatizadas com temperatura de 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$.

A avaliação da ação dos diferentes isolados brasileiros de *M. anisopliae* sobre as larvas de *R. microplus* foi realizada através da observação ao microscópio estereoscópio da estimativa do percentual de mortalidade das larvas a cada cinco dias, até o 15º dia após tratamento. Após os bioensaios, foram coletadas amostras de larvas dos grupos tratados que foram incubadas em câmara úmida a 25 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$, para que ocorresse o crescimento fúngico e a confirmação de suas características macro e microscópicas (TULLOCH, 1976).

As médias dos percentuais de mortalidade dos quatro grupos tratamento e do grupo controle aos 5, 10 e 15 dias após tratamento foram submetidas a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido do teste SNK (Student-Newman-Keuls) utilizando o programa estatístico BioEstat, para comparação entre as médias e verificar entre quais tratamentos houve diferença significativa, com níveis de significância de 5% ($P < 0,05$) (SAMPAIO, 2010).

O cálculo das concentrações letais, CL50 e CL90 e seus respectivos intervalos de confiança, foram feitos pela análise de próbites (FINNEY, 1971), utilizando-se o software Probit no quinto dia após o tratamento.

2.9 Re-isolamento dos isolados fúngicos após os ensaios biológicos

Após os ensaios biológicos foram coletadas amostras de larvas de insetos e carrapatos, tanto do grupo controle quanto dos grupos tratados, com as suspensões de diferentes concentrações dos isolados de *M. anisopliae* s.l. Estas amostras foram incubadas em câmara úmida a 25 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$, para que ocorresse o crescimento fúngico e a confirmação de suas características macro e microscópicas.

3 RESULTADOS

3.1 Germinação relativa dos isolados após exposição à radiação UV-B quando formulados ou não em óleo mineral

Todas as suspensões e formulações apresentaram níveis de viabilidade (germinação) acima de 98. A figura 2A mostra conídios de *Metarhizium pingshaense* ARSEF 552 internalizados na micela de óleo. O óleo não foi retirado para a contagem dos conídios germinados. A figura 2B mostra conídios do isolado ARSEF 552 de *M. pingshaense*, formulados em água destilada estéril, 1% de Tween 80 e óleo mineral a 10%, 48 horas após exposição à radiação UV-B.; indicando que, mesmo com a presença de óleo, foi possível observar e quantificar a germinação dos conídios em meio de cultura.

As figuras 3 e 4 mostram os níveis médios de germinação relativa dos 20 isolados de *Metarhizium* que foram testados, 24 e 48 horas após 1,5 horas (4.01 kJ m^{-2}) de exposição à radiação UV-B. A porcentagem de conídios germinados na análise das suspensões fúngicas após exposição UV-B, em relação aos controles em escotofase, variou entre 5,3% (isolado ARSEF 3479) e 88,2% (isolado ARSEF 759). Quase que em sua totalidade, o uso do óleo protegeu os conídios dos efeitos da radiação UV-B, tendo sido observados maiores níveis de germinação em relação às suspensões aquosas. As

únicas exceções aconteceram com os isolados de *M. anisopliae* s.l. ARSEF 2211 e ARSEF 3479 com 24 h de incubação pós irradiação (Figura 3).

Vinte e quatro horas após a exposição à radiação UV-B, 3 isolados se destacaram com o melhor desempenho, quando suspensos em água: ARSEF 324, ARSEF 1449 e ARSEF 759. Quando formulados em 10% de óleo mineral, os melhores resultados foram obtidos com os isolados ARSEF 729, ARSEF 1449 e ARSEF 759. Dois isolados destacaram-se pela resposta ótima à adição de óleo mineral: o isolado ARSEF 552 de *M. pingshaense* e o isolado ARSEF 1885 de *M. anisopliae* s.l., que tiveram seus percentuais de germinação aumentados em mais de duas vezes, atingiram valores de germinação acima de 70% quando suspensos em solução oleosa.

Quarenta e oito horas após exposição, os isolados ARSEF 729, ARSEF 759 e ARSEF 324 apresentaram os maiores percentuais de germinação relativa, destacando-se o potencial de recuperação de *M. acridum* ARSEF 324, espécie conhecida por sua tolerância ao calor e à radiação solar. Os melhores resultados com conídios formulados em óleo mineral, 48 horas após a exposição, foram observados com os isolados: ARSEF 1449, ARSEF 759 e ARSEF 324 (Figura 4).

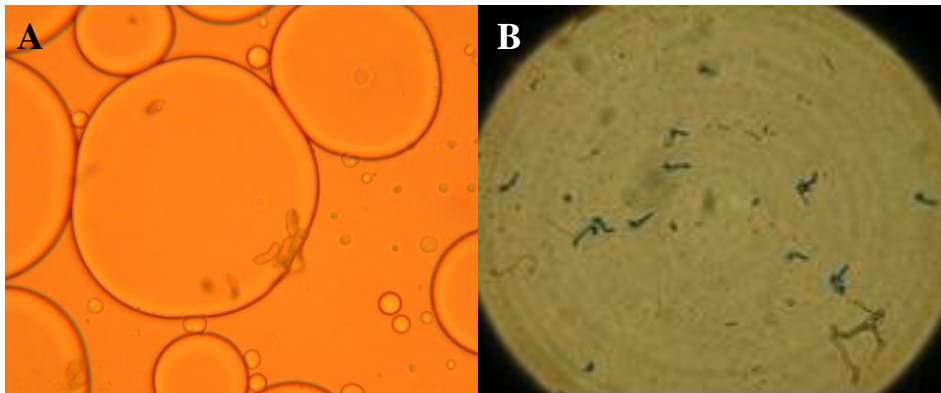


Figura 2. A: conídios de *Metarhizium pingshaense* ARSEF 552 no interior da gotícula de óleo. As gotículas foram observadas em microscópio estereoscópio em um aumento de 400×; B: Conídios germinados e não germinados do isolado de *M. pingshaense* ARSEF 552 48 horas após exposição à radiação UV-B. A placa foi incubada à 28 °C e corada com azul de metil.

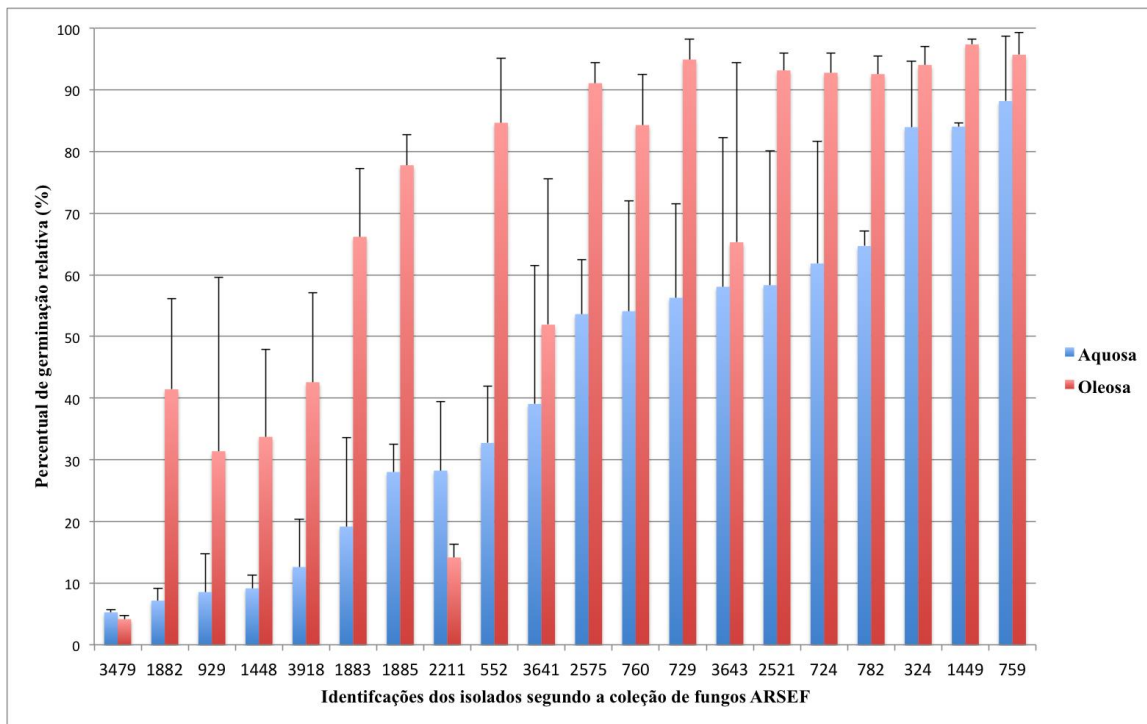


Figura 3: Comparação entre o percentual de germinação relativa de 20 isolados de *Metarhizium* spp. formulados em óleo (barras vermelhas) ou suspensos em solução aquosa (Tween 80, 0,01%) (barras azuis) 24 horas após exposição à radiação UV-B por 1,5 horas (4.01 kJ m^{-2}).

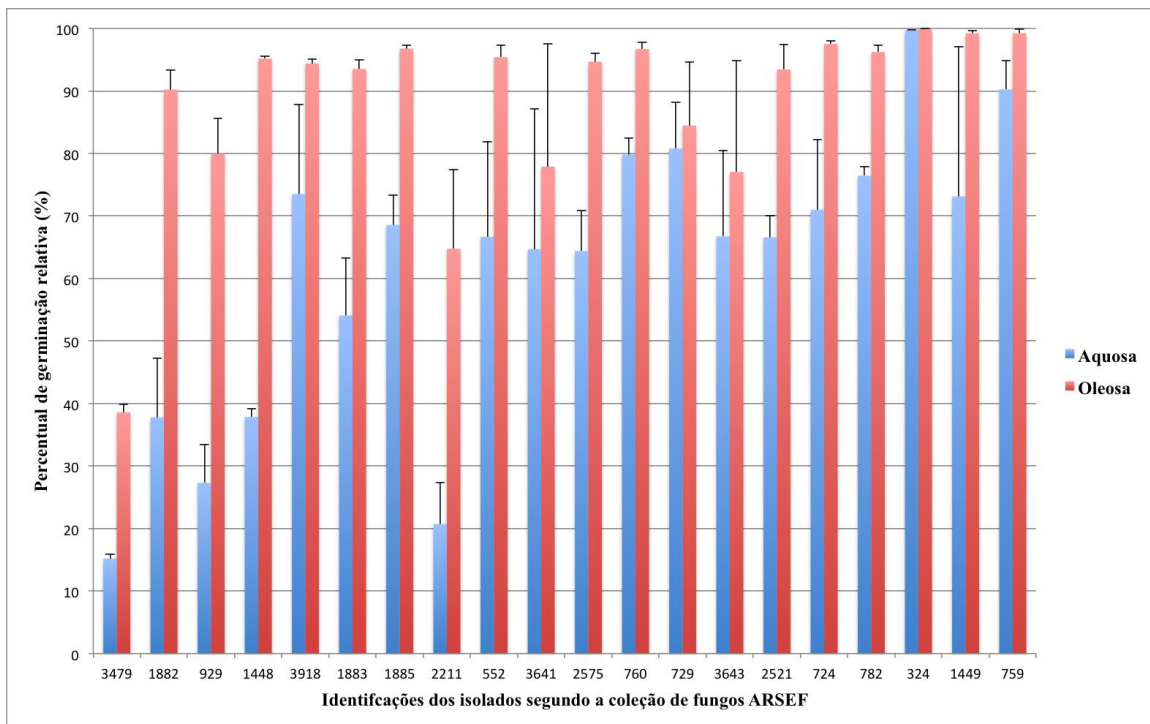


Figura 4: Comparação entre o percentual de germinação relativa de 20 isolados de *Metarhizium* spp. formulados em óleo (barras vermelhas) ou suspensos em solução aquosa (Tween 80, 0,01%) (barras azuis) 48 horas após exposição à radiação UV-B por 1,5 horas (4.01 kJ m^{-2}).

3.2 Produção *in vitro* de destruxinas

Dos 20 isolados de *Metarhizium* spp. que foram examinados no presente estudo, um já era conhecido por produzir destruxinas (*M. robertsii* ARSEF 2575) e outro pela não produção (*M. acridum* ARSEF 324) desses compostos. Além do isolado ARSEF 324, outros 7 isolados (ARSEF 724, 760, 1448, 1882, 1883, 3479 e 3918) não produziram destruxinas *in vitro*.

Uma grande variação (a partir de 0.31 mg de destruxina A/g de peso seco de micélio do isolado ARSEF 1885 à 32 mg de destruxina E/g de micélio seco do isolado ARSEF 3643) foi observada após 5 dias de crescimento entre as culturas submersas dos isolados produtores de destruxinas (ARSEF 552, 729, 759, 782, 929, 1449, 1885, 2211, 2521, 3641, e 3643) (Figura 5).

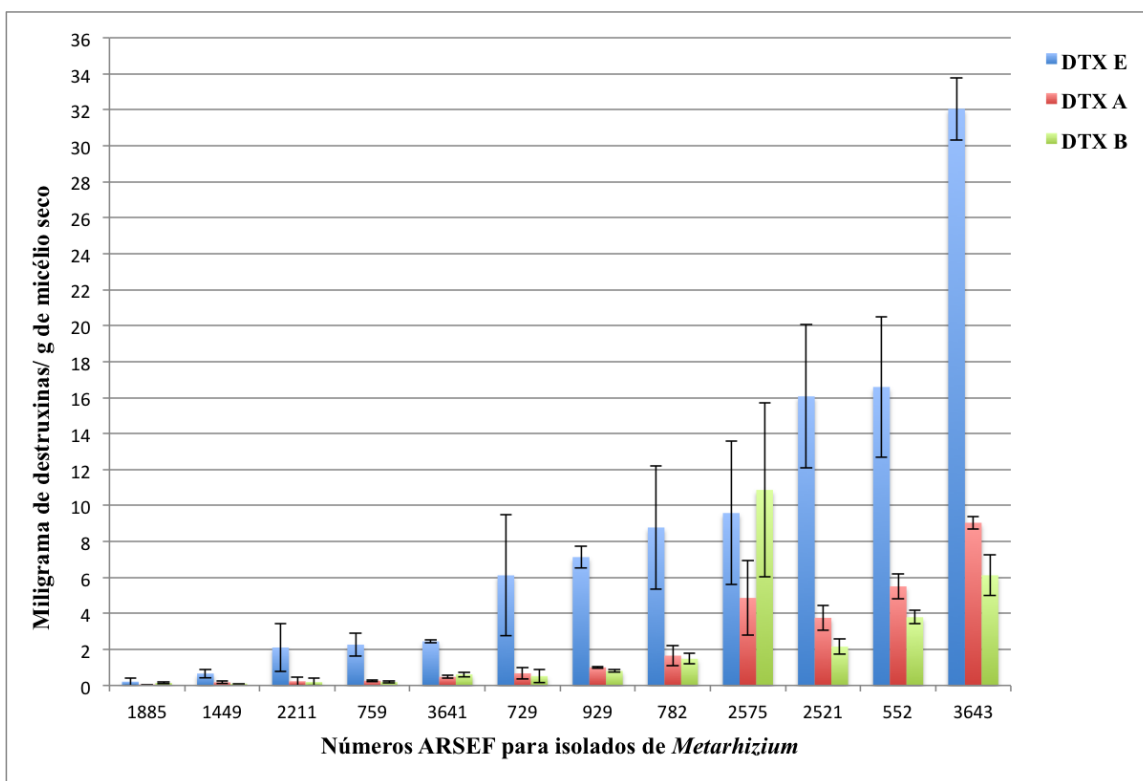


Figura 5. Produção *in vitro* de destruxinas por 12 isolados de *Metarhizium* spp. As barras representam as médias dos valores \pm os valores de erro padrão após 5 dias de crescimento em meio líquido (150 rpm). A produção de destruxinas A, B e E (DTX A, DTX B, e DTX E) foi determinada quantitativamente por HPLC-UV. Os ensaios foram repetidos 3 vezes.

O gráfico de produção do dia 1 até o dia 5 para o isolado ARSEF 2575 e para o isolado ARSEF 759 são apresentados nas figuras 6 e 7, respectivamente. A primeira detecção de destruxinas produzidas *in vitro* pela maioria dos isolados de *Metarhizium* spp. aqui analisados foi feita no terceiro dia de crescimento em meio líquido. A exceção foi observada no isolado ARSEF 759, que produziu níveis detectáveis de destruxina E no segundo dia de crescimento (0,55 mg de destruxina E/g de peso seco de micélio) (Figura 7). Em contraste, em 2 isolados (ARSEF 729 e ARSEF 1885), não foi possível detectar a produção de destruxinas até o quarto dia de crescimento (Figuras 8 e 9).

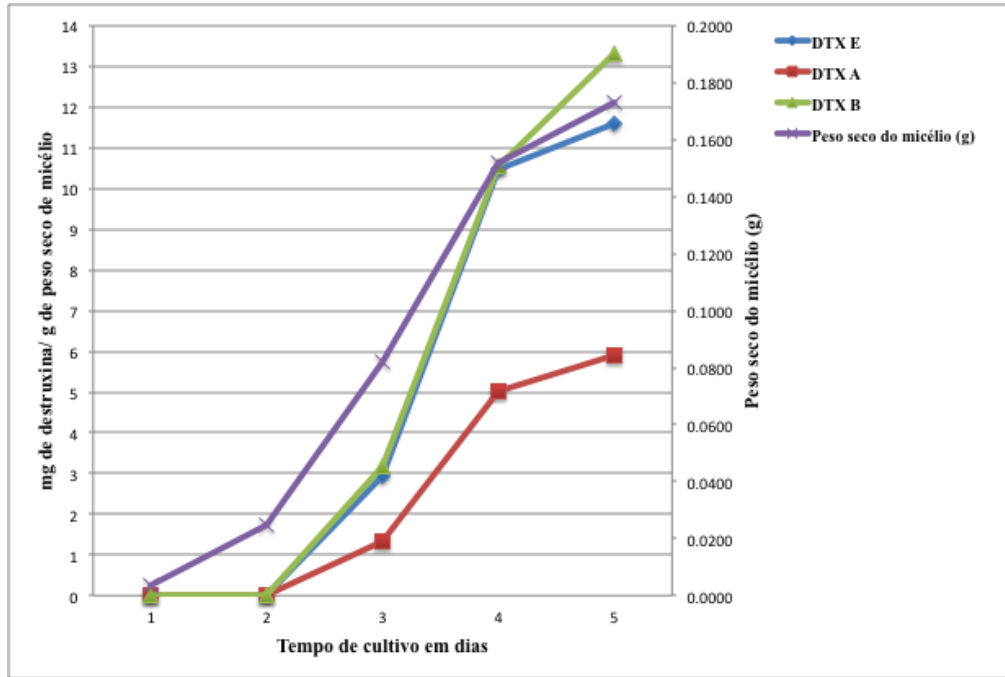


Figura 6. Produção *in vitro* de destruxinas (DTX) A, B e E pelo isolado de *Metarhizium robertsii* ARSEF 2575 do primeiro ao quinto dia de cultivo em Czapek-Dox. A produção de destruxinas foi determinada quantitativamente por HPLC-UV. Os valores são expressos em mg de destruxina por grama de micélio seco.

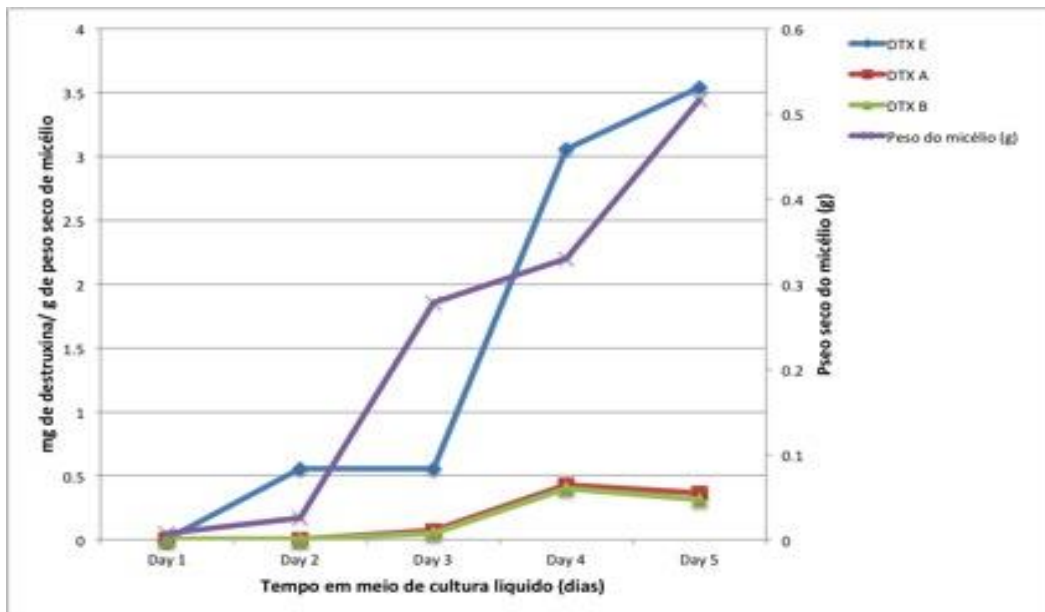


Figura 7. Produção *in vitro* de destruxinas (DTX) A, B, e E pelo isolado de *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 759 do primeiro ao quinto dia de cultivo em Czapek-Dox. A produção de destruxinas foi determinada quantitativamente por HPLC-UV. Os valores são expressos em mg de destruxina por grama de micélio seco.

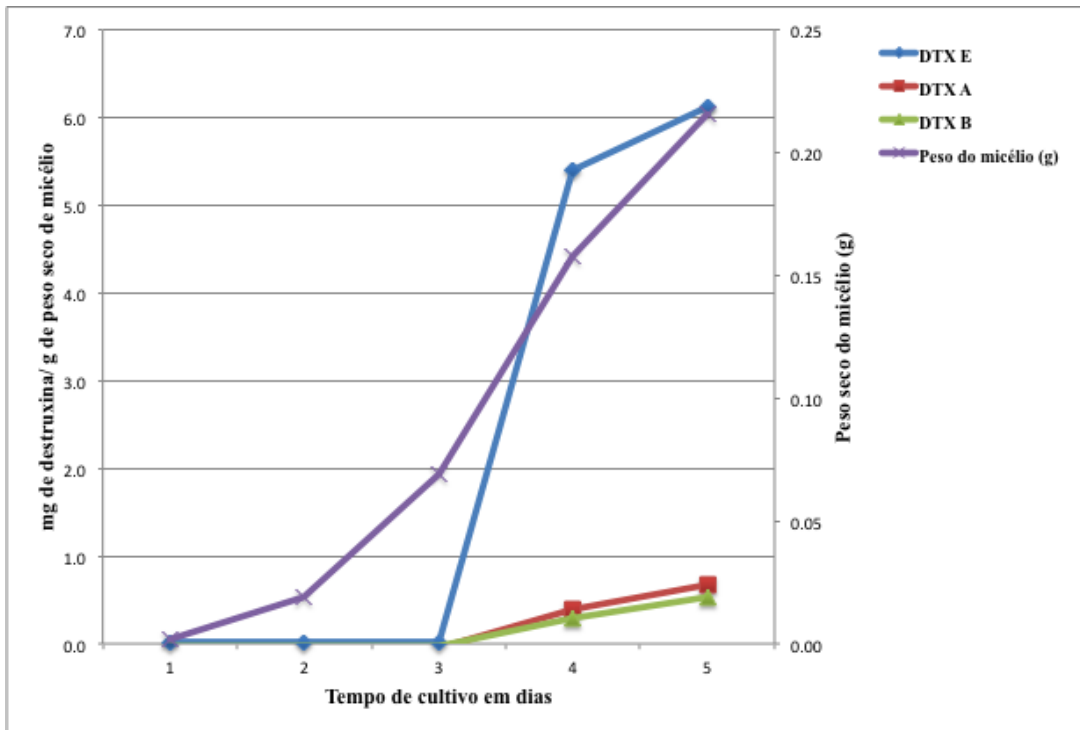


Figura 8. Produção *in vitro* de destruxinas (DTX) A, B, e E pelo isolado de *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 729 do primeiro ao quinto dia de cultivo Czapek-Dox. A produção de destruxinas foi determinada quantitativamente por HPLC-UV. Os valores são expressos em mg de destruxina por grama de micélio seco.

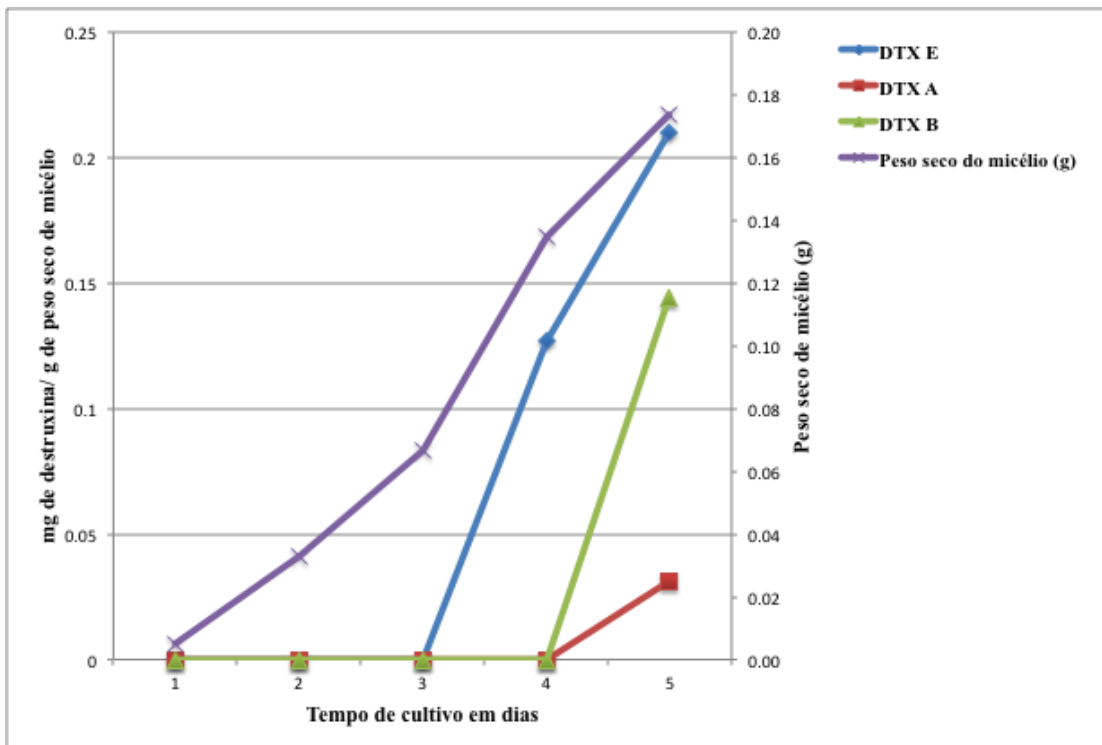


Figura 9. Produção *in vitro* de destruxinas (DTX) A, B, e E pelo isolado de *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 1885 do primeiro ao quinto dia de cultivo Czapek-Dox. A produção de destruxinas foi determinada quantitativamente por HPLC-UV. Os valores são expressos em mg de destruxina por grama de micélio seco.

3.3 Detecção *in vivo* de destruxinas

O percentual de germinação das suspensões fúngicas usadas para infectar as larvas de *G. mellonella* foi de 99% para *M. robertsii* ARSEF 2575 e 98% para *M. acridum* ARSEF 324. Insetos doentes (infectados com *M. robertsii* ou com *M. acridum*) foram analisados nos dias 1, 2, 3, 4, e 5 após o tratamento. Nenhum dos compostos (destruxinas A, B, e E) foi detectado em larvas doentes. A infecção fúngica foi confirmada 48h após o tratamento pelo aparecimento de pontos escuros (sinais de melanização) na cutícula das larvas, indicativo de penetração fúngica (Figura 10). Cinco larvas foram separadas dos grupos tratados para verificar posteriormente a exteriorização de conídios. A exteriorização de conídios pode ser observada 9 dias após o tratamento. Destruxinas puderam ser detectadas em larvas que receberam os padrões de destruxina (controle positivo).

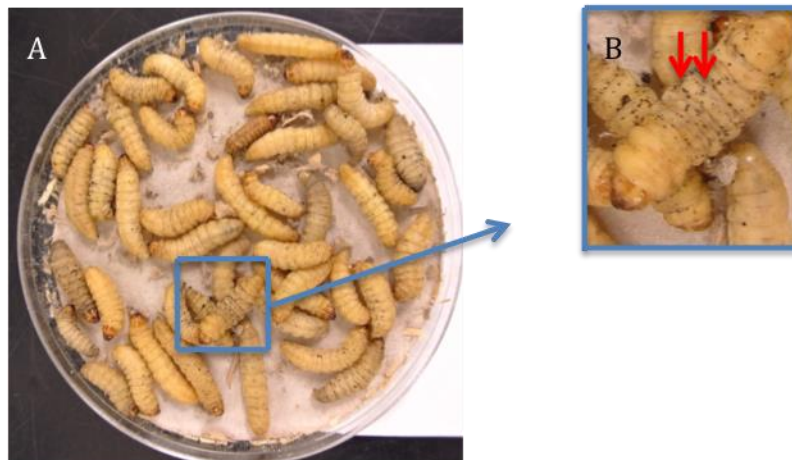


Figura 10. Lagartas de *Galleria mellonella* dois dias após exposição à conídios de *Metarhizium robertsii* ARSEF 2575. (A) Placa de Petri com larvas infectadas. (B) Ampliação da porção da figura A. As setas vermelhas indicam a melanização da cutícula da larva, representando sinais precoce da infecção fúngica.

3.4 Viabilidade dos isolados utilizados nos ensaios biológicos

Em todos os bioensaios a viabilidade dos conídios (percentual de germinação relativa dos conídios nas suspensões fúngicas) de todas as suspensões fúngicas foi $\geq 98\%$.

3.5 Isolamento dos fungos após ensaios biológicos

As larvas de *G. mellonella*, *T. molitor* e *R. microplus* expostas aos isolados de *M. anisopliae* s.l. apresentaram desenvolvimento de colônias fúngicas. Tais colônias foram identificadas como sendo os mesmos isolados utilizados nos bioensaios através de análises macro e micro-morfológicas (TULLOCH, 1976). As larvas do grupo controle não apresentaram crescimento fúngico.

3.6 Percentual de mortalidade das larvas de inseto

A morte de lagartas de *G. mellonella* do grupo controle (grupo de larvas tratado com solução de Tween 80 a 0.01%) foi sempre maior quando comparada com larvas de *T. molitor*; i.e., a mortalidade das larvas de *Galleria* do grupo controle atingiu uma média de 16,67% no dia 5 após o tratamento, enquanto as larvas de *Tenebrio* apresentaram uma média de 1.6% no mesmo período.

Houve grande variação na virulência dos diferentes isolados testados, bem como na suscetibilidade dos hospedeiros (Tabela 2). Na maior concentração (10^7 conídios mL⁻¹), os isolados ARSEF 724, 760, 1885, 2575, 3641 e 3643 causaram 100% de mortalidade das larvas de *Galleria* 3 dias após o tratamento (Tabela 2). Cinco dias após o tratamento com a maior concentração, 13 isolados (ARSEF 552, 724, 729, 759, 760, 782, 1448, 1449, 1885, 2521, 2575, 3641, e 3643) já haviam causado 100% de mortalidade em larvas de *Galleria*; em contraste, analisando a mesma concentração, somente dois isolados (ARSEF 1448 e 3643) causaram 100% de mortalidade em larvas de *Tenebrio* 5 dias após o tratamento. Quatro isolados (ARSEF 724, 760, 1885, e 2575) causaram mais de 90% de mortalidade em larvas de *Tenebrio* 5 dias após o tratamento com 10^7 conídios/mL.

ARSEF 552, 724, 729, 759, 782, 1449, 1882, 1885, 2521, 2575, 3641, 3643, 3479, e 3918 causaram $\geq 50\%$ de mortalidade de larvas de *Galleria* na menor concentração conidial, 5 dias após o tratamento. No mesmo tempo e concentração, os isolados mais virulentos para *Galleria* foram: ARSEF 1449 (91,67% de mortalidade larval $\pm 8,33\%$ de erro padrão), ARSEF 3643 (90,63% de mortalidade larval $\pm 9,38\%$ de erro padrão), e ARSEF 3643 (84,38% de mortalidade larval $\pm 15,63\%$ de erro padrão).

Para *Tenebrio*, 5 dias após o tratamento, na menor concentração de conídios somente o isolado ARSEF 1885 causou $\geq 50\%$ de mortalidade de larvas. Os isolados ARSEF 3643 e ARSEF 724 foram, respectivamente, o segundo e o terceiro isolados mais virulentos causando 45% de mortalidade larval ($\pm 23,63\%$ e $\pm 22,50\%$ de erro padrão, respectivamente), 5 dias após o tratamento usando a concentração de 10^5 conídios mL⁻¹.

A figuras 11 e 12 mostram a variação temporal (do dia 1 ao dia 4) na mortalidade causada em lagartas de *G. mellonella* e em *T. molitor* pelos diversos isolados fúngicos testad

Tabela 2. Percentual de mortalidade (media \pm erro padrão) de larvas de *Tenebrio molitor*, 5 dias após o tratamento e de larvas de *Galleria mellonella*, 3 dias após o tratamento com pulverização de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. mantidos a 28°C.

Isolados	<i>Tenebrio molitor</i>		<i>Galleria mellonella</i>	
	Concentração de conídios (mL ⁻¹)		Concentração de conídios (mL ⁻¹)	
	1 x 10 ⁷	1 x 10 ⁵	1 x 10 ⁷	1 x 10 ⁵
ARSEF 3643	100.00 \pm 0.0 d	45.00 \pm 23.63 bce	100.00 \pm 0.0 f	14.58 \pm 8.33 a
ARSEF 1448	100.0 \pm 0.0 d	28.33 \pm 15.90 bcde	84.38 \pm 12.76 bdf	31.25 \pm 25.52 a
ARSEF 1885	96.67 \pm 1.7 cd	66.67 \pm 23.33 b	100.00 \pm 0.0 f	27.08 \pm 21.14 a
ARSEF 724	95.00 \pm 5.0 cd	45.00 \pm 22.55 bce	100.00 \pm 0.0 f	8.33 \pm 2.08 a
ARSEF 760	93.33 \pm 6.7 cd	13.33 \pm 7.26 ac	100.00 \pm 0.0 f	4.17 \pm 2.08 a
ARSEF 2575	93.33 \pm 6.7 cd	28.33 \pm 21.86 bc	100.00 \pm 0.0 f	20.83 \pm 20.83 a
ARSEF 1449	90.00 \pm 7.6 bcd	16.67 \pm 14.24 ac	97.92 \pm 2.08 df	8.33 \pm 5.51 a
ARSEF 782	88.33 \pm 9.3 bcd	16.67 \pm 7.26 bce	97.92 \pm 2.08 df	14.17 \pm 8.70 a
ARSEF 3641	86.67 \pm 8.8 bcde	33.33 \pm 20.28 bcde	100.00 \pm 0.0 f	53.13 \pm 38.27 a
ARSEF 2521	80.0 \pm 11.5 bcde	28.33 \pm 23.33 bce	68.75 \pm 31.25 bdefg	34.38 \pm 28.07 a
ARSEF 929	75.00 \pm 15.3 acd	16.67 \pm 14.24 ac	52.08 \pm 28.94 abd	20.83 \pm 12.67 a
ARSEF 759	66.67 \pm 20.3 abcd	3.33 \pm 3.33 ade	79.17 \pm 20.83 bcdf	16.67 \pm 9.08 a
ARSEF 552	63.33 \pm 11.7 abcd	0.00 \pm 0.0 a	89.58 \pm 10.42 bdf	0.00 \pm 0.0 a
ARSEF 2211	61.67 \pm 25.9 abd	5.00 \pm 2.89 ac	70.83 \pm 29.17 bdefg	25.00 \pm 18.75 a
ARSEF 729	46.67 \pm 14.8 abc	1.67 \pm 1.67 ade	64.58 \pm 26.60 bcdf	10.42 \pm 5.51 a
ARSEF 3918	40.00 \pm 30.6 abc	0.00 \pm 0.0 a	35.42 \pm 29.39 ab	53.13 \pm 38.27 a
ARSEF 1883	21.67 \pm 10.9 ab	0.00 \pm 0.0 a	33.33 \pm 18.52 ace	27.08 \pm 24.03 a
ARSEF 1882	16.67 \pm 14.2 ab	5.00 \pm 0.0 ac	35.42 \pm 18.52 ace	8.33 \pm 8.33 a
ARSEF 324	13.33 \pm 10.9 ae	0.00 \pm 0.0 a	31.25 \pm 15.73 acg	4.17 \pm 4.17 a
ARSEF 3479	5.00 \pm 5.0 a	1.67 \pm 1.67 ad	6.25 \pm 0.0 a	8.33 \pm 2.08 a
Controle	1.67 \pm 1.7 a	1.67 \pm 1.7 ad	4.17 \pm 4.17 a	4.17 \pm 4.17 a

Os bioensaios foram realizados 3 vezes, usando 2 replicas para cada isolado, sob condições controladas. Novas larvas e suspensões conidiais foram utilizadas a cada bioensaio. Larvas do grupo controle foram tratadas com solução de Tween 80 a 0,01%. Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ($P \geq 0.05$) (teste de Kruskal-Wallis seguido por Student-Newman-Keuls).

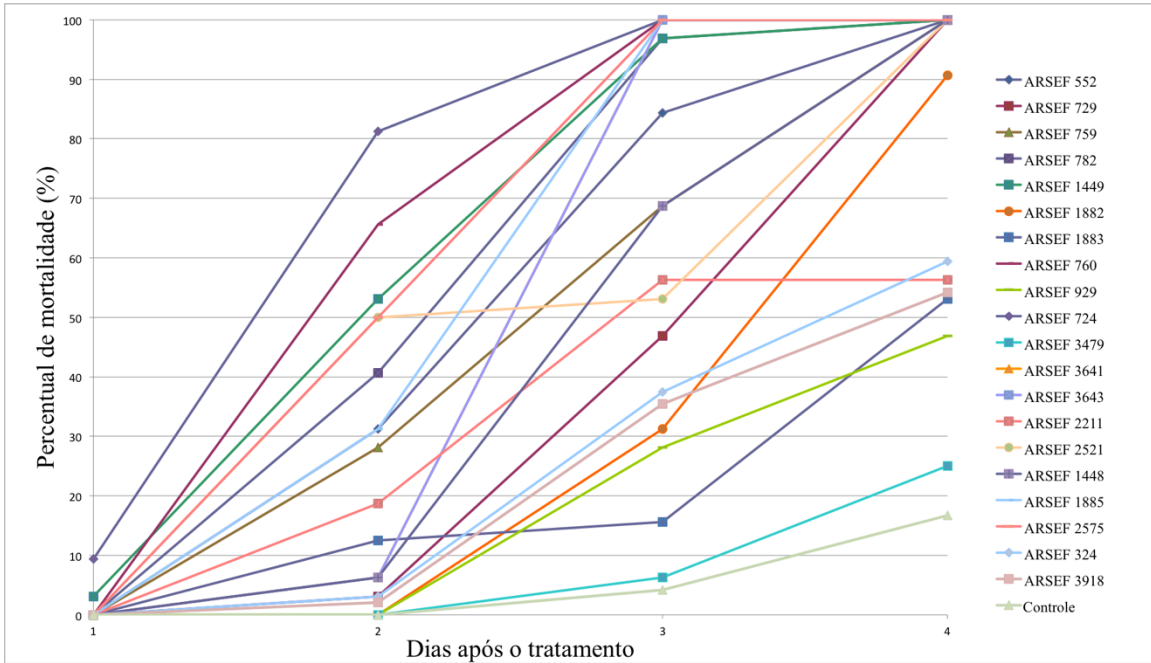


Figura 11. Percentual de mortalidade (%) médio de lagartas de *Galleria mellonella* após exposição a fungos entomopatogênicos do complexo *Metarhizium anisopliae* na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} . A figura representa os 4 primeiros dias após exposição aos conídios. Os experimentos foram repetidos três vezes.

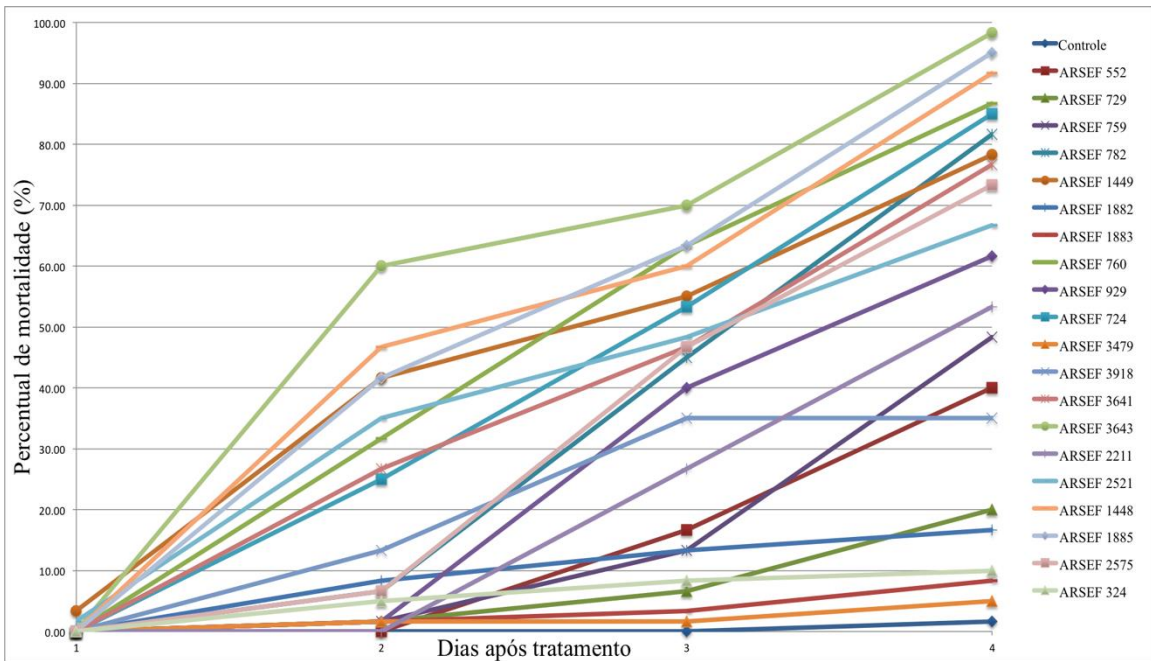


Figura 12. Percentual de mortalidade (%) médio de larvas de *Tenebrio molitor* após exposição a fungos entomopatogênicos do complexo *Metarhizium anisopliae* na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} . A figura representa os 4 primeiros dias após o exposição aos conídios. Os experimentos foram repetidos três vezes.

3.7 Percentual de mortalidade das larvas de *Rhipicephalus microplus*

Os isolados apresentaram uma ampla diversidade em relação aos seus potenciais virulentos contra *R. microplus*. As larvas do grupo controle apresentaram um percentual de mortalidade média de 1% no decorrer do experimento. Cinco dias após o tratamento das larvas, o percentual médio de mortalidade das larvas tratadas com os isolados testados na maior concentração (10^8 conídios mL^{-1}) foi considerado satisfatório, atingindo o valor de 50,66%. Três isolados se destacaram apresentando altas taxas de virulência para larvas de *R. microplus* somente 5 dias após o tratamento fúngico; foram eles: ARSEF 729, ARSEF 760 e ARSEF 3641 (Tabela 3). Dentre os 3 isolados mencionados, o isolado ARSEF 3641 de *M. anisopliae* s.l. se destacou com uma média de mais de 85% de mortalidade larval na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} .

Em todos os tempos analisados (5, 10, e 15 dias após os tratamentos) e para todos os isolados, a resposta das larvas expostas à menor concentração (10^5 conídios mL^{-1}) não foi diferente significativamente do grupo controle.

Em geral, a mortalidade das larvas ocorreu de forma diretamente proporcional a concentração de conídios testada. Desta forma, quanto maior a concentração de conídios a qual as larvas foram expostas, maior o percentual de mortalidade dessas larvas; com exceção do isolado ARSEF 729 que ocasionou uma média no percentual de mortalidade na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} maior em relação a concentração de 10^6 conídios mL^{-1} .

Dez dias após o tratamento, o percentual médio de mortalidade foi proporcional a concentração de conídios utilizada, variando entre 2,8% e 100% (Tabela 4). Os isolados ARSEF 3643, e ESALQ 959 apresentaram melhores resultados na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} em relação a concentração de 10^8 conídios mL^{-1} . E o isolado ARSEF 3918 apresentou melhores resultados na concentração de 10^6 conídios mL^{-1} em relação a concentração de 10^7 conídios mL^{-1} . No décimo dia após o tratamento, dois isolados (ARSEF 729, ARSEF 3641) já haviam causado a mortalidade de 100% das larvas de *R. microplus* (Tabela 4).

No 15º dia após o tratamento, na maior concentração testada, o percentual médio de mortalidade variou entre 4,4% e 100% (Tabela 5). Com exceção do isolado ARSEF 3918, todos os isolados apresentaram melhores resultados na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} . Sete isolados (ARSEF 552, ARSEF 729, ARSEF 760, ARSEF 782, ARSEF 2575, ARSEF 3641, ARSEF 3643) causaram mortalidade de 100% das larvas de *R. microplus* 15 dias após a exposição às suspensões fúngicas (Tabela 5).

Foram avaliadas as concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) obtidas ao 5º dia após tratamento (Tabela 6). A maioria dos isolados ocasionou a morte de metade da população de larvas, neste curto espaço de tempo, com a concentração de 10^8 conídios mL^{-1} (Tabela 6), com exceção dos isolados ARSEF 324, ARSEF 1095, ARSEF 1883, ARSEF 1885, ARSEF 2521, e ESALQ 959.

O isolado de *M. acridum* ARSEF 324 não apresentou potencial virulento, dentre os isolados testados, para larvas de carrapato; com médias percentuais de mortalidade de 2,4%, 2,8%, e 4,4%, 5, 10, e 15 dias, após os tratamentos, respectivamente (Tabelas 3, 4, e 5).

Tabela 3. Percentual médio* \pm desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 5 dias após a exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$.

Isolado	Controle	Concentração de conídios (mL^{-1})			
		10^5	10^6	10^7	10^8
ARSEF 729	1.0 ± 0.0^a	$8.4 \pm 17.1^{a,b}$	7.8 ± 3.7^b	19.4 ± 5.0^c	99.5 ± 0.5^c
ARSEF 3641	1.0 ± 0.0^a	3.1 ± 4.8^a	8.5 ± 17.0^a	86.6 ± 19.3^b	93.5 ± 10.0^b
ARSEF 760	1.0 ± 0.0^a	1.0 ± 0.0^a	2.3 ± 1.8^a	$4.4 \pm 2.4^{a,b}$	92.0 ± 5.9^b
ARSEF 782 (CG 148)	1.0 ± 0.0^a	1.0 ± 0.0^a	20.9 ± 7.4^b	$61.3 \pm 7.9^{b,c}$	85.3 ± 5.7^c
ARSEF 2575	1.0 ± 0.0^a	1.0 ± 0.0^a	$7.9 \pm 8.3^{a,b}$	$68.8 \pm 9.9^{b,c}$	85.1 ± 5.3^c
ARSEF 3918	1.0 ± 0.0^a	9.4 ± 5.6^a	55.0 ± 24.6^b	$64.8 \pm 27.3^{a,b}$	81.3 ± 12.7^b
ARSEF 3643	1.0 ± 0.0^a	1.0 ± 0.0^a	9.4 ± 16.5^b	77.5 ± 12.8^c	80.0 ± 5.3^c
ARSEF 3479	1.0 ± 0.0^a	$1.8 \pm 1.4^{a,b}$	18.4 ± 14.0^b	$71.9 \pm 21.5^{b,c}$	79.3 ± 18.1^c
ARSEF 1882	1.0 ± 0.0^a	1.3 ± 0.5^a	1.5 ± 0.5^a	8.5 ± 1.7^b	64.3 ± 22.4^b
ARSEF 2211	1.0 ± 0.0^a	1.0 ± 0.0^a	$1.9 \pm 1.2^{a,b}$	$5.0 \pm 3.5^{b,c}$	58.8 ± 14.6^c
ARSEF 1448	1.0 ± 0.0^a	1.1 ± 0.4^a	1.1 ± 0.4^a	25.0 ± 14.4^b	49.4 ± 17.8^b
ARSEF 929	1.0 ± 0.0^a	1.0 ± 0.0^a	2.0 ± 0.0^b	$15.0 \pm 6.0^{b,c}$	37.5 ± 7.6^c
ARSEF 724	1.0 ± 0.0^a	1.0 ± 0.0^a	1.0 ± 0.0^a	5.3 ± 2.2^b	36.0 ± 17.6^b
ARSEF 552	1.0 ± 0.0^a	1.0 ± 0.0^a	1.5 ± 0.5^a	16.5 ± 7.7^b	31.9 ± 5.9^b
ARSEF 759	1.0 ± 0.0^a	1.0 ± 0.0^a	1.0 ± 0.0^a	2.6 ± 0.5^b	22.8 ± 6.6^b
ARSEF 2521	1.0 ± 0.0^a	1.0 ± 0.0^a	$2.9 \pm 3.0^{a,b}$	$8.4 \pm 5.7^{b,c}$	19.4 ± 15.5^c
ARSEF 1885	1.0 ± 0.0^a	$1.4 \pm 0.7^{a,b}$	$3.8 \pm 2.6^{b,c}$	10.0 ± 4.6^c	16.9 ± 10.7^c
ESALQ 959	1.0 ± 0.0^a	1.8 ± 1.4^a	1.5 ± 0.9^a	6.1 ± 2.9^a	15.6 ± 7.8^b
ARSEF 1883	1.0 ± 0.0^a	1.1 ± 0.4^a	1.0 ± 0.0^a	3.9 ± 1.2^b	7.1 ± 0.4^b
ARSEF 1095	1.0 ± 0.0^a	1.0 ± 0.0^a	1.6 ± 1.4^a	1.5 ± 0.9^a	6.1 ± 3.3^b
ARSEF 324	1.0 ± 0.0^a	1.0 ± 0.0^a	1.0 ± 0.0^a	1.3 ± 0.7^a	2.4 ± 0.5^b

(*) Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem significativamente entre si ($P \geq 0,05$). Kruskal-Wallis seguido por SNK.

Tabela 4. Percentual médio* \pm desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 10 dias após a exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$.

Isolado	Controle	Concentração de conídios (mL^{-1})			
		10^5	10^6	10^7	10^8
ARSEF 729	$1,0 \pm 0,0^a$	$17,1 \pm 22,0^{a,b}$	$63,1 \pm 19,6^{b,c}$	$95,4 \pm 2,8^{c,d}$	$100,0 \pm 0,0^d$
ARSEF 3641	$1,0 \pm 0,0^a$	$14,4 \pm 4,2^{a,b}$	$26,9 \pm 23,9^b$	$98,1 \pm 1,5^c$	$100,0 \pm 0,0^c$
ARSEF 552	$1,0 \pm 0,0^a$	$1,0 \pm 0,0^a$	$20,9 \pm 13,2^{b,c}$	$62,5 \pm 21,0^{c,d}$	$99,4 \pm 0,5^d$
ARSEF 760	$1,0 \pm 0,0^a$	$6,5 \pm 2,3^{a,b}$	$19,9 \pm 20,7^{b,c}$	$94,3 \pm 3,1^{c,d}$	$99,3 \pm 1,8^d$
ARSEF 2575	$1,0 \pm 0,0^a$	$1,0 \pm 0,0^a$	$20,3 \pm 14,0^b$	$96,1 \pm 6,7^{b,c}$	$99,4 \pm 0,5^c$
ARSEF 3643	$1,0 \pm 0,0^a$	$3,3 \pm 3,1^{a,b}$	$26,4 \pm 20,7^b$	$99,1 \pm 0,6^c$	$98,8 \pm 0,7^c$
ARSEF 782 (CG 148)	$1,0 \pm 0,0^a$	$1,0 \pm 0,0^a$	$36,9 \pm 9,2^b$	$62,5 \pm 16,7^{b,c}$	$93,6 \pm 3,7^c$
ARSEF 2211	$1,0 \pm 0,0^a$	$2,5 \pm 0,5^{a,b}$	$16,0 \pm 9,2^{b,c}$	$53,4 \pm 27,6^{c,d}$	$92,4 \pm 4,4^d$
ARSEF 929	$1,0 \pm 0,0^a$	$3,9 \pm 3,0^{a,b}$	$36,9 \pm 21,3^{b,c}$	$71,3 \pm 11,6^{c,d}$	$88,1 \pm 6,5^d$
ARSEF 3479	$1,0 \pm 0,0^a$	$7,0 \pm 5,9^{a,b}$	$32,9 \pm 16,9^{b,c}$	$87,3 \pm 11,3^{c,d}$	$95,1 \pm 4,5^d$
ARSEF 1448	$1,0 \pm 0,0^a$	$3,9 \pm 1,2^{a,b}$	$5,9 \pm 2,1^{b,c}$	$61,3 \pm 25,2^{c,d}$	$83,8 \pm 2,3^d$
ARSEF 1885	$1,0 \pm 0,0^a$	$4,0 \pm 2,8^{a,b}$	$18,5 \pm 8,2^{b,c}$	$53,8 \pm 18,1^{c,d}$	$83,0 \pm 4,4^d$

ARSEF 3918	1,0 ± 0,0 ^a	12,5 ± 7,1 ^a	74,4 ± 28,2 ^b	63,6 ± 34,2 ^b	81,3 ± 12,7 ^b
ARSEF 2521	1,0 ± 0,0 ^a	5,3 ± 2,5 ^{a,b}	14,8 ± 8,3 ^{b,c}	28,1 ± 17,5 ^{c,d}	75,4 ± 24,4 ^d
ARSEF 1882	1,0 ± 0,0 ^a	1,3 ± 0,5 ^a	2,0 ± 0,9 ^a	10,5 ± 1,4 ^b	74,4 ± 18,4 ^b
ARSEF 724	1,0 ± 0,0 ^a	5,5 ± 4,3 ^{a,b}	11,4 ± 13,6 ^{a,b}	25,4 ± 21,2 ^{b,c}	70,6 ± 11,5 ^c
ARSEF 759	1,0 ± 0,0 ^a	1,0 ± 0,0 ^a	1,8 ± 0,5 ^{a,b}	10,5 ± 6,7 ^{b,c}	65,6 ± 22,9 ^c
ARSEF 1095	1,0 ± 0,0 ^a	1,0 ± 0,0 ^a	13,3 ± 29,1 ^{a,b}	14,0 ± 6,8 ^{b,c}	31,3 ± 13,3 ^c
ARSEF 1883	1,0 ± 0,0 ^a	1,1 ± 0,4 ^a	1,1 ± 0,4 ^a	5,9 ± 4,1 ^b	29,0 ± 25,0 ^b
ESALQ 959	1,0 ± 0,0 ^a	3,0 ± 1,3 ^a	6,0 ± 6,3 ^a	42,5 ± 17,3 ^b	19,3 ± 7,9 ^b
ARSEF 324	1,0 ± 0,0 ^a	1,3 ± 0,7 ^a	1,1 ± 0,4 ^a	2,1 ± 2,0 ^a	2,8 ± 0,5 ^b

(*) Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem significativamente entre si ($P \geq 0,05$). Kruskal-Wallis seguido por SNK.

Tabela 5. Percentual médio* ± desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 15 dias após a exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$.

Isolado	Controle	Concentração de conídios (mL^{-1})			
		10^5	10^6	10^7	10^8
ARSEF 552	1,0 ± 0,0 ^a	13,8 ± 6,6 ^{a,b}	40,6 ± 23,8 ^b	98,0 ± 5,3 ^c	100,0 ± 0,0 ^c
ARSEF 729	1,0 ± 0,0 ^a	36,3 ± 29,0 ^{a,b}	85,3 ± 7,2 ^{b,c}	99,1 ± 0,4 ^{c,d}	100,0 ± 0,0 ^d
ARSEF 760	1,0 ± 0,0 ^a	10,3 ± 7,3 ^{a,b}	56,9 ± 15,1 ^{b,c}	99,1 ± 0,4 ^{c,d}	100,0 ± 0,0 ^d
ARSEF 782 (CG 148)	1,0 ± 0,0 ^a	2,5 ± 0,8 ^{a,b}	60,0 ± 14,4 ^b	97,0 ± 1,1 ^{b,c}	100,0 ± 0,0 ^c
ARSEF 2575	1,0 ± 0,0 ^a	3,9 ± 4,6 ^{a,b}	38,1 ± 14,1 ^b	100,0 ± 0,0 ^c	100,0 ± 0,0 ^c
ARSEF 3641	1,0 ± 0,0 ^a	25,3 ± 12,2 ^{a,b}	64,4 ± 9,4 ^b	99,4 ± 1,8 ^c	100,0 ± 0,0 ^c
ARSEF 3643	1,0 ± 0,0 ^a	16,1 ± 13,4 ^{a,b}	68,1 ± 21,5 ^b	100,0 ± 0,0 ^c	100,0 ± 0,0 ^c
ARSEF 2211	1,0 ± 0,0 ^a	5,9 ± 2,3 ^{a,b}	51,1 ± 13,3 ^{b,c}	78,8 ± 18,9 ^{c,d}	98,1 ± 1,4 ^d
ARSEF 3479	1,0 ± 0,0 ^a	9,9 ± 7,5 ^{a,b}	59,4 ± 23,2 ^{b,c}	94,9 ± 5,7 ^{c,d}	97,9 ± 3,6 ^d
ARSEF 929	1,0 ± 0,0 ^a	24,5 ± 23,8 ^{a,b}	65,6 ± 11,5 ^b	91,1 ± 9,8 ^{b,c}	97,9 ± 1,9 ^c
ARSEF 1448	1,0 ± 0,0 ^a	7,5 ± 2,4 ^{a,b}	14,9 ± 5,2 ^{b,c}	87,5 ± 7,6 ^{c,d}	96,8 ± 1,9 ^d
ARSEF 1885	1,0 ± 0,0 ^a	13,3 ± 7,6 ^{a,b}	47,5 ± 22,7 ^{b,c}	90,0 ± 7,4 ^{c,d}	94,9 ± 3,3 ^d
ARSEF 2521	1,0 ± 0,0 ^a	14,5 ± 3,2 ^{a,b}	48,8 ± 22,8 ^{b,c}	66,3 ± 12,5 ^{c,d}	93,5 ± 8,9 ^d
ARSEF 3918	1,0 ± 0,0 ^a	13,9 ± 5,9 ^a	80,1 ± 25,8 ^b	65,8 ± 33,2 ^b	88,1 ± 14,6 ^b
ARSEF 759	1,0 ± 0,0 ^a	1,8 ± 0,7 ^{a,b}	4,0 ± 3,0 ^b	67,5 ± 15,4 ^c	87,9 ± 9,3 ^c
ARSEF 724	1,0 ± 0,0 ^a	22,8 ± 14,8 ^{a,b}	45,0 ± 26,2 ^b	89,6 ± 5,0 ^c	83,3 ± 30,5 ^c
ESALQ 959	1,0 ± 0,0 ^a	4,5 ± 1,9 ^{a,b}	15,3 ± 11,3 ^{b,c}	72,4 ± 16,5 ^{c,d}	83,1 ± 7,5 ^d
ARSEF 1882	1,0 ± 0,0 ^a	1,3 ± 0,5 ^a	6,1 ± 4,7 ^{a,b}	20,5 ± 9,8 ^{b,c}	75,9 ± 16,7 ^c
ARSEF 1883	1,0 ± 0,0 ^a	1,1 ± 0,4 ^a	1,9 ± 1,1 ^a	39,4 ± 16,1 ^b	66,3 ± 14,6 ^b
ARSEF 1095	1,0 ± 0,0 ^a	1,4 ± 0,7 ^a	7,5 ± 5,8 ^a	45,6 ± 13,2 ^b	52,5 ± 22,4 ^b
ARSEF 324	1,0 ± 0,0 ^a	1,8 ± 1,4 ^a	1,4 ± 0,5 ^a	3,5 ± 2,1 ^b	4,4 ± 2,9 ^b

(*) Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem significativamente entre si ($P \geq 0,05$). Kruskal-Wallis seguido por SNK.

Tabela 6. Concentração letal (CL₅₀ e CL₉₀) dos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. obtida nos ensaios biológicos de larvas de *Rhipicephalus microplus* 5 dias após o tratamento, Experimento realizado sob condições controladas de 27 ± 1° C e Umidade Relativa ≥ 80%.

Isolado	Concentrações letais	Intervalo de confiança	P valor
ARSEF 324	CL ₅₀ = 1,01 × 10 ¹⁵ CL ₉₀ = 9,58 × 10 ¹⁸	4,31 × 10 ¹⁴ – 1,70 × 10 ³⁸ 1,17 × 10 ¹⁸ – 1,70 × 10 ³⁸	P < 0,05%
ARSEF 552	CL ₅₀ = 4,16 × 10 ⁸ CL ₉₀ = 3,02 × 10 ¹⁰	3,62 × 10 ⁷ – 4,79 × 10 ⁹ 1,90 × 10 ⁸ – 1,09 × 10 ¹³	P < 0,05%
ARSEF 724	CL ₅₀ = 2,05 × 10 ⁸ CL ₉₀ = 2,14 × 10 ⁹	5,31 × 10 ⁷ – 7,93 × 10 ⁸ 1,19 × 10 ⁸ – 6,16 × 10 ¹⁰	P = 0
ARSEF 729	CL ₅₀ = 1,55 × 10 ⁷ CL ₉₀ = 9,98 × 10 ⁷	8,59 × 10 ⁶ – 2,80 × 10 ⁷ 3,83 × 10 ⁷ – 3,04 × 10 ⁸	P < 0,01%
ARSEF 759	CL ₅₀ = 7,81 × 10 ⁸ CL ₉₀ = 1,81 × 10 ¹⁰	3,91 × 10 ⁷ – 1,56 × 10 ¹⁰ 5,29 × 10 ⁷ – 1,59 × 10 ¹³	P = 0
ARSEF 760	CL ₅₀ = 3,33 × 10 ⁷ CL ₉₀ = 1,07 × 10 ⁸	2,08 × 10 ⁷ – 5,32 × 10 ⁷ 5,51 × 10 ⁷ – 2,32 × 10 ⁸	P = 0
ARSEF 782	CL ₅₀ = 7,27 × 10 ⁶ CL ₉₀ = 1,19 × 10 ⁸	3,46 × 10 ⁶ – 1,53 × 10 ⁷ 3,23 × 10 ⁷ – 5,43 × 10 ⁸	P < 0,05%
ARSEF 929	CL ₅₀ = 2,14 × 10 ⁸ CL ₉₀ = 5,69 × 10 ⁹	4,03 × 10 ⁷ – 1,13 × 10 ⁹ 1,69 × 10 ⁸ – 3,38 × 10 ¹¹	P < 0,05%
ARSEF 1095	CL ₅₀ = 1,41 × 10 ¹¹ CL ₉₀ = 3,53 × 10 ¹³	1,11 × 10 ⁴ – 1,79 × 10 ¹⁸ 0,80 × 10 ² – 1,19 × 10 ²⁷	P = 0
ARSEF 1448	CL ₅₀ = 8,58 × 10 ⁷ CL ₉₀ = 1,62 × 10 ⁹	2,82 × 10 ⁷ – 2,61 × 10 ⁸ 1,51 × 10 ⁸ – 2,57 × 10 ¹⁰	P < 0,05%
ARSEF 1882	CL ₅₀ = 6,40 × 10 ⁷ CL ₉₀ = 4,00 × 10 ⁸	3,29 × 10 ⁷ – 1,24 × 10 ⁸ 1,06 × 10 ⁷ – 1,87 × 10 ⁹	P = 0
ARSEF 1883	CL ₅₀ = 1,18 × 10 ¹¹ CL ₉₀ = 4,67 × 10 ¹³	1,15 × 10 ⁵ – 1,21 × 10 ¹⁷ 3,59 × 10 ³ – 2,64 × 10 ²⁵	P < 0,05%
ARSEF 1885	CL ₅₀ = 8,05 × 10 ⁹ CL ₉₀ = 3,09 × 10 ¹²	1,34 × 10 ⁷ – 4,83 × 10 ¹² 1,82 × 10 ⁷ – 3,68 × 10 ¹⁸	P < 0,05%
ARSEF 2211	CL ₅₀ = 8,02 × 10 ⁷ CL ₉₀ = 4,91 × 10 ⁸	3,98 × 10 ⁷ – 1,61 × 10 ⁸ 1,15 × 10 ⁸ – 2,65 × 10 ⁹	P = 0
ARSEF 2521	CL ₅₀ = 2,57 × 10 ⁹ CL ₉₀ = 2,99 × 10 ¹¹	2,59 × 10 ⁷ – 2,54 × 10 ¹¹ 4,81 × 10 ⁷ – 5,67 × 10 ¹⁵	P < 0,01%
ARSEF 3479	CL ₅₀ = 7,14 × 10 ⁶ CL ₉₀ = 1,38 × 10 ⁸	3,30 × 10 ⁶ – 1,55 × 10 ⁷ 3,44 × 10 ⁷ – 6,95 × 10 ⁸	P = 0
ARSEF 3641	CL ₅₀ = 4,06 × 10 ⁶ CL ₉₀ = 2,90 × 10 ⁷	2,22 × 10 ⁶ – 7,41 × 10 ⁶ 1,14 × 10 ⁷ – 8,56 × 10 ⁷	P = 0
ARSEF 3643	CL ₅₀ = 7,80 × 10 ⁶ CL ₉₀ = 1,02 × 10 ⁸	3,85 × 10 ⁶ – 1,80 × 10 ⁷ 3,06 × 10 ⁷ – 4,13 × 10 ⁸	P = 0
ARSEF 3918	CL ₅₀ = 2,22 × 10 ⁶ CL ₉₀ = 2,32 × 10 ⁸	7,61 × 10 ⁵ – 6,50 × 10 ⁶ 2,51 × 10 ⁷ – 3,08 × 10 ⁹	P = 0
ARSEF 2575	CL ₅₀ = 8,52 × 10 ⁶ CL ₉₀ = 8,68 × 10 ⁷	4,38 × 10 ⁶ – 1,65 × 10 ⁷ 2,89 × 10 ⁷ – 3,11 × 10 ⁸	P = 0
ESALQ 959	CL ₅₀ = 5,40 × 10 ⁹ CL ₉₀ = 6,98 × 10 ¹¹	1,48 × 10 ⁷ – 1,98 × 10 ¹² 1,38 × 10 ⁷ – 2,03 × 10 ¹⁷	P < 0,05%

3.8 Comparação da virulência dos isolados sobre larvas de diferentes artrópodes

Dentre os isolados estudados alguns merecem destaque por apresentar alta virulência tanto para carrapatos da espécie *R. microplus* quanto para os insetos aqui utilizados. São eles, os isolados ARSEF 782, ARSEF 2575, ARSEF 3641 e ARSEF 3643. Estes isolados, quando analisados na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} , causaram percentual médio de mortalidade variando de 86,67% a 100% em *T. molitor* e *G. mellonella*, 5 e 3 dias após o tratamento, respectivamente (Tabela 2). A mortalidade média de larvas de carrapato, utilizando a mesma concentração, 5 dias após a exposição aos isolados fúngicos variou de 61,3% a 86,6% (Tabela 3).

Alguns isolados apresentaram melhores resultados ou para larvas de insetos, ou para larvas de carrapato. É o caso do isolado ARSEF 1448 que 5 dias após tratamento com 1×10^7 conídios mL^{-1} causou 100% de média de mortalidade em larvas de *T. molitor*; e dos isolados ARSEF 1885 e ARSEF 724 que 3 dias após tratamento com 1×10^7 conídios mL^{-1} causou 100% de média de mortalidade em lagartas de *G. mellonella*. Estes mesmos isolados, contudo, não apresentaram um resultado satisfatório, 5 dias após tratamento de larvas de *R. microplus* (Tabela 3).

Apesar da maior susceptibilidade dos insetos a fungos artropodopatogênicos, em relação aos carrapatos; interessantemente apenas 5 dias após o tratamento, o isolado ARSEF 729 foi capaz de causar mortalidade média de 71.9% da população de larvas de *R. microplus*, em comparação com 5% e 6,25% de média de mortalidade de larvas de *T. molitor* e *G. mellonella*, respectivamente, 5 e 3 dias após a exposição fúngica, utilizando-se a mesma concentração (1×10^7 conídios mL^{-1}) conidial. O isolado ARSEF 3918 apresentou o mesmo resultado, causando maior mortalidade em larvas de *R. microplus* do que em larvas de *T. molitor* (Tabelas 2 e 3), apesar de ter causado de moderada a alta taxa de mortalidade (53,13%) para lagartas de *G. mellonella* quando exposto a 10^5 conídios mL^{-1} (Tabela 2).

3.9 Comparação entre a produção de destruxinas e virulência fúngica

Comparando a produção *in vitro* de destruxinas com a virulência dos isolados de *Metarhizium* spp. não foi possível estabelecer uma estreita associação entre as duas características. Os isolados mais virulentos para *T. molitor* foram ARSEF 3643 e ARSEF 1448 (ambos os isolados causaram 100% de mortalidade de 5 dias após o tratamento com 1×10^7 conídios mL^{-1}). Curiosamente, ARSEF 3643 foi o melhor produtor de destruxinas *in vitro*, enquanto que não houve níveis detectáveis de destruxinas em culturas do ARSEF 1448. O mesmo ocorreu com *G. mellonella*, ou seja, dos 5 isolados mais virulentos (por exemplo, ARSEFs 724, 760, 1885, 2575, 3641 e 3643), dois não produziram destruxinas *in vitro* (ARSEF 724 e ARSEF 760), um produziu baixos níveis de destruxina (ARSEF 1885), e três foram bons produtores (ARSEF 2575, ARSEF 3641 e, especialmente, ARSEF 3643). Da mesma forma para larvas de *R. microplus*, houve isolados não produtores de destruxinas capazes de causar altos índices de mortalidade.

4 DISCUSSÃO

Além de virulento para o artrópode alvo, o isolado fúngico precisa resistir aos estresses abióticos presentes no meio ambiente. Isso implica na reunião de vários fatores fundamentais para a seleção de isolados candidatos à aplicação a campo. Espera-se que fungos patogênicos naturalmente mais resistentes à radiação solar tenham resultados ainda mais satisfatórios quando formulados. Sabe-se também que a tolerância natural do isolado ao calor e à radiação UV-B pode ser manipulada, já que quando o isolado fúngico é produzido sob estresse nutritivo (carência de carbono e nitrogênio) sua tolerância a esses estresses aumenta (RANGEL et al., 2008). Informações como esta, em conjunto com a seleção de isolados virulentos em testes *in vitro*, garantem avanços no desenvolvimento de bioprodutos mais eficientes para o controle biológico de artrópodes praga.

No presente estudo, a exposição à radiação UV-B inviabilizou alguns conídios, mas, mais expressivamente, causou atraso na germinação dos isolados testados. Isso pode ser observado quando as figuras 3 (análise da germinação com 24h de incubação após a exposição) e 4 (análise da germinação com 48h de incubação após a exposição) são comparadas; os resultados expostos na figura 4 sugerem que alguns dos danos sofridos pelos conídios não são letais, já que na maior parte dos casos há recuperação no percentual de germinação dos conídios. Como exemplo pode-se observar o isolado ARSEF 1883, que apresentou mais de 50% de recuperação. Na prática, essa recuperação é possivelmente inviabilizada, já que a campo o conídio poderá ser exposto a ação dos raios solares todos os dias. De acordo com Braga e colaboradores (2001a), longos períodos de exposição à luz solar tendem a retardar a germinação mais que curtos períodos de exposição. Estes autores explicam ainda que, a interrupção temporária do ciclo celular devido a danos no material genético e danos em importantes sistemas enzimáticos que impedem a absorção de nutrientes podem contribuir para a germinação retardada de conídios expostos à radiação UV-B.

O isolado ARSEF 324 de *M. acridum*, e o isolado ARSEF 2575 de *M. robertsii* foram utilizados como padrões, já que sua tolerância à radiação UV-B é conhecida (BRAGA et al., 2001b; RANGEL et al., 2008). Dessa maneira os bioensaios foram validados quando os valores de germinação relativa destes isolados eram coerentes com o esperado. É sabido que isolados da espécie *M. acridum* são muito termotolerantes e também tolerantes à radiação UV-B. Interessantemente, dois isolados de *M. anisopliae* s.l. (ARSEF 759 e ARSEF 1449) obtiveram uma resposta semelhante, e numericamente melhor, do que o isolado de *M. acridum* ARSEF 324, mesmo sem a adição de óleo.

Alguns autores correlacionaram variações na pigmentação do conídio com a tolerância a radiação solar (AYRES et al., 1996; BRAGA et al., 2006; RANGEL et al., 2006). Isolados de *M. anisopliae* s.l. geralmente apresentam conídios de cor verde escuro, com variações na tonalidade do verde (como pode ser observado na Figura 1 do presente capítulo). Pouco se sabe sobre a biosíntese e importância biológica desses pigmentos (BRAGA et al., 2006), mas a síntese de conídios verdes parece depender de, pelo menos, duas vias metabólicas (MAGOON; MESSING-AL-AIDROOS, 1985). Braga e colaboradores (2006) reportaram que mutantes do isolado de *M. robertsii* ARSEF 23 pigmentados em preto eram significativamente mais tolerantes a UV do que conídios menos pigmentados do mesmo mutante. Os conídios dos isolados ARSEF 759 e ARSEF

1449 (Figuras 1C e 1E, respectivamente) não são, aparentemente, os mais pigmentados dentre os isolados estudados no presente capítulo. Fernandes e colaboradores (2007) estudaram a variabilidade na tolerância a radiação UV-B de isolados de *Beauveria bassiana*, mostrando que alguns conídios brancos de certos isolados de *B. bassiana* foram mais tolerantes à radiação UV-B quando comparados com a tolerância de isolados de *M. anisopliae* previamente reportadas por outros autores. Fernandes e colaboradores (2007) explicaram que isto pode ser indicativo de que certas espécies de fungos podem usar eficazmente outros mecanismos de proteção à radiação ultravioleta, como é o caso de enzimas como superóxido dismutase e catalase (NOVENTA JORDÃO et al., 1999) e elevados níveis de manitol ou trealose (RANGEL et al., 2006). Dessa maneira, sugere-se que mesmo não fortemente pigmentados, os isolados ARSEF 759 e 1449 usam outros mecanismos que os tornam mais tolerantes à UV-B em relação aos outros.

A utilização de agentes protetores, como óleos vegetais e minerais, com o objetivo de reduzir os danos causados pela radiação UV vem sendo reportada com sucesso há algumas décadas (MOORE et al., 1993, ALVES et al., 1998). Entretanto, a resposta de cada isolado fúngico ao dano causado pela radiação UV e sua recuperação consequente à adição de óleo é variável. No presente estudo, dois isolados (ARSEF 2211 e ARSEF 3479) não responderam bem à adição de óleo na análise feita 24 horas após o tratamento. Ou seja, não houve aumento da tolerância à radiação UV-B, e sim uma menor tolerância dos conídios à UV-B quando estes foram suspensos em óleo em comparação a tolerância dos conídios suspensos em água. Sugere-se que o óleo interferiu negativamente na germinação desses isolados. Após 48 horas, entretanto, esses isolados tiveram sua germinação restaurada e responderam coerentemente à adição de óleo. Portanto, mesmo tendo interferido nas primeiras horas de crescimento, o óleo ainda teve seu efeito protetor evidenciado 48 horas após exposição à UV-B. A razão dessa inibição no crescimento inicial pode ser variada, podendo estar relacionada a um efeito físico da presença do óleo (atrasando a germinação fúngica por estar impedindo o acesso do conídio ao meio de cultura) ou até mesmo uma interação química entre o óleo e o conídio.

Em 1998, Alves e colaboradores reportaram o efeito de diferentes tipos de óleo na germinação conidial de *M. anisopliae* s.l. após exposição à radiação UV-B ou UV-A. As formulações testadas eram a base de conídios de um único isolado fúngico: IMI 299984 de *M. anisopliae* s.l. No presente capítulo, objetivou-se selecionar isolados fúngicos intrinsecamente tolerantes à radiação UV-B e que respondessem de maneira ótima à adição de óleo mineral na formulação. É importante destacar que além da proteção à radiação UV, a presença de óleo mineral na formulação a base de fungos entomopatogênicos pode melhorar o desempenho do fungo em testes *in vitro* com carrapatos (ANGELO et al., 2010; CAMARGO et al., 2012).

Em relação às suas capacidades de produção de destruxina *in vitro* em meio líquido, 18 isolados (todos brasileiros) tiveram sua capacidade de síntese de destruxinas explorada pela primeira vez. Dois isolados foram usados como padrões: *M. robertsii* isolado ARSEF 2575, um fungo capaz de produzir altos níveis de destruxina e usado frequentemente como isolado modelo, e *M. acridum* isolado ARSEF 324, que na literatura é apontado como não produtor (WANG et al., 2012) ou baixo produtor (MOON et al., 2008) de destruxina. Uma grande variedade de perfis de produção foi verificada dentre os 13 isolados produtores (Figura 5)

De acordo com a classificação mais recente para espécies de *Metarhizium* (BISCHOFF et al., 2009), foi possível constatar que a produção de destruxina não está relacionada à espécie do fungo, uma vez que diferentes isolados de uma mesma espécie produziram ou não destruxina. Por exemplo: o isolado ARSEF 552, classificado como *M. pingshaense* produz destruxina; já o isolado ARSEF 1448, também *M. pingshaense*, não produz. O mesmo acontece com a espécie *M. robertsii* que tem o isolado ARSEF 2575 como produtor e o isolado ARSEF 724 (*M. robertsii*) como exemplo não produtor.

Analisando os resultados do presente capítulo, observa-se que não foi possível detectar traços de destruxina nas amostras do isolado ARSEF 324 de *M. acridum*, assim como reportado por Wang e colaboradores (2012). Em contraste, Kershaw e colaboradores (1999) e Moon e colaboradores (2008) reportaram baixos níveis de produção por esse isolado. Vale salientar que as condições de crescimento e o tempo de avaliação diferiram do presente estudo, tendo os autores usado temperaturas de incubação maiores e analisado as amostras após um tempo maior de incubação.

As suspensões dos isolados incubados foram quantificadas uniformemente de maneira que aproximadamente a mesma quantidade de conídios fosse incubada no meio líquido; dessa maneira (e observando também a taxa de germinação conidial de cada isolado) foi possível estabelecer o tempo de incubação necessário para a prima detecção das toxinas, que foi de 3 dias, em média. Entretanto, um isolado (ARSEF 759) apresentou níveis detectáveis da toxina já no segundo dia de incubação; e os isolados Em contraste, em 2 isolados, ARSEF 1885 e ARSEF 729, não foi possível detectar a produção de destruxinas até o quarto dia de incubação, o que evidencia uma certa falta de uniformidade na produção desses compostos dependendo do isolado fúngico.

A detecção de destruxinas *in vivo* data de 1971, quando Suzuki e colaboradores, reportaram a presença de destruxinas em larvas do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) 4 dias após a infecção cuticular com conídios de *M. anisopliae*. Roberts, previamente, em 1966 demonstrou que a hemolinfa de larvas do bicho-da-seda, doentes em decorrência da infecção com *Metarhizium*, era tóxica para lagartas de *G. mellonella*. Mais recentemente, Amiri-Besheli e colaboradores (2000) estudaram a significância das destruxinas na patogenicidade de *Metarhizium* spp. em lagartas de *G. mellonella*. Estes autores detectaram níveis variáveis de destruxinas A e B (e não a E) em larvas mortas pela infecção fúngica provocada por diferentes espécies de *Metarhizium*, incluindo *M. robertsii* ARSEF 2575 (previamente identificado como *M. anisopliae* var. *anisopliae*). No presente estudo, contudo, não foi possível detectar a presença de destruxinas em insetos moribundos (doentes, mas ainda vivos) expostos a *M. robertsii* isolado ARSEF 2575 ou a *M. acridum* ARSEF 324.

Sugere-se que a rápida detoxificação da destruxina nas lagartas de *G. mellonella* interferiu severamente na detecção *in vivo* desses compostos no presente estudo, explicando os resultados negativos encontrados. A dinâmica da detoxificação das destruxinas em lagartas de *G. mellonella* após inoculação com destruxina A purificada foi descrita (JEGOROV et al. 1992). Neste trabalho, os autores injetaram na hemocele das lagartas aproximadamente 50 µg/g de destruxina A; uma paralisia tetânica na fase inicial foi observada seguida por recuperação substancial após 4 a 6 horas. Em resumo, a dinâmica de detoxificação de destruxina A no corpo das lagartas de *G. mellonella* mostrou que: inicialmente a concentração de destruxina A aumentou na hemolinfa e rapidamente se espalhou pelo corpo do inseto. A maioria dos órgãos de *G. mellonella*

analisados (hemolinfa, intestino médio, intestino posterior e cutícula) apresentaram mais que 90% de conversão de destruxina A em produto linear (não tóxico), dentro de 3 horas, indicando uma rápida detoxificação (JEGOROV et al., 1992).

O presente capítulo também objetivou selecionar isolados de *Metarhizium* spp. com alta virulência para larvas de *R. microplus* e comparar estes resultados com a virulência para larvas de insetos. De maneira geral os carrapatos são mais tolerantes aos fungos artropodopatogênicos do que os insetos, haja visto as menores doses recomendadas para insetos (ALVES, 1998) em relação as comumente utilizadas em testes contra carrapatos (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008). Baseado nos resultados do presente capítulo, poucos dias após o tratamento, a concentração de 10^5 conídios mL⁻¹ de alguns isolados foi capaz de reduzir pela metade (i.e., ARSEF 3641 e ARSEF 3918) a população de lagartas de *G. mellonella*, diferente dos resultados para larvas de *R. microplus*, que geralmente resultaram em baixa mortalidade das larvas nesta concentração.

Apesar das larvas de insetos terem sido analisadas por 10 dias após a exposição fúngica, 3 dias após o tratamento, seis isolados já haviam causado 100% de média de mortalidade em lagartas de *G. mellonella*, por isso os dados foram analisados após 3 dias de tratamento. As larvas de *T. molitor* foram menos susceptíveis aos isolados testados do que larvas de *G. mellonella*, por esse motivo os dados de 5 dias (e não do dia 3) após o tratamento foram analisados e comparados. Essa maior tolerância das larvas de *Tenebrio* em relação às lagartas de *Galleria* e das larvas de carrapato em relação às larvas de insetos pode ser explicada, em parte pela constituição da cutícula destes artrópodes. Larvas de carrapatos possuem uma cutícula mais rígida e quitinizada em relação ao tegumento da maioria das larvas de inseto; essa diferença na constituição da cutícula acaba por conferir maior tolerância ao fungo. Da mesma forma, a cutícula de larvas de *Tenebrio* é mais rígida em comparação com a cutícula de *Galleria*.

A variação na susceptibilidade fúngica existe não somente entre diferentes espécies de artrópodes, mas também dentro dos estádios de desenvolvimento de uma mesma espécie, como acontece com larvas e fêmeas de *R. microplus* (CAMARGO et al., 2012). De acordo com BALASHOV (1972), a cutícula dos carrapatos é formada pela camada externa, chamada epicutícula (composta externamente por ceras ou lipídios e internamente por proteínas) e também pela camada interna, chamada de procutícula (composta por quitina e proteína). A epicutícula em *R. microplus* somente pode ser observada a partir da ecdise na ninfa e, em maior quantidade no adulto (ODHIAMBO, 1982). Portanto, nas fêmeas ingurgitadas, os conídios germinados precisam dissolver primeiro a camada de lipídios da epicutícula, para só então passar para as camadas mais polares da cutícula, constituídas de proteínas hidrossolúveis; o que pode explicar porque fêmeas de carrapatos são menos susceptíveis ao fungo em relação ao estágio larval e também o maior sucesso das formulações fúngicas oleosas (ANGELO et al., 2010; CAMARGO et al., 2012).

Apesar das larvas dos diferentes artrópodes testados terem apresentado um padrão de susceptibilidade (*G. mellonella* mais suscetível que *T. molitor*, que por sua vez foram mais suscetíveis que *R. microplus*), algumas exceções foram observadas; a que mais se destaca é a mortalidade causada pelo isolado ARSEF 729, com resultados muito satisfatórios para carrapatos e pouco expressivos para larvas dos insetos testados. Neste caso pode-se sugerir uma alta especificidade desse isolado para carrapatos, em relação a

insetos, fato que torna o controle biológico de carrapatos seguro inclusive para organismos artrópodes não-alvo.

O isolado ARSEF 1095 de *M. brunneum*, conhecido como F52 e comercializado na Europa para controle de pragas agrícolas não apresentou virulência para larvas de carrapato, bem como o isolado ARSEF 324 de *M. acridum*. Este último não foi virulento para larvas de insetos ou para larvas de *R. microplus*. Isolados da espécie *M. acridum* são conhecidos pela sua alta especificidade e virulência contra acridídeos e baixa virulência para outros artrópodes. Em um estudo realizado por Wang e colaboradores (2011), discutiu-se a regulação do gene *mest1* de *M. robertsii* ARSEF 2575 durante crescimento na cutícula de larvas de *Manduca sexta* (uma espécie de mariposa). Este gene foi super-regulado em *M. robertsii* quando este fungo colonizou a cutícula de larvas de *M. sexta* e estava ausente em *M. acridum*; quando o gene foi transferido para o isolado de *M. acridum*, este fungo foi capaz de colonizar e matar as larvas do inseto. Levando em consideração as diferentes especificidades dos fungos artropodotogênicos, a busca por isolados mais virulentos para carrapatos concomitantemente com análises dos possíveis fatores de virulência envolvidos na infecção fúngica, são estudos essenciais para reduzir ao máximo a possibilidade de atingir organismos não alvo.

A utilização de ensaios biológicos sob condições controladas ou semi-controladas, é de extrema importância para a seleção de isolados fúngicos patogênicos para o artrópode-alvo; além de essencial para a compreensão dos fatores envolvidos na virulência do entopatógeno.

Quando os resultados de virulência foram comparados com os resultados de produção de destruxinas, não houve relação estreita entre os isolados mais virulentos para insetos e os melhores produtores de destruxinas *in vitro*. Da mesma forma para larvas de *R. microplus*, houve isolados não produtores de destruxinas capazes de causar altos índices de mortalidade. Dentre os fungos estudados, os isolados de *M. anisopliae* s.l. ARSEF 782 e ARSEF 3643 e o isolado de *M. robertsii* ARSEF 2575 destacaram-se por apresentar resultados positivos nas diferentes características estudadas, isto é, suas tolerâncias à radiação UV-B, níveis de virulência e produção *in vitro* de destruxinas foram consideravelmente satisfatórios.

REFERÊNCIAS

ALVES, R.T.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C.; LEATHER, S.R. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. **Crop Protection**, v.17, p.675-679, 1998.

ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

AMIRI-BESHELI, B.; KHAMBAY, B.; CAMERON, S.; DEADMAN, M.L.; BUTT, T.M. Inter- and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp., and its significance to pathogenesis. **Mycology Research**, v. 104, p. 447-452, 2000.

ANGELO, I. C., FERNANDES, E. K. K., BAHIANSE, T. C., PERINOTTO, W. M. S., MORAES, A. P. R., TERRA, A. L. M., BITTENCOURT, V. R. E. P. Efficiency of

Lecanicillium lecanii to control the tick *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 317-322, 2010.

AYRES, P.G.; GUNASEKERA, T.S.; RASANAYAGAM, M.S.; PAUL, N.D. Effects of UV- B radiation (280-320 nm) on foliar saprotrophs and pathogens. In: FRANKLAND, J.C.; MAGAN, N.; GADD, G.M. **Fungi and Environmental Change**. Paris: Cambridge University Press, 1996. p.33-50.

BAHIENSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K.; ANGELO, I.C.; PERINOTTO, W.M.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Avaliação do potencial de controle biológico de *Metarhizium anisopliae* sobre *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 4, 243-245, 2007.

BAILEY, A.M.; KERSHAW, M.J.; HUNT, B.A.; PATERSON, I.C.; CHARNLEY, A.K.; REYNOLDS, S.E.; CLARKSON, J.M. Cloning and sequence analysis of an intron-containing domain from a peptide synthetase- encoding gene of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v. 173, p. 195-197, 1996.

BALASHOV, Y.S. A translation of bloodsucking ticks (Ixodoidea) ³/₄ Vectors of diseases of man and animals. **Misc Publ Entomol**, v.8, n.5, p.159-376, 1972.

BARROS, B. H. R.; DA SILVA, S. H.; MARQUES, E. R.; ROSA, J. C.; YATSUDA, A. P.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. L. A proteomic approach to identifying proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Fungal Biology**, v. 114, p. 572–579, 2010.

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v.101, n. 4, p.512-530, 2009.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. **Revista Universidade Rural, Séries Ciências da Vida**, v. 16, p. 49-55, 1994.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MESSIAS, C.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 105, p. 874-882, 2001a.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, p. 734-739, 2001b.

BRAGA, G.U.L.; RANGEL, D.E.N.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. **Mycologia**, v. 94, p. 912- 920, 2002.

BRAGA G.U.L.; RANGEL, D.E.N.; FLINT, S.F.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, p. 418-422, 2006.

CAMARGO, M.G.; GOLO, P.S.; ANGELO, I.C.; PERINOTTO, W.M.S.; SA, F.A.; QUINELATO, S. BITTENCOURT, V.R.E.P. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 140-147, 2012.

CERENIUS, L.; THORNQVIST, P.; VEY, A.; JOHANSSON, M.W.; SODERHALL, K. The effect of the fungal toxin destruxins E on isolated crayfish haemocytes. **Journal of Insect Physiology**, v. 36, p. 785-789, 1990.

COSTA, G.L.; SARQUIS, M.I.M.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 154, n. 4, p. 207-209, 2002.

D'ENFERT, C. Fungal spore germination: Insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 21, p. 163-172, 1997.

DONZELLI, B.G.G.; KRASNOFF, S.B.; SUN-MOON, Y.; CHURCHILL, A.C.L.; GIBSON, D.M. Genetic basis of destruxin production in the entomopathogen *Metarhizium robertsii*. **Current Genetics**, v. 58, p. 105-116, 2012.

FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L.A.; LOMER, C.J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. **Mycopathologia**, v. 135, p. 171-181, 1996.

FARIA, M.R.; WRIGHT, S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, p. 237-256, 2007.

FERNANDES, E.K.K. **Caracterização e seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle microbiano do carrapato *Boophilus microplus***. 2007. 130p Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

FERNANDES, E. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 237-243, 2007.

FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, n. 1-4, p.71-93, 2008.

FERNANDES, É.K.K.; KEYSER, C.A.; CHONG, J.P.; RANGEL, D.E.N.; MILLER, M.P.; ROBERTS, D.W. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, n. 1, p.115-128, 2010.

FERNANDES, É.K.K.; ANGELO, I.C.; RANGEL, D.E.N.; BAHIENSE, T.C.; MORAES, A.M.L.; ROBERTS, D.W.; BITTENCOURT, V.R.E.P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 307-318, 2011.

FINNEY, D.S. **Probit analysis**. Cambridge: University Press, 1971. 333p.

GAO, Q.; JIN, K; YING, S.-H.; ZHANG, Y.; XIAO, G.; SHANG, Y.; DUAN, Z.; HU, X.; XIE, X.-Q.; ZHOU, G.; PENG, G.; LUO, Z.; HUANG, W.; WANG, B.; FANG, W.; WANG, S.; ZHONG, Y.; MA, L.-J.; ST LEGER, R.J.; ZHAO, G.-P.; PEI, Y.; FENG, M.G.; XIA, Y.; WANG, C. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. **PLoS Genetics** v. 7, p. e1001264, 2011.

HAN, P.; JIN, F.; DONG, X.; FAN, J.; QIU, B.; REN, S. Transcript and protein analysis of the destruxin A-induced response in larvae of *Plutella xylostella*. **Plos One**, v. 8, p. e60771-e60781, 2013.

HUXHAM, I.M.; LACKIE, A.M.; MCCORKINDALE, N.J. Inhibitory effects of cyclodepsipeptides, destruxins, from the fungus *Metarhizium anisopliae*, on cellular immunity in insects. **Journal of Insect Physiology**, v. 35, p. 97-105, 1989.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; JOHNSON, D.L. Influence of ultraviolet-light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Biological Control**, v.5, p.581-590, 1995.

JAMES, P.J.; KERSHAW, M.J.; REYNOLDS, S.E.; CHARLEY, A.K. Inhibition of desert locust (*Schistocera gregaria*) Malpighian tubule fluid secretion by destruxins, cyclic peptide toxins from the insect pathogenic *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Insect Physiology**, v. 39, p. 797-804, 1993.

JEGOROV, A.; MATHA, V.; HRADEC, H. Detoxification of destruxins in *Galleria mellonella* L. larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 103C, p. 227-229, 1992.

KERSHAW, M.J.; MOORHOUSE, E.R.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S.E.; CHARNLEY, A.K. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 74, p. 213-223, 1999.

KODARIA, Y. Toxic substances to insects, produced by *Aspergillus ochraceus* and *Oospora destructor*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 25, p. 261-262, 1961.

KODAIRA Y. Studies on the new toxic substances to insects, destruxin A and B, produced by *Oospora destructor*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 26, p. 39-62, 1962.

KRASNOFF, S.B.; SOMMERS, C.H.; MOON, Y-S.; DONZELLI, B.G.G.; VANDENBERG, J.D.; CHURCHILL, A.C.L., GIBSON, D.M. Production of mutagenic metabolites by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**, v. 54, p. 7083-7088, 2006.

LIU, B-L.; TZENG, Y-M. Development and applications of destruxins: a review. **Biothechnology Advances**, v. 30, p. 1242-1254, 2012.

MAGOON, J.; MESSING-AL-AIDROOS, K. Epistatic relationships and linkage among colour markers of the imperfect entomo-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Genetic Cytology**, v. 28, p. 96-100, 1985.

MOON, Y-S.; DONZELLI, B.G.G.; KRASNOFF, S.B.; McLANE, H.; GRIGGS, M.H.; COOKE, P.; VANDENBERG, J.D.; GIBSON, D.M.; CHURCHILL, A.C.L. *Agrobacterium*-Mediated Disruption of a Nonribosomal Peptide Synthetase Gene in the Invertebrate Pathogen *Metarhizium anisopliae* Reveals a Peptide Spore Factor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 4366-4380, 2008.

MOORE, Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens, **Annals of Applied Biology**, v. 122, p. 605-616, 1993.

MUROI, M.; SHIRAGAMI, N.; TAKATSUKI, A. Destruxin B, a specific and readily reversible inhibitor of vacuolar-type H⁺-translocating ATPase. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 205, p. 1358-1365, 1994.

NOVENTA JORDÃO, M.A.; COUTO, R.M.; GOLDMAN, M.H.S.; AGUIRRE, J.; CAPLAN, A.; TERENCEZI, H.F.; GOLDMAN, G.H. Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings. **Microbiology**, v.145, p.3229-3234, 1999.

ODHIAMBO, T.R. **Current themes in tropical science: physiology of ticks**. Oxford : Pergamon, 1982. v.1, 508p.

PAL, S.; LEGER, R.J.S.; WU, L.P. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 8969-8977, 2007.

QUAITE, F.E.; SUTHERLAND, B.M.; SUTHERLAND, J. C. Action spectrum for DNA damage in alfafa lowers predicted impact of ozone depletion. **Nature**, v. 358, 576-578, 1992.

QUINELATO, S.; GOLO, P.S.; PERINOTTO, W.M.S.; SÁ, F.A.; CAMARGO, M.G.; ANGELO, I.C.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Veterinary Parasitology**. v. 190, p. 556-565, 2012.

QUIOT, J.M.; VEY, A.; VAGO, C. Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 715-723, 1985.

RANGEL, D.E.N.; BYTLER, M.J.; TORABINEJAD, J.; ANDERSON, A.J.; BRAGA, G.U.L.; DAY, A.W.; ROBERTS, D.W. Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.93, p.170-182, 2006.

RANGEL, D.E.N.; ANDERSON, A.J.; ROBERT, D.W. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycological Research**, v. 112, p. 1362-1372, 2008.

REIS, R.C.S.; MELO, D.R.; SOUZA, E.J.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok sobre ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 544-547, 2001.

ROBERTS, D.W. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* II. Symptoms and detection in moribund hosts. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 8, p. 222-227, 1966.

ROBERTS, D.W.; FLINT, S.D. Tools of the UV trade: Light sources, filtering, measuring irradiance, and selecting biological weighting factors (action spectra). **Proceedings of the International Colloquium on Insect Pathology and Microbial Control**. EMBRAPA/Soja, Londrina, PR, Brazil. pp. 237-240, 2002.

ROBERTS, D.W.; ST LEGER, R.J. *Metarhizium spp.*, cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. **Advances in applied microbiology**, v. 54, p. 1-70, 2004.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 3. ed -reimpressão. Belo Horizonte: FEPMVZ- Editora, 2010. 264p. ISBN 85-87144-07-3.

SAMUELS, R.I.; CHARNLEY, A.K.; REYNOLDS, S.E. 1988a. The role of destruxins in the pathogenicity of 3 strains of *Metarrhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca Sexta*. **Mycopathology**, v. 104, p. 51-58, 1988a.

SAMUELS, R.I.; REYNOLDS, S.E.; CHARNLEY, A.K. Calcium channel activation of insect muscle by destruxins, insecticidal compounds produced by the entomopathogenic fungus *Metarrhizium anisopliae*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 90C, p. 403-412, 1988b.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarrhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1267-1274, 2010.

ST. LEGER, R.J.; BUTT, T.M.; GOETTEL, M.S.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. (1989) Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarrhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, v.13, p. 274-288, 1989.

STEINHAUS, E.A. **Disease in a minor chord**. Ohio State University Press, Columbus, Ohio, 1975. 488p. ISBN 10: 0814202187.

SUZUKI, A.; KAWAKAMI, K.; TAMURA, S.; (1971) Detection of destruxins in silkworm larvae infected with *Metarrhizium anisopliae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 35, p. 1641-1643, 1971.

TEUTSCHBEIN, J.; ALBRECHT, D.; POTSCHE, M.; GUTHKE, R.; AIMANIANDA, V.; CLAVAUD, C.; LATGE, J.P.; BRAKHAGE, A.A.; KNIEMEYER, O. Proteome profiling and functional classification of intracellular proteins from conidia of the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 3427–3442, 2010.

TEVINI, M. Molecular biological effects of ultraviolet radiation. In UV-B radiation and ozone depletion: Effects on humans, animals, plants microorganisms and materials. M. Tevini ed. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, 1993, pp. 1-15.

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

VEY, A.; MATHA, V.; DUMAS, C. Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 80, p. 177-187, 2002.

VILCINSKAS, A.; MATHA, V.; GÖTZ, P. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. **Journal of Insect Physiology**, v. 43, p. 475-483, 1997.

WANG, S.; FANG, W.; WANG, C.; ST LEGER, R.J. Insertion of an esterase gene into a specific locust pathogen (*Metarhizium acridum*) enables it to infect caterpillars. **PLOS Pathogens**, v. 7, e1002097, 2011.

WANG, B.; KANG, Q.; LU, Y.; BAI, L.; WANG, C. Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 1287-1292, 2012.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 879-920, 2007.

CAPITULO II

**A INFLUÊNCIA DA PR1 CONIDIAL NA VIRULÊNCIA DE
Metarhizium anisopliae s.l. CONTRA *Rhipicephalus microplus***

RESUMO

Pr1 é uma protease tipo subtilizina produzida por fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium* e reconhecida por estar envolvida nos passos iniciais da invasão fúngica na cutícula de artrópodes. No presente capítulo, a correlação entre a mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* e os níveis de Pr1 conidial de *Metarhizium anisopliae* isolado CG 148 foi estabelecida. Conídios com diferentes níveis de expressão de *pr1* e atividade enzimática foram obtidos por produção em meio artificial (resultando em baixa atividade de Pr1) ou em cadáveres de carrapato (resultando em alta atividade de Pr1). A atividade proteolítica conidial foi obtida usando N-suc-ala-ala-pro-phe-pNA como substrato e a expressão de *pr1* foi quantificada através de PCR em tempo real (qPCR) usando três genes (*gpd*, *try* and *tef*) como genes de referência. A atividade proteolítica obtida de conídios cultivados em cadáver de carrapatos foi de 36 U mg⁻¹, em comparação com 4 U mg⁻¹ obtidos de conídios cultivados em meio Batata dextrose agar. Bioensaios expondo larvas de *R. microplus* a suspensão de *M. anisopliae* CG 148 com alta atividade proteolítica e expressão gênica *pr1* não demonstraram aumento da virulência (= mudança significativa na mortalidade de larvas de carrapato) em relação ao tratamento com conídios de baixa atividade e expressão de *pr1*. Os níveis mínimos de *pr1* em conídios produzidos em meio artificial foram suficientes para atingir a virulência necessária para matar larvas de carrapato e os valores elevados dessa enzima nos conídios produzidos no carrapato não induziram mortalidade larval elevada. Dessa maneira, a virulência do isolado CG 148 em larvas de carrapato não foi elevada pelo aumento dos níveis conidiais de *pr1*.

Palavras chave: fungos artropodopatogênicos, carrapatos, expressão gênica, controle microbiano.

ABSTRACT

Pr1 is a subtilisin-like protease produced by entomopathogenic fungi, such as *Metarhizium* spp., and it is recognized as heavily involved in the initial steps of the fungal invasion of arthropod-host cuticles. In the current study, correlation was sought between mortality of tick larvae and conidial Pr1 levels of *Metarhizium anisopliae* isolate (CG 148). Conidia with different levels of *pr1* gene expression and enzymatic activity were obtained by producing them on either artificial medium (to yield low Pr1 activity) or on *R. microplus* cadavers (to yield high Pr1 activity). Conidial proteolytic activity was assessed using N-suc-ala-ala-pro-phe-pNA as substrate, and *pr1* expression was profiled by qPCR using three genes (*gpd*, *try* and *tef*) as reference (housekeeping) genes. Pr1 enzymatic (proteolytic) activity on conidia obtained from tick cadavers was 36 U mg⁻¹ in comparison to 4 U mg⁻¹ on conidia from PDA medium. Also *pr1* gene expression level was 10 times higher in conidia from tick cadavers compared to PDA medium. Bioassays of *M. anisopliae* s.l. CG 148 spores with elevated Pr1 proteolytic activity and gene expression levels did not demonstrate increased virulence (= significant change percent mortality of tick larvae). The minimal levels of *pr1* on conidia produced on artificial medium was adequate to afford high levels of virulence, and the elevated amounts of the enzyme on tick-cadaver-produced conidia did not induce elevated larval mortality. As long as some Pr1 activity was present, fungal virulence of isolate CG 148 against tick larvae was not elevated by increased levels of conidial *pr1*.

Key words: arthropodpathogenic fungi, ticks, gene expression, biological control.

1 INTRODUÇÃO

Pr1 é uma protease produzida por fungos artropodopatogênicos capaz de hidrolisar as proteínas cuticulares do hospedeiro. *Pr1* é supra-regulada duas vezes no ciclo de infecção de *Metarhizium* spp.: primeiramente durante os estágios iniciais de infecção, incluindo na formação do apressorio, uma estrutura formada pelo fungo na preparação para a colonização por hidrólise das proteínas cuticulares (ST LEGER, 1989; ST LEGER et al., 1991a); e secundariamente nos estágios finais da patogênese (formação dos conídios) para facilitar a emergência de hifas através da cutícula do inseto (SMALL; BIDOCHKA, 2005); essa emergência é necessária para que o ciclo patogênico deste fungo se complete, permitindo a produção de conídios na superfície do cadáver do artrópode, facilitando assim a dispersão conidial em larga escala.

Múltiplas passagens de fungos artropodopatogênicos em meio artificial podem eventualmente reduzir os níveis de produção conidial e reduzir a virulência fúngica. O cultivo em artrópodes hospedeiros pode restaurar essas características perdidas (KAWAKAMI, 1960; FARGUES; ROBERT, 1983). Dessa maneira, diferenças entre conídios produzidos em carrapatos (= produção *in vivo*) em contraste com aqueles produzidos em meio artificial (= produção *in vitro*) foram examinadas buscando apontar fatores críticos capazes de melhorar o controle biológico de carrapatos. O presente capítulo buscou avaliar a expressão genica de *pr1* e a atividade proteolítica específica de Pr1 em conídios de *M. anisopliae* s.l. produzidos em meio artificial ou em fêmeas de *R. microplus* correlacionando-as com os níveis de mortalidade produzidos por cada tipo de conídio em larvas deste carrapato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e período de execução dos experimentos

A expressão gênica de *pr1* e a atividade proteolítica específica de Pr1 em conídios de *M. anisopliae* s.l. produzidos em meio artificial ou em fêmeas de *R. microplus* foi realizada no laboratório de hemoparasitas e vetores (LHV) da UFRRJ, localizado na EPPWON, Seropédica, RJ, Brasil. Os bioensaios com larvas de *R. microplus* foram realizados no LCM da UFRRJ, também localizado na EPPWON. Esses experimentos foram realizados no período de Janeiro a Agosto de 2012.

2.2 Isolado estudado e obtenção dos conídios

O isolado de *M. anisopliae* s.l. usado no presente estudo foi o CG 148 obtido de *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidae) em Goiânia, Goiás, Brasil. Esse isolado foi cedido pela Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (EMBRAPA), Embrapa recursos genéticos e biotecnologia (CENARGEN) em Brasília, DF, Brasil. Placas da cultura estoque em batata destrose agar foram incubadas a 25 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ por 14 dias, e depois armazenadas a 4 °C. Vale salientar que o isolado depositado na coleção de fungos do CANARGEN como CG 148 é o mesmo depositado na coleção ARSEF (*Agriculture Research Service Collection of Entomopathogenic Fungi*) com o número 782.

Conídios de *M. anisopliae* s.l. CG 148 foram produzidos ou em BDA ou em cadáveres de *R. microplus*. Para o cultivo artificial em meio de cultura os conídios foram inoculados em BDA e incubados a 25 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ por 15 dias; para o cultivo em carrapatos, 5 μL de suspensão conidial (1×10^8 conídios mL^{-1}) foi inoculada em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* usando uma agulha de insulina (30 gauge). A inoculação foi realizada no forame entre o capitulo e o escudo do carrapato (JOHNS et al., 1998).

Os conídios foram retirados das placas de cultivo com o auxílio de um bisturi e uma lamina e suspensos em 100 mL de solução de monoleato sorbitano de poliexietileno (Tween 80[®], Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 0,01% v/v. A suspensão conidial foi homogeneizada por 1 minuto usando um vortex, quantificada em um hemocitômetro e ajustada para 1×10^8 conídios mL^{-1} . Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram obtidas de bovinos artificialmente infestados sem contato prévio (mínimo de 2 meses) com acaricidas químicos. As fêmeas ingurgitadas foram coletadas do chão das baias e lavadas em 0.1% de hipoclorito de sódio para a assepsia da cutícula, rinsadas em água e secas em papel toalha estéril. Oitocentas fêmeas foram inoculadas e incubadas a 25 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ por 15 dias, o que resultou em 100% de infecção.

A viabilidade conidial foi determinada através da inoculação de uma alíquota de aproximadamente 50 μL de suspensão conidial em BDA adicionado de 0.05% de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 25 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$. A germinação dos conídios foi observada em microscópio óptico (200 \times) após 24 horas (ALVES, 1998).

Conídios produzidos em BDA foram retirados das placas de Petri após 15 dias de crescimento e colocados em microtubos de plástico de 1,5 mL. Os conídios produzidos em carrapatos foram removidos utilizando-se um peneirador (Laboratory Test Sieve-Bertel[®]) (tamanho final do poro = 1,18 mm - Bertel[®]) na vibração máxima por 15 minutos. Os conídios cultivados em BDA ou em carrapatos foram separados em 7 alíquotas: 3 alíquotas de 60 mg para o ensaio de expressão genica, 2 alíquotas de 37 mg para o ensaio de atividade proteolítica e 2 alíquotas de 80 mg para o ensaio com larvas de carrapato. As amostras destinadas à expressão genica foram estocadas em 500 μL de solução de RNAlater (Ambion[®]). Os experimentos de produção conidial foram repetidos duas vezes.

2.3 Atividade específica de Pr1

Os conídios obtidos do meio de cultura ou dos cadáveres de carrapato foram suspensos em tampão de extração (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 contendo 0.25% de Triton X-100, 1:2.5 p/v) (SANTI et al., 2010). As suspensões foram agitadas vigorosamente por 5 minutos e filtradas utilizando um filtro de 0,2 mm de poro e 25 mm de diâmetro (Millipore[®] USA) para remoção dos conídios. A atividade proteolítica foi medida usando-se os filtrados e o substrato cromogênico N-suc-ala-ala-pro-phe-pNA como segue: 5 μL de filtrado, 5 μL de N-suc-ala-ala-pro-phe-pNA (Sigma[®]) a 10 mM e 90 μL de tampão Tris/HCl a 0,1 mol L^{-1} pH 8,0 (SANTI et al., 2010). A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. A absorbância foi medida a 405 nm num espectrofotômetro de placa (Multiskan GO[®] Thermo Scientific). A atividade enzimática foi calculada com base em uma curva padrão de p-nitroanilina (pNA), com cada amostra expressa em μMol por minuto de reação por mg de proteína; o ensaio foi repetido duas vezes com cada amostra em triplicada. O conteúdo proteico total foi medido de acordo com Lowry e colaboradores (1951), utilizando albumina sérica bovina com padrão. Os dados foram

analisados com análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey usando o software BioEstat[®], versão 4.0. *P*-valores menores que 0,05 foram considerados significantes (SAMPAIO, 2002).

2.4 Expressão gênica de *pr1*

A expressão do gene *pr1* foi analisada utilizando 3 genes (*gpd*, *try* and *tef*) como genes de referência (Tabela 1) (FANG; BIDOCHKA, 2006). O RNA foi isolado utilizando o kit *RNeasy Mini* (QIAGEN[®]) de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de ácido nucleico foram medidas com espectrômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific[®] USA). O cDNA foi sintetizado utilizando o kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Life Technologies[®]) de acordo com o protocolo do fabricante. O cDNA foi subsequentemente diluído com água DEPC (Life Technologies[®] USA) a 25 ng μL^{-1} . A mistura para amplificação (12 μL) do PCR em tempo real (qPCR) continha 25 ng de cDNA, 2 \times *Power SYBR GreenPCR Master Mix* (6 μL ; Life Technologies[®]) e 150 nM de cada par de primer (Life Technologies[®]) (Tabela 1). A reação foi realizada no sistema e PCR em tempo real StepOne Plus (Life Technologies[®] USA). O protocolo da reação seguiu as seguintes temperaturas: 10 minutos de ativação/desnaturação a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos 95 °C e 60 segundos a 60 °C. A fluorescência foi medida em cada etapa de polimerização. As amplificações foram realizadas duas vezes e cada cDNA foi analisado em triplicata em cada um dos dois testes.

A estabilidade da expressão dos genes de referência, bem como a expressão do gene *pr1*, foi avaliada pelo software geNorm qbase^{PLUS} (disponível no site <http://www.biogazelle.com/>). Informações detalhadas podem ser encontradas em Vandesompele e colaboradores (2002).

Tabela 1. Nome do gene, sequência dos *primers* e eficiência da PCR dos genes utilizados no presente estudo.

Gene	Nome do gene	Acesso no GenBank	Primers direto (F) e reverso (R)	Eficiência da PCR
<i>gpd</i>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	AY461523	F (5'-3'): GACTGCCCGCATTGAGAAG R (5'-3'): AGATGGAGGAGTTGGTGTTG	96.8 %
<i>pr1</i>	Protease semelhante a subtilisina	AJ416688	F (5'-3'): GATTGGTGGCAGCACTAAC R (5'-3'): TCCTGGATCTTCTTGCAAAG	96.1 %
<i>tef</i>	Fator de alongação na tradução 1 α	AY445082	F (5'-3'): AGGACGACAAGACTCACATC R (5'-3'): GTTCAGCGGCTTCCTTCTC	95.8 %
<i>try</i>	Enzima da biossíntese do triptofano	AY245100	F (5'-3'): TTGCAATGCATGTTTGATGTC R (5'-3'): CAAAGAGTGGTATCGAGTTAC	95.1 %

2.5 Ensaio biológico com larvas de *Rhipicephalus microplus*

Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram coletadas nas baías de animais artificialmente infestados e incubadas para oviposição de acordo com os métodos

descritos na sessão 2.2. A postura do dia 1 ao dia 10 foi separada. Alíquotas de 50 mg de ovos (aproximadamente 1000 ovos) foram pesadas e colocadas em tubos que posteriormente foram selados com algodão hidrofílico. A eclosão das larvas foi observada e tubos com menos de 98% de eclosão larval foram descartados. O tratamento das larvas foi feito no 15º dia após o início da eclosão das larvas.

Suspensões fúngicas foram preparadas como descrito na sessão 2.2. Os conídios foram quantificados e ajustados para $1,0 \times 10^8$ conídios mL^{-1} de acordo com Alves (1998). A viabilidade conidial foi determinada como reportado na sessão 2.2.

Cada bioensaio foi formado por 3 grupos: grupo controle, grupo tratado com conídios crescidos em BDA e grupo tratado com conídios provenientes de cadáveres de fêmeas de *R. microplus*. Uma solução contendo Tween 80® (0,01% v/v) foi usada para tratar os carrapatos do grupo controle. Cada grupo foi formado por 8 tubos (repetições) contendo larvas. O tratamento foi conduzido através da adição de 1 mL de suspensão fúngica em cada tubo. As larvas permaneceram imersas na suspensão fúngica por 3 minutos e então o tubo foi invertido até que o algodão absorvesse toda a suspensão. Os tubos foram mantidos a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ no escuro. A mortalidade larval de cada tubo foi estimada visualmente com auxílio de microscópio estereoscópio (20 ×) a cada 5 dias por 30 dias. O percentual de mortalidade larval foi expresso em porcentagem com variação de 0% a 100% e intervalos de 1%. Larvas que não se movimentavam após estímulo (atrito na superfície do tubo produzindo calor) foram consideradas mortas. Os bioensaios foram repetidos duas vezes.

As mortalidades médias das larvas foram comparadas utilizando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação entre as médias. Os testes foram executados usando o software BioEstat®, versão 4.0. *P*-valores menores que 0,05 foram considerados significantes (SAMPALHO, 2002).

2.6 Isolamento do fungo após ensaios biológicos

Amostras de larvas mortas de todos os grupos foram colocadas sobre lacas contendo meio BDA por 14 dias a 25 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ para permitir o crescimento fúngico e a conidiogênese. A macro e a micromorfologia das colônias fúngicas que cresceram foram examinadas de acordo com Tulloch, 1976.

3 RESULTADOS

3.1 Viabilidade dos conídios

Conídios de *M. anisopliae* isolado CG 148 usado no tratamento de fêmeas adultas e larvas de *R. microplus* tiveram aproximadamente 99% de germinação após incubação por 24 horas a 25 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$.

3.2 Atividade específica de Pr1

A atividade específica de Pr1 em extratos da superfície de conídios produzidos em meio artificial (BDA) ou em carrapatos foi estatisticamente ($P \leq 0.05$) diferente: viz., a atividade proteolítica de conídios produzidos em BDA foi de 4 U mg^{-1} , e de conídios produzidos em cadáveres de carrapato foi de 36.2 U mg^{-1} .

3.3 Expressão gênica de *prl*

A expressão de 3 genes de referência foi usada para mostrar a supra-regulação do gen *prl* em conídios produzidos em carrapatos adultos em contraste com o meio artificial. Todos os 3 genes de referência demonstraram alta estabilidade (média no geNorm $M \leq 0,5$); i.e., valores de M no geNorm de 0,218 para o *gpd*, 0,237 para o *try*, e 0,291 para o *tef*. Por outro lado a expressão do gen *prl* foi 10 vezes maior em conídios produzidos em cadáveres de carrapato quando comparada com a expressão em meio artificial (Figura 1). As eficiências do qPCR podem ser encontradas na Tabela 1.

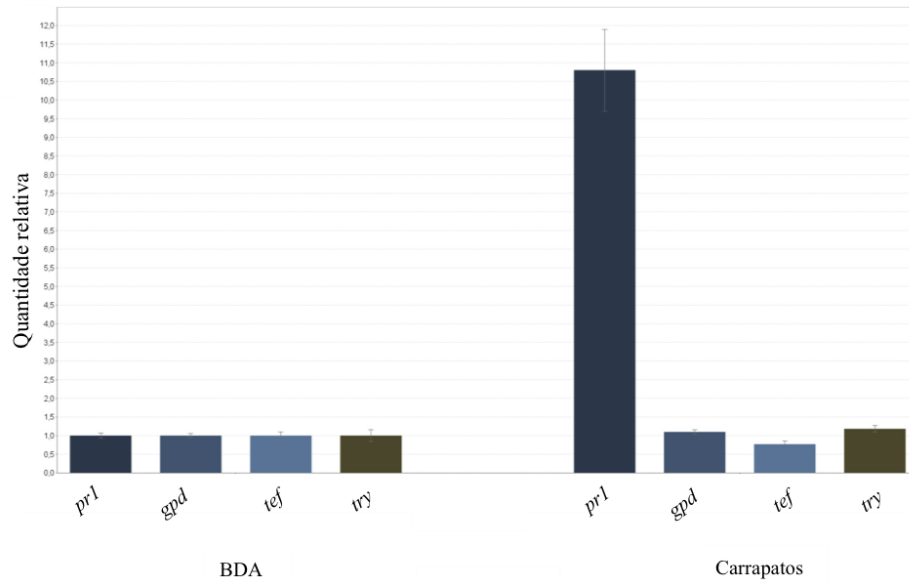


Figura 1. Níveis de expressão relativa (acompanhados dos respectivos desvios padrões) do gene *prl* de conídios cultivados em meio artificial batata dextrose agar (BDA) ou em cadáveres de carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus*. Os genes *gpd*, *tef* e *try* foram usados como genes de referência. As quantidades relativas foram baseadas nos níveis de expressão de conídios cultivados em BDA (geNorm qbase^{PLUS}).

3.4 Ensaio biológico com larvas de *Rhipicephalus microplus*

A mortalidade das larvas do grupo controle foi de no máximo 1%. As larvas expostas aos conídios produzidos nas fêmeas de carrapato ou em meio BDA apresentaram mortalidade significativamente maior ($P \leq 0,05$) em comparação com o grupo controle. Embora o grupo tratado com conídios provenientes dos carrapatos tenha apresentado níveis de mortalidade numericamente maiores em relação ao grupo tratado com conídios provenientes de meio BDA, não houve diferença estatística ($P \geq 0,05$) entre esses dois tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Percentual médio (%) de mortalidade e desvio padrão de larvas de *Rhipicephalus microplus* expostas a conídios cultivados em BDA ou em cadáveres de carrapatos.

Grupos	Dias após tratamento		
	5	10	15
Controle	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
BDA	16.6 ± 19.4 ^b	74.6 ± 28.3 ^b	93.3 ± 8.5 ^b
Carrapatos	21.7 ± 15.2 ^b	91.0 ± 8.0 ^b	98.8 ± 2.6 ^b

Cada grupo foi composto por 8 tubos contendo aproximadamente 1.000 larvas de *R. microplus*. Os ensaios foram repetidos duas vezes em dias diferentes, utilizando novas preparações conidiais. Médias com as mesmas letras na mesma coluna não diferem significativamente $P > 0.05$ (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

3.5 Re-isolamento fúngico

Larvas de *R. microplus* provenientes dos grupos tratados com fungos foram incubadas em alta unidade para facilitar o desenvolvimento de colônias fúngicas. A morfologia do fungo encontrado foi caracterizada de acordo com Tulloch (1976). O fungo isolado apresentava características morfológicas chave consistentes com as de *M. anisopliae* s.l. As larvas de *R. microplus* do grupo controle não exibiram crescimento fúngico.

4 DISCUSSÃO

O controle biológico de carrapatos utilizando fungos entomopatogênicos tem sido amplamente estudado nas últimas décadas (BITTENCOURT et al., 1992, 1994, 1995, 1999; SAMISH; REHACEK, 1999; SAMISH et al., 2004; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; FERNANDES et al. 2011; ANGELO et al., 2010; PERINOTTO et al., 2012); e esse método é frequentemente apresentado como uma alternativa promissora ao uso de acaricidas químicos. Contudo, mais pesquisas são necessárias sobre a eficácia desses microrganismos contra carrapatos, incluindo um conhecimento detalhado sobre os fatores-chave em relação à virulência do fungo.

Pr1 é uma protease do tipo subtilizina que tem sido proposta como um importante fator na inicialização da infecção fúngica via penetração através da cutícula do artrópode (ST LEGER, 1986, 1988, 1989; CAMPOS et al., 2005; SMALL; BIDOCHKA, 2005; FANG; BIDOCHKA, 2006; DHAR; KAUR, 2010). Já é bem reconhecido que as espécies de *Metarhizium* podem produzir um grande número de enzimas; dentre elas, destaca-se a Pr1, importante para a digestão do complexo cuticular do hospedeiro artrópode durante a formação do apressório. Assim, levantou-se a questão: porque a presença dessa enzima seria importante em conídios não germinados? De acordo com St. Leger e colaboradores (1991b), a facilidade com que essa enzima pode ser extraída dos conídios usando-se tampões adequados, associado à sua atividade em substratos apropriados, indica que existe atividade enzimática na superfície dos conídios. A presença dessa enzima superficialmente pode proporcionar meios para a germinação dos

esporos para a obtenção de nutrientes e também facilitar modificações preliminares de superfície na cutícula hospedeiro antes ou no momento da germinação.

Baixos, porém detectáveis níveis de Pr1 foram encontrados em meio líquido após separação do micélio de *M. anisopliae* cultivado em meio mínimo (somente nitrogênio inorgânico) (DHAR; KAUR, 2010). Isso sugere que a síntese de Pr1 é constitutiva. Quando o fungo foi cultivado em meio líquido contendo 2% de quitina coloidal como a única fonte de carbono e nitrogênio houve aumento dos níveis de atividade de Pr1 no meio (DHAR; KAUR, 2010). Diferentemente desse estudo que apresenta os efeitos nos níveis de Pr1 em resposta a diferentes substratos em meio líquido, o presente capítulo compara os efeitos de dois substratos (BDA ou cadáveres de carrapatos) sobre a atividade enzimática de Pr1 no exterior do conídio, revelando uma atividade consideravelmente alta quando os conídios foram cultivados em carrapatos. Dessa maneira também houve uma relação direta entre o substrato e os níveis de Pr1 detectados na superfície conidial. O meio artificial BDA possui níveis de nitrogênio muito baixos em comparação com carrapatos adultos

A confirmação desses dados foi explorada com análises moleculares. Três genes foram usados como genes de referência para analisar modificações na expressão conidial de *pr1* proveniente do meio de cultura artificial (BDA) ou de carrapatos. De acordo com os resultados a expressão do gene *pr1* foi 10 vezes maior em conídios obtidos de carrapatos, corroborando com os resultados bioquímicos. Vale salientar que a mudança de substrato não alterou os níveis de expressão dos genes de referência. (Figura 1).

O presente estudo mostra, pela primeira vez, que conídios de *M. anisopliae* s.l. tem a expressão gênica bem como a atividade enzimática de Pr1 aumentada quando o fungo é cultivado em carrapatos. Um grande arsenal de enzimas ativas tem sido detectado na superfície dos esporos de *M. anisopliae* s.l. (SANTI et al., 2010). Essa diversidade enzimática contribui para a sobrevivência fúngica e sua adequação ecológica podendo estar relacionada à adaptação do fungos a diferentes habitats (SANTI et al., 2010). Contudo, o aumento na atividade enzimática de Pr1 não pode ser associado significativamente ($P \geq 0.05$) a mudanças (aumento ou diminuição) na mortalidade de larvas de *R. microplus*.

É sabido que a virulência de fungos artropodopatogênicos pode ser consideravelmente reduzida após sucessivas passagens em meio artificial (i.e., KAWAKAMI, 1960; FARGUES; ROBERT, 1983). Atualmente não é sabido se essa atenuação na virulência em resposta a múltiplas passagens em meio artificial ocorre em resposta à redução nos níveis de Pr1 em conídios. Os resultados do presente estudo vão, contudo, de encontro com essa possibilidade. Experimentos para identificar outras diferenças entre isolados atenuados e não atenuados são necessários para um melhor esclarecimento.

Embora fosse esperada uma relação entre a atividade enzimática de Pr1 em conídios e a virulência fúngica, os resultados do presente estudo não confirmaram essa hipótese. Apesar dos níveis de Pr1 serem 9 a 10 vezes maiores em conídios produzidos em carrapatos, a menor atividade enzimática detectada foi suficiente para induzir os mesmos níveis de mortalidade larval. Conclui-se que, sob as condições testadas, a virulência de *M. anisopliae* s.l. em carrapatos não está diretamente relacionada aos níveis conidiais de Pr1.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S.B. 1998. **Fungos entomopatogênicos**. In: Alves, S.B. (Ed.), Controle microbiano de insetos. Fundação de Estudos Agrário Luiz de Queirós (FEALQ), Piracicaba, BR, pp. 289-382.
- ANGELO, I.C.; FERNANDES, E.K.K.; BAHIENSE, T.C.; PERINOTTO, W.M.S.; MORAES, A.P.R.; TERRA, A.L.M. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 317-322, 2010.
- BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, p. 512-530, 2009.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Uso do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Arquivo da Universidade Rural do Rio de Janeiro**, v. 15, p. 197-202, 1992.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 16, p. 49-55, 1994.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 17, p. 83-88, 1995.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. 1999. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 29, p. 351-354, 1999.
- CAMARGO, M.G.; GOLO, P.S.; ANGELO, I.C.; PERINOTTO, W.M.S.; SÁ, F.A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 140-147, 2012.
- CAMPOS, R.A.; ARRUDA, W.; BOLDO, J.T.; SILVA, M.V.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L.; SCHRANK, A.; VAINSTAIN, M.H. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. **Current Microbiology**, v. 50, p. 257-261, 2005.
- CASTRO, A.B.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E.; VIEGAS, E.C. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 19, p. 73-82, 1997.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J.K.; BALL, B.V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K.D. Fungal biocontrol of Acari. **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, p. 357-384, 2000.

COSTA, G.L.; SARQUIS, M.I.M.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathology**, v. 154, p. 207-209, 2002.

DHAR, P.; KAUR, G. Cuticle-degrading proteases produced by *Metarhizium anisopliae* and their induction in different media. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 449-455, 2010.

FANG, W.; BIDOCHKA, M.J. Expression of genes involved in germination, conidiogenesis and pathogenesis in *Metarhizium anisopliae* using quantitative real-time RT-PCR. **Mycological Research**, v. 110, p. 1165-1171, 2006.

FARGUES, J.F.; ROBERT, P.H. Effects of passing through scarabeid hosts on virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 576-583, 1983.

FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2008. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, p. 71-93, 2008.

FERNANDES, E.K.K.; KEYSER, C.A.; RANGEL, D.E.N.; FOSTER R.N.; ROBERTS, D.W. CTC medium: A novel dodecane-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, v. 54, p. 197-205, 2010.

FERNANDES, É.K.K.; ANGELO, I.C.; RANGEL, D.E.N.; BAHIANSE, T. C.; MORAES, A.M.L.; ROBERTS, D.W.; BITTENCOURT, V.R.E.P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 307-318, 2011.

FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ROBERTS, D.W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 300-305, 2012.

JOHNS, R.; SONENSHINE, D.E.; HYNES, W.L.. Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, p. 458-464, 1998.

KAWAKAMI, K.. On the changes of characteristics of the silkworm muscardines through successive cultures. **Bulletin of the Sericultural Experiment Station**, p. 83-99, 1960.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

PERINOTTO, W.M.S.; TERRA, A.L.M.; ANGELO, I.C.; FERNANDES, E.K.K.; GOLO, P.S.; CAMARGO, M.G.; BITTENCOURT, V.R.E.P. *Nomuraea rileyi* as biological control agents of *Rhipicephalus microplus* tick. **Parasitology Research**, v. 111, p. 1743-1748, 2012.

QUINELATO, S.; GOLO, P.S.; PERINOTTO, W.M.S.; SÁ, F.A.; CAMARGO, M.G.; ANGELO, I.C.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 556-565, 2012.

ROBERTS, D.W., ST. LEGER, R.J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect pathogenic fungi: mycological aspects. **Advanced and Applied Microbiology**, v. 54, p. 1-70, 2004.

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

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLASER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. S389-S403, 2004.

SAMPAIO, I.B.M., 2002. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, FEPMVZ-Editora, 2002, 265p.

SANTI, L.; SILVA, O.B.; BERGER, M.; GUIMARÃES, J.A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**, v. 55, p. 874-880, 2010.

SASAN, R.K.; BIDOCHKA, M.J. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. **American Journal of Botany**, v. 99, p. 101-107, 2012.

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

SMALL, C.N.; BIDOCHKA, M.J. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. **Mycology Research**, v. 109, p. 307-313, 2005.

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

ST LEGER, R.J.; DURRAND, P.K.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A.K. Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Microbiology**, v. 150, p. 413-416, 1988.

ST LEGER, R.J.; BUTT, T.M.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, v.13, p. 253-262, 1989.

ST LEGER, R.J.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. A model to explain differentiation of appressoria by germilings of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 57, p. 299-310, 1991a.

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

THOMSEN, L.; EILENBERG, J.; ESBJERG, P. Effects of destruxins on *Pieris brassicae* and *Agrotis segetum*. In: Smits, P.H. (ed.) Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes. **IOBC Bulletin**, v. 19, p. 190-195, 1996.

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

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of realtime quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, p. research0034.1-0034.11, 2002.

WAGNER, B.L.; LEWS, L.C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3468-3473, 2000.

WANG, S.; LECLERQUE, A.; PAVA-RIPOLL, M.; FANG, W.; ST. LEGER, R.J. Comparative genomics using microarrays reveals divergence and loss of virulence-associated genes in host-specific strains of the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. **Eukariotic Cell**, v. 8, p. 888-898, 2009.

WYREBEK, M.; HUBER, C.; SASAN, R.K.; BIDOCHKA, M.J. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. **Microbiology**, v. 157, p. 2904-2911, 2011.

ZIMMERMANN, G., 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 879-920, 2007.

CAPITULO III

PERFIL PROTEICO DE OVOS PROVENIENTES DE FÊMEAS DE *Rhipicephalus microplus* EXPOSTAS A *Metarhizium anisopliae* s.l.

RESUMO

A utilização de fungos artropodopatogênicos para controlar carrapatos é considerada uma escolha interessante uma vez que os fungos possuem boa capacidade de dispersão, capacidade de penetrar via cutícula, apresentando também especificidade para diferentes artrópodes, contribuindo assim para a preservação de organismos não-alvo. Elucidar aspectos relacionados a capacidade de resposta dos carrapatos frente à infecção fungica é fundamental para avanços no controle biológico. O presente capítulo objetivou analisar alterações no perfil proteico da postura de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus microplus* tratadas com fungos artropodopatogênicos através da identificação de proteínas relacionados à resposta imune. Fêmeas de *R. microplus* foram expostas ao fungo *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) no primeiro dia após o desprendimento do hospedeiro bovino. O grupo controle foi formado por fêmeas não tratadas. A postura do quinto dia foi analisada em gel de poliacrilamida bidimensional e os spots identificados por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF). Cinquenta e duas proteínas/peptídeos foram identificados nos ovos de *R. microplus*, dentre essas, quatro inibidores de serino proteases (Serpinas) estão possivelmente relacionados a uma resposta adaptativa, já que só foram identificados no gel de ovos do grupo de fêmeas exposto ao fungo. Com os resultados do presente estudo, sugere-se que a resposta imune de carrapatos estende-se além do organismo da fêmea, repercutindo no perfil proteico dos ovos dessas fêmeas. A presença desses peptídeos nos ovos pode ser importante para a adaptação deste estágio evolutivo em um ambiente com a presença de agentes artropodopatogênicos.

Palavras-chave: ovos de carrapato, perfil proteico, Serpinas.

ABSTRACT

The use of arthropodpathogenic fungi to control ticks could be characterized as an interesting approach since these fungi have good dispersal ability, penetrate through host cuticle and also present specificity for different arthropods, contributing to the preservation of non-target organisms. Elucidate aspects about ticks immune response after arthropodpathogenic fungal challenging is critical to reach improvements in biological control. The present chapter aims to analyze changes in the protein profile of eggs from *Rhipicephalus microplus* tick females exposed to *Metarhizium* through the identification of proteins related to the immune response. Tick females were exposed to the fungus *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) on the first day after detachment of bovine host. Control group was formed by untreated females. Eggs from the fifth day of oviposition were analyzed on polyacrylamide 2D gels and spots were identified by mass spectrometry (MALDI-TOF-TOF). Fifty two proteins were identified in *R. microplus* eggs; four serine inhibitors proteases (Serines) are possibly related to an adaptive response, since there were only identified in the gel of eggs from females exposed to fungus. Accordingly, based on the results of the present study, the immune response of ticks possibly extends beyond the body of the female, reflecting in the protein profile of the eggs of these females. It is suggested that the presence of these proteins in eggs would be extremely important for the adaptation of this evolutionary stage in an environment with the presence of arthropodpathogenic agents.

Key-words: tick eggs, protein profile, Serpins

1 INTRODUÇÃO

Muitos aspectos relacionados à infecção de fungos entomopatogênicos em carrapatos não estão completamente elucidados. Informações relacionadas ao processo de infecção fúngica e sua repercussão na fisiologia da fêmea, incluindo a maturação dos oócitos, disponibilização de nutrientes para o embrião, efeito na migração interna de patógenos (viz.: *Babesia* spp.) transmitidos pelo carrapato, e a expressão de proteínas e peptídeos antimicrobianos são exemplos de aspectos que precisam ser explorados para que se possa compreender melhor os efeitos causados por fungos entomopatogênicos e a capacidade do hospedeiro em responder a essa infecção, o que contribuiria para avanço do controle de carrapatos.

A resposta imune dos artrópodes, frente a infecções, pode ser dividida em celular e humoral. A resposta celular está relacionada aos processos de fagocitose, formação de nódulos e encapsulamento. A resposta humoral, em carrapatos, está relacionada principalmente ao encapsulamento humoral, hemaglutinação, fatores de coagulação, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, produção de enzimas e peptídeos antimicrobianos (TAYLOR, 2006). Ao destacar a produção de substâncias antimicrobianas, observa-se que estas são capazes de afetar um grande número de microorganismos. Sabe-se ainda que fatores antimicrobianos podem ser naturalmente expressos (resposta constitutiva) ou transcritos devido ao estímulo provocado por infecção (resposta induzida) e, além disso, são traduzidos e/ou estão presentes em diversos órgãos/estágios dos carrapatos, incluindo ovários e ovos.

Dentre as principais proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana encontrados em carrapatos destacam-se as lisozimas, cistatinas, defensinas, fragmentos de hemoglobina e microplusinas. A microplusina já foi descrita em diversos órgãos e estágios de desenvolvimento de *R. microplus*. Fogaça e colaboradores (2004) identificou este peptídeo na hemolinfa de *R. microplus* e a expressão de seu gene foi reportada em ovários, corpo gorduroso e hemócitos desse carrapato. Esteves e colaboradores (2009) reportaram a presença de microplusina no macerado e na superfície de ovos de *R. microplus*. A microplusina tem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos (ESTEVES et al., 2009) e é expressa na forma de pré-peptídeo com um peptídeo sinal composto de 20 aminoácidos (FOGAÇA et al., 2004).

Outra molécula considerada importante para a resposta imune de artrópode são os inibidores da superfamília das serinas [*serine protease inhibitors (Serpins)*], também chamados serpinas, que participam de uma variedade de funções fisiológicas em diferentes organismos (GETTINS, 2002). Em mamíferos, as serpinas atuam na regulação de importantes funções corporais: como na cascata de coagulação, fibrinólise, digestão, fertilização, e respostas imunes (GETTINS et al., 1996). Em artrópodes, juntamente com os peptídeos antimicrobianos, são consideradas fatores intermediários chave na resposta imune (GORMAN; PASKEWITZ, 2001; ROXSTRÖM-LINDQUIST et al., 2004; ANGELO et al. 2014). De acordo com o estudo feito por Roxstrom-Lindquist e colaboradores (2004) as serpinas podem ser super-reguladas ou sub-reguladas dependendo do tipo de patógeno que acomete o inseto. Neste estudo, as mesmas serpinas super-reguladas em infecções causadas por bactérias, foram sub-reguladas na infecção causada por *Beauveria*, e diferentes tipos de serpinas foram encontradas em infecções provocadas pelos diferentes patógenos.

Não existem, entretanto, estudos relacionados às alterações no perfil protéico da postura de fêmeas de carrapato tratadas com fungos artropodopatogênicos. Sabe-se, contudo, que a eclodibilidade das larvas de *R. microplus* não é prejudicada após a infecção de fêmeas com determinados isolados de *M. anisopliae* s.l. (CAMARGO et al. 2012; PERINOTTO et al. 2012), sugerindo que este artrópode dispõe de mecanismos que possibilitam a manutenção de seus descendentes após a infecção com este artropodopatógeno.

O presente capítulo objetivou destacar as alterações no perfil proteico de ovos de *R. microplus* com ênfase na detecção de peptídeos relacionados à resposta imune desse carrapato frente à infecção pelo fungo artropodopatogênico *M. anisopliae* s.l.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização dos experimentos

O bioensaio foi realizado no Laboratório de controle microbiano de artrópodes de importância médico veterinária (LCM), localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON) da UFRRJ. A eletroforese bidimensional foi realizada no Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteínas (LaMMP) do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As análises proteômicas foram realizadas na Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica (UEMP) do Instituto de Bioquímica Médica (IBqM), UFRJ e no Laboratório de Toxinologia e Proteoma da FIOCRUZ.

2.2 Manutenção da colônia de *Rhipicephalus microplus*

A colônia de *R. microplus* foi mantida na EPPWON, UFRRJ. Dois bezerros foram infestados com aproximadamente 6000 larvas provenientes de 0,3 g de ovos de *R. microplus*. Vinte e um dias após a infestação, as fêmeas totalmente ingurgitadas foram coletadas no chão das baias. No LCM, foram lavadas em água corrente, imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1%, para assepsia da cutícula, e secas em papel toalha estéril. Parte das fêmeas foi utilizada no bioensaio, enquanto a outra parte foi mantida em câmara climatizada, com as mesmas condições de temperatura e umidade descritas acima, para manutenção da colônia.

2.3 Obtenção e manutenção do isolado fúngico

O fungo utilizado no experimento, *M. anisopliae* s.l. isolado CG 148 foi mantido no LCM/UFRRJ. Este isolado foi cedido ao LCM pelo Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), USP, tendo sido isolado de *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidae) na cidade do Rio de Janeiro, RJ.

2.4 Preparo da suspensão de *Metarhizium anisopliae* s.l.

O isolado CG 148 de *M. anisopliae* s.l. foi cultivado em meio BDA (HIMEDIA[®] M 096 Potato Dextrose Agar) e incubado sob temperatura de 25 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$, durante 15 dias.

Para o preparo das suspensões, a superfície da placa de Petri com *M. anisopliae* s.l. foi raspada com auxílio de um cabo e lâmina de bisturi e os conídios suspensos em 20

mL de água destilada estéril e espalhante adesivo Tween 80 0,01%. A suspensão foi quantificada com auxílio da câmara de Neubauer sob microscópio óptico, segundo Alves (1998), e ajustada à concentração 1×10^8 conídios/mL.

2.5 Viabilidade dos conídios

Uma amostra de 10 μ L da concentração de 1×10^8 conídios/mL foi diluída 10 vezes e aplicada sobre uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA para avaliação da viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* s.l. A placa foi incubada a 25 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$. Após 24 horas, foi efetuada a contagem de conídios germinados, através da visualização direta ao microscópio. Trezentos conídios foram contados. Procedeu-se o cálculo de germinação, obtido através da divisão do número de conídios germinados pelo total de conídios contados, e esse resultado foi multiplicado por 100 (ALVES, 1998).

2.6 Infecção das fêmeas de *Rhipicephalus microplus*

Dois grupos (um tratado com *M. anisopliae* s.l. e um grupo controle), contendo 10 fêmeas cada, foram utilizados para o bioensaio. Os grupos eram constituídos por fêmeas com pesos homogêneos. O tratamento consistiu na imersão das fêmeas na suspensão conidial ou em água destilada estéril acrescida de Tween 80 0,01% (grupo controle) por três minutos. Após o tratamento, as fêmeas foram dispostas em placas de Petri e acondicionadas em câmaras climatizadas (27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$, escotofase) para realização da postura. No quinto dia de postura, ovos de cada grupo foram separados e armazenados em tubos de microcentrifugação graduados (1,5 mL) e estocados a - 80°C. A escolha do quinto dia de postura foi feita para que houvesse sincronização entre o processo de infecção fúngica (que no carrapato é mais lento que na maioria das larvas de inseto) e a produção de ovos (que tem seu pico de produção e viabilidade das larvas nos primeiros dias de postura).

2.7 Re-isolamento fúngico

Após o término da postura, amostras de fêmeas tratadas e do grupo controle foram incubadas em câmara úmida e mantidas em temperatura e umidade controladas já descritas, para propiciar a exteriorização fúngica sobre a cutícula das fêmeas. Após sete dias, as colônias fúngicas que cresceram sobre a cutícula dos cadáveres foram semeadas em meio de cultura BDA acrescido de cloranfenicol (0,05%) e incubadas a 25 ± 1 °C e UR 80% durante 15 dias para a identificação das características macromorfológicas do fungo. Posteriormente, foi realizado o microcultivo entre lâmina e lamínula para a identificação das características micromorfológicas do fungo (TULLOCH, 1976). Após 14 dias, foram confeccionadas lâminas temporárias coradas em Lactofenol de Amman com azul de algodão (HAWKSWORTH, 1977) para identificação dos fungos.

2.8 Dosagem de proteínas dos ovos

Para realização das análises, os ovos estocados a - 80°C foram descongelados à temperatura ambiente e macerados. Cem miligramas da postura diária de cada grupo foi retirada e macerada, em gral e pistilo estéreis, com 100 μ L de solução de tampão de lise celular [0,6% de Trishydroxymethylaminomethane (TRIS); 0,2% de Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); 2% de Nonidet P-40; 1% de N-tosyl-L-lysine-chloromethylketone (TLCK); e 1% de Phenylmethylsulphonyl fluoride (PSMF) (RAIA,

2007)]. As amostras foram centrifugadas a $10.000 \times g$ para retirada do material sedimentado.

O conteúdo protéico do homogeneizado foi determinado pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), utilizando albumina sérica bovina como padrão. Para determinação da concentração de proteínas, misturou-se 10 μL de cada amostra (diluída 50 vezes ou 70 vezes para se obter uma média nas medidas) em 190 μL de água destilada com 1,0 mL de solução alcalina [98% de solução alcalina (2% de Na_2CO_3 e 10% de NaOH a 1N); 1% de tartarato de sódio e potássio a 2% (p/v); 1% de sulfato de cobre a 0,1% (p/v)] (preparada no momento do uso). Os tubos foram agitados e permaneceram em repouso por 15 minutos, a temperatura ambiente e no escuro. Em seguida, foi adicionado à mistura 200 μL do reativo de fenol Folin Ciocalteau (Merck®) diluído na proporção de 1,5:0,5 com água destilada (preparado no momento do uso). Agitou-se cuidadosamente o tubo e deixou-se a mistura em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente e no escuro. A leitura das absorvâncias foi realizada em 660 nm. As concentrações de proteína total foram determinadas utilizando uma curva padrão de albumina obtida nas mesmas condições do ensaio.

2.9 Eletroforese bidimensional

A isoeletrofocalização (primeira etapa da eletroforese bidimensional) das proteínas foi realizada no equipamento Protean® IEF Cell (Bio-rad®) em tiras IPG. A faixa de pH utilizada foi a de pH 3 a 10 linear em tiras de 7 cm. Previamente à isoeletrofocalização, as amostras contendo 100 μg de proteína total foram secas em um concentrador e ressuspensas em 125 μL de solução de re-hidratação (uréia 8M, CHAPS 2%, anfólitos 0,2%, DTT 50 mM e azul de bromofenol 0,001%) (Bio-rad®). As amostras foram aplicadas no suporte e em seguida a fita protetora das tiras foi removida. Após, as tiras foram cobertas com 1 mL de óleo mineral (Bio-rad®) e a reidratação realizada a 20 °C durante 12 horas.

Após a isoeletrofocalização, as tiras foram retiradas da cuba, o excesso de óleo mineral removido e a etapa de equilíbrio iniciada. As tiras foram colocadas na placa de incubação com o gel voltado para cima e imediatamente imersas em 1,5 mL do tampão de equilíbrio I (6M de Uréia, 2% de SDS, 0,375M de Tris-HCl pH 8,8, 20% de Glicerol e 130mM de DTT) (Bio-rad®). A placa de incubação foi mantida sob agitação branda por 10 min. Em seguida, o excesso de tampão foi removido e as tiras incubadas em tampão de equilíbrio II (Uréia a 6 M, 2% de SDS, 0,375M de Tris-HCl pH 8,8, 20% de Glicerol e iodoacetamida a 135 mM) (Bio-rad®) por 10 min, sob agitação branda. O excesso de tampão foi retirado e as tiras foram lavadas três vezes em tampão de corrida Tris-Glicina-SDS 1x (Tris 24,7 mM; Glicina 192 mM, pH 8,3).

A segunda dimensão foi conduzida na cuba Mini Protean II (Bio-rad®). Cada tira foi posicionada sobre um gel de separação (SDS-PAGE 15%, 10 cm x 8 cm), realizado de acordo com Laemmli (1970). O padrão de massa molecular (Bio-rad®) foi aplicado em uma tira de papel filtro, posicionada na extremidade esquerda do gel. O espaço vazio foi preenchido com 0,5% de agarose morna e após a solidificação, a corrida foi iniciada mantendo-se a voltagem constante (200 V). Terminada a corrida eletroforética, os géis foram corados com solução de Coomassie coloidal *overnight*. O gel foi descorado com água destilada à temperatura ambiente. A digitalização das imagens foi realizada em

LabScan (versão 3, Amersham Biosciences®), Labscanner Software e o scanner utilizado foi Image Scanner (versão 2, Amersham Pharmacia Biotech®, UK).

2.10 Digestão com tripsina

Os *spots* foram excisados do gel de SDS-PAGE e transferidos separadamente para microtubos de ensaio (1,5 mL). Para a descoloração dos *spots*, foram realizadas 3 lavagens (30 min cada) com 400 µL de solução de NH₄CO₃ a 25mM pH 8,8 em 50% de acetonitrila. Os *spots* foram desidratados por 5 minutos com 200 µL de acetonitrila a 100% e secos em um liofilizador. Foram adicionados 30 µL de solução de rehidratação e digestão contendo NH₄CO₃ 50 mM e 15 µg de tripsina (Promega®), por 20 horas a 37 °C. Após a digestão por tripsina, os peptídeos foram extraídos do gel pela adição de 30 µL de solução contendo ácido trifluoracético 5% e acetonitrila a 50% por 30 min, com agitação, e foram analisados por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF).

2.11 Espectrometria de massas – MALDI-TOF-TOF

A solução de peptídeos extraídos foi homogeneizada na proporção de 1:1 (v/v) com a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Aldrich, Milwaukee, WI) em acetonitrila a 50% e ácido trifluoracético a 0,1% em água. Alíquotas de 8 µL da mistura foram aplicadas sobre uma placa metálica e secas a temperatura ambiente antes da análise no espectrômetro de massas 5800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). O espectrômetro de massas operou com um laser de granada de ítrio e alumínio (YAG), com uma taxa de repetição de 200-Hz. Os mapas de peptídeos foram adquiridos no modo refletivo utilizando-se, aproximadamente, 1600 tiros de laser para os espectros no modo MS e 2400 tiros de laser para os espectros no modo MS/MS. O equipamento foi previamente calibrado com peptídeos de tripsina auto digeridos. Até oito dos mais intensos sinais de íons, com relação sinal-ruído acima de 30, foram selecionados como percursos para a aquisição de dados de MS/MS. A calibração externa no modo MS foi feita usando a mistura de quatro peptídeos: des-Arg1-Bradícinina (m/z=904.468), angiotensina I (m/z=1296.685), Glu1-fibrinopeptídeo B (m/z =1570.677), e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (m/z =2465.199). Espectros do modo MS/MS foram externamente calibrados utilizando-se as massas de íons fragmentados conhecidos observados no espectro MS/MS da angiotensina I.

2.12 Identificação das proteínas

Os dados foram processados utilizando o software Data Explorer (Versão 4.4 Applied Biosystems). As proteínas foram identificadas pela correlação da espectrometria de massas em tandem com dados dos bancos NCBI e MSDB, usando o programa MASCOT (www.matrixscience.com). A primeira análise considerou a pesquisa no banco de dados produzido pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Entomologia Molecular (INCT-EM). Uma ausência de clivagem por peptídeo e $\pm 0,1$ Da de tolerância de massa de peptídeo inicial foram permitidas. Cisteínas foram consideradas sendo carbamidometiladas e a modificação variável de metionina (oxidação) foi permitida.

3 RESULTADOS

3.1 Viabilidade dos conídios utilizados na infecção das fêmeas

Conídios de *M. anisopliae* isolado CG 148 usados no tratamento de fêmeas adultas de *R. microplus* tiveram aproximadamente 99% de germinação após incubação por 24 horas a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR $\geq 80\%$.

3.2 Confirmação da infecção de fêmeas de *Rhipicephalus microplus*

A exteriorização do fungo na cutícula das fêmeas infectadas aconteceu no 14º dia após o tratamento. O fungo foi caracterizado morfológicamente de acordo com Tulloch (1976). As colônias do fungo isolado apresentaram características morfológicas consistentes com as características descritas para fungos do complexo *M. anisopliae*.

3.3 Eletroforese bidimensional

O perfil proteico dos ovos de fêmeas tratadas ou não com o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* s.l. pode ser observado na Figura 1. Foram encontrados 70 *spots* no gel do grupo controle e 67 *spots* no gel de ovos do grupo tratado.

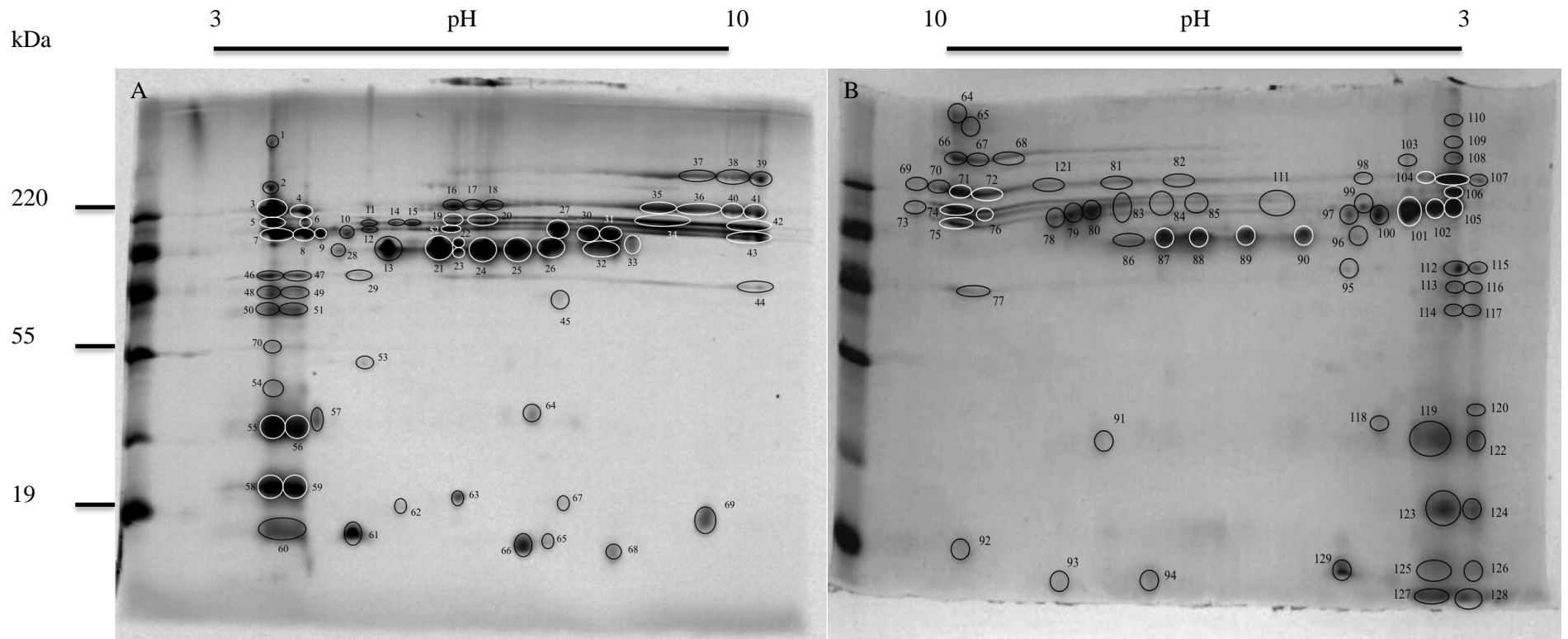


Figura 1. Gel bidimensional de proteínas dos ovos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* expostas ou não ao fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) usando tiras IPG (pH 3-10) e SDS-PAGE 15%. A: ovos do quinto dia de postura do grupo controle (fêmeas não tratadas); B: ovos do quinto dia de postura de fêmeas tratadas com *M. anisopliae* s.l. Os círculos em cada gel representam os spots analisados por MALDI-TOF-TOF.

3.4 Identificação das proteínas

Várias proteínas/peptídeos foram identificadas nos ovos de *R. microplus* no quinto dia de postura das fêmeas (Tabela 1). A tabela 1 foi subdividida em 3 partes. A primeira parte representa as proteínas identificadas somente no gel do grupo controle; a segunda parte representa as proteínas encontradas em ambos os géis, e a terceira parte representa as proteínas identificados nos ovos de fêmeas expostas ao fungo artropodopatogênico.

Para facilitar a visualização geral dos resultados as proteínas identificadas foram caracterizadas em três grandes grupos relacionados a sua função: o grupo estrutural, que contem proteínas e peptídeos relacionados à constituição e estruturação dos tecidos envolvidos; o grupo metabólico, que contem proteínas e peptídeos relacionados a funções como transporte, armazenamento e metabolização energética, ação enzimática entre outros; e o grupo imune, relacionado à resposta imuno-mediada. Um total de 52 proteínas foram identificadas. Foram reportadas dez proteínas com função estrutural, 34 com função metabólica, sete proteínas que podem estar relacionadas à resposta imune (dentre elas cinco Serpinas, que também podem ser relacionadas a atividades metabólicas) e 2 não identificadas. A classificação dessas proteínas foi realizada usando o banco de dados (não publicados) para proteínas e peptídeos de *R. microplus* produzido pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Entomologia Molecular (INCT-EM).

3.5 Proteínas possivelmente relacionadas à resposta imune em ovos de *Rhipicephalus microplus*

Dentre as proteínas identificadas, seis (cinco serpinas e uma microplusina) estão, muito provavelmente, relacionadas com a resposta imune (constitutiva ou adaptativa) deste artrópode.

A serpina RmS-6 (TIRLONI et al., 2014) (número de acesso KC990105 no NCBI) foi identificada em *spots* de ambos os grupos (grupo controle e exposto ao fungo entomopatogênico). Já as serpinas RmS-18 (TIRLONI et al. 2014) (número de acesso KC990117 no NCBI), Rhipi2011-552, Rhipi2011-554, e Rhipi2011-693 (identificação não publicada produzida INCT-EM usando a plataforma Illumina/Solexa), só foram identificadas no gel dos ovos provenientes de fêmeas expostas a *M. anisopliae* s.l. Os *spots* 127 e 128 (Figura 1B) merecem destaque pois sua presença somente pode ser visualizada no gel de ovos do grupo tratado. A serpina RmS-18 foi identificada nesses *spots* (Tabela 1). Esta serpina (RmS-18) também foi identificada nos spots 115, 116, 120 e 122 (Figura 1).

Além das serpinas, uma microplusina [Rhipi2011-941 (identificação não publicada produzida pelo INCT-EM usando a plataforma Illumina/Solexa) foi identificada na postura do grupo controle, mas não nos ovos do grupo tratado.

Tabela 1. Identificação das proteínas encontrados nos géis bidimensionais de ovos de *Rhipicephalus microplus* após exposição das fêmeas à suspensão aquosa de Tween a 0,01% (grupo controle) ou suspensão fúngica de *Metarhizium anisopliae* s.l.

Proteínas identificados nos ovos provenientes de fêmeas não expostas ao fungo

<i>Spot</i>	Proteína	Função	Massa molecular (Da)	Score	Peptídeos	cover (%)
7	Rhipi2011-11024 Germ-line stem cell division protein Hiwi-Piwi; negative developmental regulator	Metabólica	43103	20	R.ETEMLMVFPNNR.K	3
13, 30, 31	Rhipi2011-7041 smooth muscle myosin heavy chain 11 isoform SM1-like, isoform CRA_a	Estrutural	21781	31	K.DEIDALR.H	3
21	Rhipi2011-12247 C2H2-type Zn-finger protein	Metabólica	29983	34	K.IISSASNLR.Q	3
33	Rhipi2011-1266 Adaptor complexes medium subunit family	Metabólica	50138	24	K.VSTLDDPTR.S	2
8	Rhipi2011-13656 Nucleoside transporter	Metabólica	27751	27	YFVYLEQR.T	3
58.59	Rhipi2011-2277 Fibrillins	Estrutural	49214	43	K.ASDPASLHR.E	2
27	Rhipi2011-4893 Transcription initiation factor IIF	Metabólica	40442	28	K.GVEDEDALR.A	2
33	Rhipi2011-659 secreted salivary gland peptide, putative	Metabólica	15582	34	R.GGASGHNQGSFAGGSSNR. N	12
63C	Rhipi2011-941 Antimicrobial peptide microplusin	Imune	13299	64	K.AWLMLR.N R.REFWEIAK.K	12

Tabela 1: continuação

20	Rm-160808 hypothetical protein IscW_ISCW024663	Metabólica	28903	24	R.QSCGRYR.G	2
43	Rm-170142 Hypothetical secreted protein precursor	Metabólica	11088	25	R.KEVICDIVFSQR.K	13
55, 56	Rm-46808 Hypothetical secreted protein precursor	Metabólica	7144	31	K.RANGVVADR.R	14
23, 27	Rm-6576 multiple coagulation factor deficiency 2 - carboxylic acid metabolic process - vesicle- mediated transport - protein transport - Golgi apparatus	Metabólica	17455	28	K.WDATELIR.D	5
34	Rm-85568 Hypothetical secreted protein precursor - signalP detected	Metabólica	14604	29	R.FHITWVIPQDKVR.Q	10
68C	Rm-9067 Conserved plasma membrane protein - 2 predicted membrane helices - Membrane anchor detected	Estrutural	14568	27	R.NVLSDFNMSCDDGGR.L	11

Tabela 1: continuação

Proteínas identificadas nos ovos de fêmeas expostas ou não ao fungo

5, 16, 17,18, 20, 35, 36, 40, 41, 52, 53, 58, 71, 72, 75, 64T, 65T, 67T, 70T, 81, 81, 97, 99, 100, 101, 102, 105, 106 121, 129	Rm-12079 vitellogenin-2 precursor	Metabólica	217977	455	R.AHYPTVR.Q R.VVLELPR.E K.GNNTVLPR.S K.WVHPVSAR.Y R.SLFYGLEFTK.G K.TPVYEELFEK.A K.NDVGDSFLTVR.Y K.VSDLYDDVVSRI R.RSEYEDDSYYSK.R K.SAKPSPFTTYATR.K K.ATHATGEEVYGYLK.V K.LLPTVTGYPVALTTR.Y R.HAVDEPEFYVLYEQR.S K.YLGVGVEVTGLTSEPR.K K.ATGFLPPVLEHHEVLNK.V K.VVTIEAPVDLPEPVVNL.YR.G R.SVALSLLLLTQPTEPVLAR.V R.ALRPVAYDMTTQAVGLAR. K K.HAAVTQAVLVQPVLQAVYF DKDEDYELR.S	18
--	-----------------------------------	------------	--------	-----	--	----

Tabela 1: continuação

3, 4, 34, 37, 38, 39, 42, 72, 74, 64T, 65T, 66T, 67T, 68T, 76, 77, 83, 84, 104, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 115, 121	Rm-2788 vitellogenin	Metabólica	202423	544	R.HEYPTR.H K.LYQQPSER.M K.HLLPYESVER.L K.YEHNLDFLAK.T K.FVEYLTHHTATK.Q K.QQVLSLYDATR.L K.YPTHHEYPTR.H K.VSSSGPVTTHLVR.V R.HEYPPTHHEYPTR.H K.YLVPNLVLSGLDR.L K.KPLGYESSYPTHR.E R.GVVFVHLDALNVGPR.Y K.FLAEVFSTYGPSTLR.S K.HDFAVVAQPLDLTVGTK.K K.TDVNPYVTVAHGELLLPGEK. V K.VYTPTKPLAYDESQETPYER. M	15
3, 66, 104, 106, 107, 109, 121	Rhipi2011-663 Amelogenins	Estrutural	21837	104	R.EYPTHR.R K.KPLGYESSYPTHR.E	10
13, 22, 25, 26, 30, 33, 79, 90	Rhipi2011-11634 cytochrome c oxidase subunit Va	Metabólica	17666	28	K.DIDGWEIR.K	5
29, 95	Rhipi2011-2738 SERine Proteinase INhibitors (Serpins) (ou RmS-6, TIRLONI et al. 2014)	Metabólica /Imune	44279	204	K.VLELPYR.D R.EAFALQNNR.L R.LYVSDVLQR.A	14

Tabela 1. continuação

					K.LFHEPLETNR.L R.AVVEVNEEGTEAAAVTGVIG VNR.I	
5, 7, 8, 9, 10, 58, 59, 73, 99, 103, 108, 110, 123, 124	Rhipi2011-519 Predicted splicing factor, SR protein superfamily	Metabólica	66216	193	K.ESTHVLLR.H K.VDSPLYDDVVSRI R.HAVDEPEFYVLYEQR.S	6
20, 43, 75, 101, 102	Rhipi2011-581 WASP-interacting protein VRP1- WIP, contains WH2 domain	Estrutural	115842	687	R.AHYPTVR.Q K.ESTHVLLR.H K.WVHPVSAR.Y K.SAKPSPFTTYATR.K K.AVYGHFVYGTSFK.T K.LLPTVTGYPVALTTR.Y R.HAVDEPEFYVLYEQR.S K.YLGVGVEVTGLTSEPR.K R.KLLPTVTGYPVALTTR.Y K.TMTYTTPAFFFTATQR.S K.ATGFLPPVLEHHEVLNK.V R.ALRPVAYDMTTQAVGLAR. K	14
46, 47, 72, 85	Rhipi2011-653 RNA polymerase II, large subunit	Metabólica	96264	126	K.LYQQPSER.M K.YLVPNLVLSGLDR.L	2
2, 110	Rhipi2011-664 Amelogenins	Estrutural	21394	82	R.HEYPTR.H K.YPTHHEYPTR.H	9
13, 25, 79	Rm-17546 Tnf receptor-associated factor	Estrutural	33942	39	K.VQEMVSLLR.A	3

Tabela 1. continuação

13, 21, 23, 27, 31, 32, 89, 90	Rm-18332 mitochondrial electron transport NADH to ubiquinone - NADH	Metabólica	14672	39	R.SMERDAILR.R	7
55, 56, 119, 122	Rm-47249 cuticular protein 21 - signalP detected	Extrutural	46462	181	R.LMSVLVGPEDVVS.R	3
5, 58, 59, 106, 123, 124	Rm-5009 hypothetical protein		31709	30	K.FCEKQDDVWR.L	3
13, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 78, 79, 80, 83, 84, 86, 87, 88, 89, 90, 96	Rm-849 yolk cathepsin - signalP detected	Metabólica	42147	201	R.RVYTIFK.T K.TGIFLWDK.Q K.QLAFAYTRPIVY. K.SHYEGELTYTQSATDEWLIR. L	12
<u>Proteínas identificadas somente nos ovos de fêmeas expostas ao fungo</u>						
67	Rm-78205 5' nucleotidase	Metabólica	51995	28	R.EECGVPR.D R.YEPLDAR.Q	3
113, 117	Rhipi2011-1350 Cathepsin_D_like	Metabólica	20253	97	K.ATPGGEIYFGGINSNR.Y	8
113,114,116	Rhipi2011-1351 Eukaryotic aspartyl protease	Metabólica	41797	187	K.ISFTIGGR.E R.ATEEPSGDWR.V K.ATPGGEIYFGGINSNR.Y	9
111,115,116	Rhipi2011-16017 Predicted metalloendopeptidase	Metabólica	32928	31	R.KMGLYPAVALR.C	3
112	Rhipi2011-16535 keratinocyte transglutaminase, putative	Metabólica	28626	23	R.LAVTCTNQSCTPR.K	5

Tabela 1. continuação

115.116	Rhipi2011-1890 Predicted E3 ubiquitin ligase	Metabólica	40715	29	R.QLYDENIALR.S	2
119	Rhipi2011-2165 actin	Estrutural	42166	97	K.SYELPDGQVITIGNER.F	4
112	Rhipi2011-2841 glycine decarboxylase	Metabólica	47593	26	K.KATGVEAMDIAK.R	2
99, 100	Rhipi2011-460 Beta-glucoerebrosidase	Metabólica	63108	107	K.FLPSATVR.I R.FLQEYGNHGIR.F	3
120	Rhipi2011-552 serine proteinase inhibitor, putative	Metabólica /Imune	81094	104	R.FFYNTLTK.T R.GNANNFETLR.Q R.AHAILWAYDPK.V	3
94	Rhipi2011-554 serine proteinase inhibitor	Metabólica /Imune	59165	92	K.KVFGVVPR.A R.FFYNTLTK.T	3
125	Rhipi2011-693 Kunitz-type serine protease inhibitor 6	Metabólica /Imune	48230	67	R.WWFNVK.T R.FFYNTETK.K	3
113, 114, 116, 117	Rhipi2011-722 Eukaryotic aspartyl protease	Metabólica	40817	111	K.SFPLQGEAYTIR.I	3
125	Rhipi2011-7710 Breast carcinoma amplified sequence 2 (BCAS2)	Metabólica	30156	33	K.TTQTEAGEKLLK.H	4
113	Rhipi2011-9690 Nuclear envelope protein lamin, intermediate filament superfamily	Estrutural	28794	33	R.LASYLDKVR.A	3

Tabela 1. continuação

77, 81, 103, 104, 109, 110, 111, 114, 115, 116, 120, 121, 122, 125, 127, 128, 129	Rm-14978 Tick_serpins_32 (ou RmS-18, TIRLONI et al. 2014)	Metabólica /Imune	31077	30	K.TVALSLPR.F	2
120	Rm-16098 tick_Kunitz_110	Metabólica /Imune	17501	34	R.FFYNTETK.K	5
71	Rm-164507 Hypothetical secreted protein precursor	Metabólica	5810	21	K.SNLILQGQALLVSLVPSR.R	38
111, 115, 116	Rm-33359 hypothetical protein IscW_ISCW021732	Metabólica	14266	37	K.KLTAMESVALR.R	9
128	Rm-3924 intracellular - transport - transporter - vitamin E binding - retinal binding	Metabólica	36121	24	K.FDVDGALQTIR.N	3
88	Rm-45869 Hypothetical secreted protein precursor	Metabólica	6977	20	R.SHMGHYMRGGR.T	19
78	Rm-57277 Protein tyrosine kinase st KOG 0 26.45	Metabólica	12686	26	MHASKLSR.L	7
116, 120, 127	Rm-9305 Unknown product		14705	22	R.QEQSTSPFLNNDSTR.L	12

4 DISCUSSÃO

Em insetos, alguns representantes da classe das serino-peptidases e serpinas (ou inibidores de serino peptidases), potencialmente envolvidos com a ativação do sistema imune de flebotômíneos, foram identificados (PITALUGA et al., 2009). Esta cascata proteolítica é responsável pela ativação das vias endógenas de sinalização imunológica caracterizando-se uma resposta fundamental no processo de defesa dos insetos. As serpinas também podem ser encontradas em diversos tecidos e estágios de desenvolvimento do carrapato dos bovinos (TIRLONI et al., 2014; TIRLONI, 2012), o que sugere sua participação na modulação das respostas do hospedeiro bovino, bem como traduz sua importância nos processos fisiológicos e patológicos do próprio carrapato, incluindo resposta a infecções causadas por micro-organismos.

Angelo et al. 2014 analisaram hemócitos de *R. microplus* infectados com fungos entomopatogênicos e sugeriram redução nos níveis de expressão de serpinas nessas células em decorrência da infecção fúngica. O mesmo não aconteceu quando fêmeas de *R. microplus* foram inoculadas com um fungo não artropodopatogênico (*Fusarium oxysporum*). Contrariamente, quando somente o plasma da hemolinfa de fêmeas infectadas foi analisado (ANGELO, 2011) houve detecção de determinadas serpinas (não identificadas no grupo controle), sugerindo a expressão de determinados genes em resposta a infecção. Dessa maneira, a regulação das serpinas (tanto supra-regulação, quanto sub-regulação) pode acontecer ao mesmo tempo em diferentes tecidos do carrapato.

No presente capítulo reportou-se a presença de serpinas nos ovos de *R. microplus*. Quatro serpinas foram identificadas nos ovos das fêmeas no quinto dia de postura. Parte delas só foram identificadas nos ovos de fêmeas expostas a *M. anisopliae* s.l., sugerindo uma resposta adaptativa dessas fêmeas que repercutiu diretamente no perfil proteico dos ovos das mesmas. Por exemplo, os *spots* 127 e 128 não aparecem no gel do grupo controle (Figura 1) e a serpina RmS-18 foi identificada nesses *spots*, evidenciando a produção de novas proteínas possivelmente em resposta à infecção fúngica. Apesar dos *spots* 125 e 94 (onde as serpinas Rhipi2011-693 e Rhipi2011-554 foram identificadas – Tabela 1) possuírem *spots* homólogos no gel do grupo controle (Figura 1) não foi possível identificar serpinas nos *spots* do grupo controle.

Estudos realizados no LCM da UFRRJ mostraram que a eclosão de larvas provenientes de ovos de fêmeas tratadas com suspensões de *Metarhizium* spp. é relativamente elevada (CAMARGO et al. 2012; PERINOTTO et al. 2012). Ou seja, quando o fungo não é virulento o bastante para matar a fêmeas de carrapato em poucos dias e as mesmas conseguem ovipor, esses ovos são capazes de gerar larvas infestantes. Dessa maneira, o objetivo do presente capítulo foi investigar os possíveis mecanismos que possibilitam essa eclosão larval através da análise do perfil proteico dos ovos de fêmeas tratadas comparando-o com o perfil proteico de ovos de fêmeas não expostas ao fungo.

Os resultados do presente capítulo sugerem que o carrapato tem a capacidade de responder à infecção fúngica, através da ativação de genes que resultarão na tradução de determinadas proteínas (como as Serpinas encontradas somente no grupo tratado). Além disso a hipótese de que o fungo entomopatogênico também pode influenciar na resposta imune e modular processos fisiológicos do artrópode é reforçada pela ausência do peptídeo antimicrobiano microplusina no macerado de ovos do grupo tratado, peptídeos este que pode ser identificado no macerado de ovos do grupo controle (Tabela 1).

Apesar da vulnerabilidade de ovos de carrapatos a patógenos, devido a sua imobilidade, estudos relacionados à resposta imune deste artrópode estão focados principalmente nos estágios de ninfa e adulto (TAYLOR, 2006; SONENSHINE; HYNES, 2008; ANGELO et al., 2010). Alguns estudos, entretanto, reportam atividade antimicrobiana

na superfície e no macerado de ovos de carrapatos. Estudos realizados com o argasídeo *Ornithodoros moubata*, (NAKAJIMA et al., 2002) e com o carrapato do gado africano, *Amblyomma hebraeum* (ARRIETA et al., 2006), também demonstraram atividade antimicrobiana na postura. Já Esteves e colaboradores (2009) reportaram atividade antimicrobiana do macerado e superfície de ovos de *R. microplus* contra *C. albicans*, identificando o peptídeo responsável pela inibição, a microplusina. Estes autores analisaram a expressão do gene da microplusina e reportaram que os maiores níveis de transcrição de RNA aconteceram em dois momentos: logo antes do início da postura (3 dias após a queda do carrapato do hospedeiro) e logo antes do início da eclosão das larvas (com início de aumento nove dias após o início da oviposição). Ainda segundo Esteves e colaboradores (2009), o período entre esses dias foi marcado por uma drástica redução nos níveis de transcrição do gene da microplusina. No presente estudo, entretanto, houve detecção deste peptídeo, no quinto dia após o início da postura. Sugere-se que a variação na cepa da colônia de carrapatos [a cepa utilizada por Esteves e colaboradores (2009) não foi a mesma utilizada no presente estudo] pode ser uma possível explicação para a manutenção nos níveis de expressão desse peptídeo.

A determinação das diferenças no perfil proteico dos ovos de fêmeas tratadas com *M. anisopliae* s.l., enfocando proteínas que podem estar relacionadas à resposta imune do carrapato, auxilia no melhor entendimento da capacidade do hospedeiro (neste caso o carrapato) em responder a infecção fúngica. A partir do presente estudo, observou-se que a resposta imune pode estender-se além do organismo da fêmea, repercutindo no perfil proteico dos ovos dessas fêmeas.

REFERÊNCIAS

ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

ANGELO, I.C.; GOLO, P.S.; CAMARGO, M.G.; KLUCK, G.E.G.; FOLY, E. BITTENCOURT, V.R.E.P. Haemolymph protein and lipid profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infected by fungi. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, n. 1-2, p. 79-83, 2010.

ANGELO, I.C. **Avaliação dos perfis protéico e lipídico na resposta de *Rhipicephalus microplus* à infecção com fungos**. 2011. 143p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

ANGELO, I.C.; GOLO, P.S.; PERINOTTO, W.M.S.; CAMARGO, M.G.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; CAMPANHON, I.B.; BRAZ, G.R.C.; SOARES, M.R.; FOLLY, E.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Detection of serpins involved in cellular immune response of *Rhipicephalus microplus* challenged with fungi. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, p. 351-360, 2014.

ARRIETA, M.C.; LESKIW, B.K.; KAUFMAN, W.R. Antimicrobial activity in the egg wax of the African cattle tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 39, n. 3-4, p. 297-313, 2006.

CAMARGO, M.G.; GOLO, P.S.; ANGELO, I.C.; PERINOTTO, W.M.S.; SÁ, F.A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 140-147, 2012.

ESTEVEES, E.; FOGAÇA, A. C.; MALDONADO, R.; SILVA, F.D.; MANSO, P.P.A.; PELAJO-MACHADO, M.; VALLE, D.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, n. 8, p. 913-919, 2009.

FOGACA, A.C.; LORENZINI, D.M.; KAKU, L.M.; ESTEVES, E.; BULET, P.; DAFFRE, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of three cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 3, p. 191-200, 2004

GETTINS, P.G.W.; PATSON, P.A.; OLSON, S.T. **Serpins: structure, function and biology**. Ed Springer, New York. 1996.

GETTINS, P.G. Serpin structure, mechanism, and function. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4751-4804, 2002.

GORMAN MJ, PASKEWITZ SM. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 257–262, 2001.

HAWKSWORTH, D.L. **Micologist's handbook**. 2^aed. England, Kew Surrey: CAB Press, 1977. 231p.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

NAKAJIMA, Y.; VAN DER GOES VAN NATERS-YASUI, A.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. Antibacterial peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros moubata*. **Insect Molecular Biology**, v. 11, n. 6, p. 611-618, 2002.

PERINOTTO, W.M.S.; ANGELO, I.C.; GOLO, P.S.; CAMARGO, M.G.; SA, F.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 257-260, 2012.

PITALUGA, A.N.; BETEILLE, V.; LOBO, A.R.; ORTIGÃO-FARIAS, J.R.; DAVILA, A.M.R.; SILVA, A.A.; RAMALHO-ORTIGÃO, J.M.; TRAUB-CSEKO, Y.M.; EST sequencing of blood-fed and Leishmania-infected gut of *Lutzomyia longipalpis*, the principal visceral leishmaniasis vector in the Americas. **Molecular and General Genetics**, v. 282, p. 307-317, 2009.

ROXSTROM-LINDQUIST, K.; TERENIUS, O.; FAYE, I. Parasite-specific immune response in adult *Drosophila melanogaster*: a genomic study. **EMBO Reports**, v. 5, p. 207-212, 2004.

SONENSHINE, D.E.; HYNES, W.L. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 18, p. 7046-7063, 2008.

TAYLOR, D. Innate Immunity in Ticks: A review. **Journal of the Acarological Society of Japan**, v. 15, n. 2, p. 109-127, 2006.

TIRLONI, L. **Identificação e caracterização de inibidores de serino-endopeptidases (serpinas) em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*** 2012. 114p. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

TIRLONI, L.; SEIXAS, A.; MULENGA, A.; VAZ JR, I.S.; TERMIGNONI, C. A family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Experimental Parasitology**, v.137, p. 25-34, 2014.

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

CAPITULO IV

COLONIZAÇÃO ENDOFÍLICA DE ISOLADOS DE *Metarhizium* spp. EM *Vigna unguiculata* E *Cucumis sativus*

RESUMO

O sucesso na utilização clássica de fungos entomopatogênicos no controle biológico de artrópodes depende de diversos fatores, principalmente os fatores abióticos como alta incidência de raios solares, altas temperaturas e baixa umidade. Associações endofíticas de outros fungos entomopatogênicos, que não *Metarhizium* spp., vem sendo reportadas como uma alternativa promissora à utilização clássica desses fungos objetivando o controle de insetos praga. No presente estudo foram reportadas, pela primeira vez, associações endofíticas entre *Metarhizium robertsii* e *Metarhizium acridum* em feijões *cowpea* (*Vigna unguiculata*) e pepino (*Cucumis sativus*). Destruixinas A, B, e E foram detectadas em feijões *cowpea* colonizados por *M. robertsii* ARSEF 2575 12 dias após a inoculação do fungo em sementes. Destruixinas não foram detectadas em pepino. A germinação de fungos entomopatogênicos após aplicação foliar em feijões *cowpea* também foi analisada por microscopia eletrônica e microscopia óptica de fluorescência. Foi observada a formação de apressório pelo isolado ARSEF 1095 de *Metarhizium brunneum* 72 horas após aplicação foliar. Este é o primeiro exemplo de a) detecção de destruxinas em plantas endofiticamente colonizadas por *M. robertsii* isolado ARSEF 2575; e b) re-isolamento fúngico após inoculação em sementes e aplicação foliar em *V. unguiculata*; Esta descoberta tem implicações positivas para novas abordagens e avanços no controle biológico a base de fungos entomopatogênicos de artrópodes pragas.

Palavras-chave: fungos endofíticos, plantas, destruxinas.

ABSTRACT

Successful biological control of arthropods using entomopathogenic fungi depends on several factors, mainly abiotic ones such as high incidence of sunlight, high temperatures and low humidity. Endophytic associations of entomopathogenic fungi, but *Metarhizium* spp., have been reported as a promising alternative to the classical use of these fungi to control insect pests. The present study reported for the first time endophytic associations between *Metarhizium robertsii* and *Metarhizium acridum* in cowpea beans (*Vigna unguiculata*) and cucumber (*Cucumis sativus*). Destruxins A, B, and E were detected in cowpea beans colonized by *M. robertsii* ARSEF 2575 12 days after fungal inoculation in the seeds. Destruxins were not detected in cucumber. Germination of entomopathogenic fungi after foliar application was also analyzed by electron scanning microscopy and optical fluorescence microscopy. Appressorium formation by *Metarhizium brunneum* ARSEF 1095 was observed 72 hours after foliar application. This is the first report of a) destruxins detection in endophytic *M. robertsii* ARSEF 2575-colonized plants; and b) re-isolation after exposure of fungus to *V. unguiculata* seeds and foliar application on *cowpea* beans; These findings have positive implications for new approaches and advances in the biological control of arthropod pests using entomopathogenic fungi.

Key-words: endophytic fungi, plants, destruxins.

1 INTRODUÇÃO

O controle clássico de insetos praga utilizando fungos entomopatogênicos se dá pela aplicação direta do fungo (na maioria das vezes conídios formulados) nas plantações onde as pragas se desenvolvem. O sucesso da aplicação direta do produto na lavoura, com o objetivo atingir o inseto com consequente desenvolvimento e multiplicação do fungo no artrópode causando a sua morte, encontra uma série de entraves. Dentre eles diversos fatores abióticos (i.e.: baixa umidade, alta incidência de raios solares, chuvas, e altas temperaturas) com efeitos negativos no desenvolvimento do fungo entomopatogênico.

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* também é conhecido por sua capacidade endofítica e pôde ser encontrado colonizando naturalmente plantas (VEGA et al. 2008). Este fungo também tem sido isolado de diversas culturas agrícolas como banana, feijão, café, milho, algodão, tomate e trigo após inoculação artificial (GURULINGAPPA et al., 2010). Num estudo feito em 1991, Bing e Lewis (1991) reportaram que o tunelamento em plantas de milho, causado por larvas *Ostrina nubilalis* (a broca Européia do milho), foi reduzido quando as plantas foram endofiticamente colonizada por *B. bassiana*. Embora, a esmagadora maioria dos trabalhos sobre fungos entomopatogênicos e insetos discutam a redução dos danos causados por insetos através da morte desses artrópodes em decorrência de infecção fúngica direto por conídios, Vega e colaboradores (2008) sugeriram que essa supressão de danos causados por insetos em resposta à colonização de *B. bassiana* na planta poderia ser o resultado de inibição alimentar, ou efeito fagodepressivo. Tal efeito estaria relacionado com a produção de metabólitos secundários. Mais recentemente, Gurulingappa e colaboradores (2010) estudaram o efeito de fungos com capacidade endofítica (*B. bassiana*, *Lecanicillium lecanii* e *Aspergillus parasiticus*) sobre a reprodução e o crescimento de *Aphis gossypii* (pulgão do algodoeiro) e *Chortoicetes terminifera* (gafanhoto). Eles relataram que a presença desses endófitos reduziu significativamente a reprodução do pulgão e taxa de crescimento de gafanhotos; entretanto não foi observada mortalidade direta dos insetos.

Desde 1961, quando Kodaira caracterizou pela primeira vez as destruxinas (metabólitos secundários produzidos por *Metarhizium* spp.), estes compostos foram classificados como moléculas com atividade inseticida. Algumas das propriedades mais interessantes das destruxinas, que hoje possuem aproximadamente 39 análogos descritos (LIU; TZANG, 2012), são o efeito fagodepressivo, toxicidade por contato e efeito repelente (AMIRI et al., 1999). Amiri e colaboradores (1999) reportaram que quando destruxinas foram aplicadas sobre discos de folha de couve houve redução significativa da alimentação das larvas *Plutella xylostella* (um espécie de traça) e *Phaedon cochleariae* (uma espécie de besouro). Esses autores também mostraram o efeito tóxico das destruxinas quando em contato com esses insetos. Além desses autores, Thomsen e colaboradores (1996) mostraram que larvas *Agrotis segetum* (lagarta-rosca) foram repelidas por destruxinas adicionadas em sua dieta alimentar.

Até o presente momento, não se sabe profundamente sobre a capacidade endofítica de *Metarhizium* spp. Estudos que relatam o desenvolvimento de *Metarhizium robertsii* na rizosfera de plantas e no interior de raízes destacando o papel benéfico que o fungo tem em relação ao desenvolvimento da planta, além da descoberta da participação de *Metarhizium anisopliae* na translocação de nitrogênio do inseto infectado para a planta, foram publicados recentemente (ST LEGER 2008; WYREBEK et al., 2011; BEHIE et al., 2012; SASAN; BIDOCHKA 2012). Akutse e colaboradores (2013) não obtiveram sucesso no re-isolamento de *M. anisopliae* em *Vicia faba* (fava) e *Phaseolus vulgaris* (feijão -comum).

O presente capítulo objetivou estabelecer, pela primeira vez, a colonização endofítica de espécies de *Metarhizium* em *Vigna unguiculata* (feijão fradinho) e *Cucumis sativus* (pepino) através de inoculação em sementes além de verificar a produção dos metabólitos

secundários destruxina A, B, e E em feijão e pepino após inoculação do fungo em sementes; e determinar se há germinação e penetração de *Metarhizium brunneum* após aplicação foliar.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e período de execução dos experimentos

Os experimentos com sementes de feijão e pepino foram realizados na Utah State University, Departamento de Biologia, Logan, UT, EUA, no laboratório do Dr. Donald W. Roberts. A detecção de destruxinas foi realizada no Poisonous Plant Research Laboratory, Serviço de Pesquisa Agrícola, USDA, Logan, Utah. O período de realização destes experimentos se deu entre os meses de Fevereiro a Julho de 2013.

Os experimentos de inoculação de folhas de feijão foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária (UFRRJ) e no Laboratório de Patologia de Invertebrados (UFG). Os experimentos de microscopia de varredura foram realizados no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic), na UFG. Os experimentos com microscopia de fluorescência foram executados no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão, Goiás. Estes experimentos foram realizados de Março a Maio de 2014.

2.2 Isolados fúngicos utilizados

Os isolados de *M. robertsii* (ARSEF 2575), *M. brunneum* (ARSEF 1095), isolado comercial também conhecido como F52, e o isolado de *Metarhizium acridum* (ARSEF 324) foram obtidos da Agriculture Research Service Collection of Entomopathogenic Fungi (ARSEF), Laboratório de Plantas, Solo e Nutrição (Ithaca, NY, EUA).

2.3 Experimentos de inoculação fúngica em sementes de *Vigna unguiculata* e *Cucumis sativus*

2.3.1 Inoculação dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium robertsii* e *Metarhizium acridum* em sementes de feijões e pepinos

Sementes de feijão tipo *cowpea* ou fradinho (*V. unguiculata*) (sementes orgânicas Shangri-la Health Foods, Lofan, UT, EUA) e pepino (*C. sativus*) (sementes orgânicas Straight Eight, Snow Seeds, Salinas, CA, EUA) foram pesadas individualmente e somente as que pesavam entre 0.2500g e 0.2599g (feijão), e 0.0240 e 0.0249g (pepino) foram utilizadas. As sementes foram esterilizadas superficialmente: imersão em etanol 95% por 2 minutos, rinsadas em água destilada estéril, seguido por imersão em peróxido de hidrogênio a 30% por 1 minuto e imersas 3 vezes em água destilada estéril (PAVA-RIPOL et al., 2011). Após esterilização superficial, as sementes foram submetidas a uma temperatura de 4°C *overnight* para sincronização da germinação.

Após sincronização, 13 sementes foram imersas em suspensão fúngica (1×10^6 conídios/mL) de *M. robertsii* ARSEF 2575 ou de *M. acridum* ARSEF 324 por 1 hora (SASAN; BIDOCHKA, 2012), isolados com diferentes perfis de produção de destruxina *in vitro*. A viabilidade das suspensões fúngicas foi verificada em meio BDAL após 18 h de cultivo. As sementes do grupo controle foram imersas em solução de Tween 80 a 0,01% por 1 hora. Após imersão em suspensão fúngica ou água, as sementes foram alocadas individualmente em placas de Petri (polipropileno, 90 × 15 mm, Fisherbrand®) com papel filtro umedecido com água destilada estéril a cada dois dias. As placas foram incubadas em câmara climatizada a 25°C com fotoperíodo (16h luz/8h escotofase).

2.3.2 Re-isolamento fúngico

Após 12 dias de crescimento (Figura 1), a ausência ou presença fúngica (*M. robertsii* ou *M. acridum*) em plantas, foi confirmada pela cultura de partes das plantas (raízes, caules e folhas) em meio artificial batata dextrose ágar (BDA) acrescido de cloranfenicol a 0,05% após esterilização superficial. A esterilização superficial das folhas, caules e raízes foi feita pela imersão em hipoclorito de sódio a 0.5% por 2 minutos, seguida de imersão em etanol a 70% por 2 minutos. As partes das plantas foram então rinsadas em água destilada estéril 3 vezes. A parte externa das folhas foram dissecadas e descartadas (PARSA et al., 2013). As partes restantes foram cortadas e cultivadas em BDA suplementado com cloranfenicol a 0,05%. Cinquenta microlitros da água presente nas placas onde as partes das plantas foram rinsadas foram inoculadas em meio BDA para verificação da eficácia da esterilização superficial.

Um mínimo de cinco placas contendo folhas, caules ou raízes dos grupos expostos ao isolado de *M. robertsii*, *M. acridum*, ou plantas não infectadas, foram incubadas em escotofase a 28°C. As placas foram examinadas diariamente durante 14 dias e fungos crescidos dos tecidos das plantas foram transferidos e caracterizados morfolologicamente de acordo com Tulloch (1976). Os experimentos foram realizados três vezes.

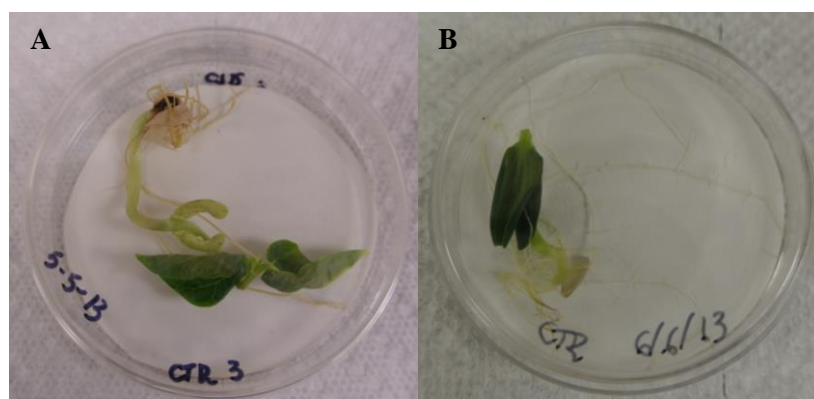


Figura 1. Estágio e condições de desenvolvimento de (A) *Vigna unguiculata* e (B) *Cucumis sativus* em laboratório após 12 dias de crescimento.

2.3.3 Detecção de destruxinas *in planta* após inoculação de *Metarhizium spp.*

Após 12 dias de crescimento em placas de Petri e papel filtro umedecido, 10 plantas de cada tratamento foram congeladas utilizando nitrogênio líquido e trituradas em gral e pistilo. Padrões puros de destruxinas (A, B e E) foram adicionados ao grupo controle (controle positivo) para verificar a acurácia da extração. Cinco mL de metanol foram adicionados às plantas trituradas seguido por 15 mL de água ultra pura. As suspensões das plantas foram filtradas. O filtrado de todos os grupos experimentais (plantas infectadas com *M. robertsii* ARSEF 2575, *M. acridum* ARSEF 324, plantas não infectadas -controle negativo-, e plantas não infectadas com padrões adicionados -controle positivo-) foi pré-purificado utilizando cartuchos de extração SPE-C18 (Fisher Scientific®). Os cartuchos foram condicionados com 3 mL de metanol (100%), seguido pelo mesmo volume de água ultra-pura. Cinco mL do sobrenadante foram utilizados em cada cartucho. Após carregados, os cartuchos foram rinsados com 10 mL de água ultra-pura e eluídos com 5 mL de metanol (DONZELLI et al., 2012). Após a pré-purificação, as amostras foram analisadas por espectrometria de massas.

O sistema de espectrometria de massas (LCQ Advantage Max mass spectrometer) (Thermo Electron® Corp., San Jose, CA, EUA) estava acoplado a um sistema de HPLC e consistia numa coluna C18 Betasil em fase reversa (100 x 2.1 mm, Thermo Fisher) e uma coluna de guarda de mesma fase, acoplada a um Surveyor MS Pump Plus, um injetor automático Surveyor Auto Sampler Plus e um detector de UV PDA em linha com o espectrômetro de massas e uma fonte de ionização *electrospray*. Cinco µL de cada amostra foram injetados no aparelho. A eluição foi obtida com os seguintes passos do solvente A (acetonitrila) e B (água): 0 – 10 min (25% de A para 60% de A); 10 – 13 min (60% A); 13 – 15 min (60% de A para 25% de A) a um fluxo de 0.3 mL/min.

Íons pseudomoleculares das destruxinas A, B e E foram observados à *m/z* 578, 594 e 594, respectivamente, com os seguintes tempos e retenção: 7,05 min (destruxina A), 9,12 min (destruxina B) e 5,03 (destruxina E). A quantificação das destruxinas foi feita utilizando-se uma curva padrão construída para cada padrão. Os experimentos foram realizados três vezes.

2.3.4 Efeito da presença endofítica dos fungos no peso seco das plantas

O efeito da produção de destruxinas *in planta* foi avaliado pela comparação entre o peso seco de plantas colonizadas com fungos e plantas não colonizadas. O peso seco do triturado das plantas foi obtido através de secagem em forno a 80°C por 48 horas. Os pesos foram comparados e analisados por análise de variância (ANOVA) seguido pela teste de Tukey com nível de significância de 5% ($P \leq 0,05\%$) (SAMPAIO, 2002). Os experimentos foram realizados três vezes.

2.4 Aplicação de *Metarhizium* spp. em folhas de *Vigna unguiculata*

Sementes de *V. unguiculata* (sementes orgânicas Shangri-la Health Foods, Lofan, UT, EUA) foram esterilizadas superficialmente e sincronizadas de acordo com o item 2.3.1. As sementes foram cultivadas em condicionador de solo (Natus solos do Brasil condicionadores – Floreira, da natureza pra natureza – Taubaté, SP) esterilizado por autoclavagem. O solo foi condicionado em vasos de polipropileno com dimensões de 12 cm de altura e 16 cm de diâmetro interno na parte superior (Nº 3).

Para o plantio das sementes, uma cavidade com aproximadamente 3,0 centímetros de profundidade foi feita. Foram depositadas duas sementes por cavidade. Os vasos foram molhados a cada dois dias e mantidos em temperatura ambiente em locais com incidência de raios solares. Dez dias após a germinação, a planta menos desenvolvida em cada vaso foi descartada.

Quinze dias após o plantio, foi realizada esterilização superficial das folhas com aplicação de etanol 70% e secagem ao ar. Uma suspensão de 1×10^8 conídios mL⁻¹ de *M. robertsii* (ARSEF 2575) ou *M. brunneum* (ARSEF 1095) (o suficiente pra cobrir a superfície foliar como um todo) foi aplicada com pincel nas folhas de feijão (Figura 2A). As folhas controle foram previamente pinceladas com meio artificial BDA acrescido de cloranfenicol 0,05% e Benomyl 0,002% antes de receberem as suspensões fúngicas, garantindo assim a germinação dos conídios do grupo controle. Após a aplicação fúngica, os vasos foram revestidos com sacos plásticos e vedados com barbante (Figura 2B) para criar um ambiente superúmido. A germinação dos conídios foi avaliada 24, 48, e 72 horas após a aplicação foliar.

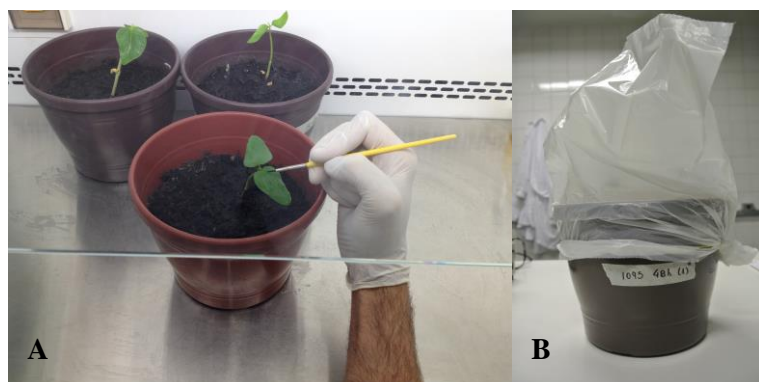


Figura 2. (A) Aplicação de suspensão fúngica em uma das folhas de *Vigna unguiculata* utilizando pincel previamente esterilizado por imersão etanol 70%. (B) Câmara superúmida para induzir a germinação do fungo entomopatogênico.

2.5 Microscopia eletrônica de varredura de folhas de *Vigna unguiculata* após aplicação *Metarhizium brunneum* e *Metarhizium robertsii*

Vinte e quatro e 48 horas depois da aplicação das suspensões conidiais nas folhas de feijão, estas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Dois pedaços de folhas medindo 0,5 cm² foram fixados *overnight* a 4 °C em tampão fixador a base de cacodilato de sódio (paraformol a 2%; glutaraldeído a 2%; 0,05M de cacodilato de sódio, pH 7,2). Após a fixação, as amostras foram lavadas 4 vezes em tampão cacodilato de sódio 0,05 M pH 7,2 por 15 min cada e, em seguida, desidratadas em série gradual de etanol (30, 50, 70, 80, e 90%, por 15 min cada, e 100%, por 2 vezes 10 min), secos ao ponto crítico (*Critical Point Dryer* CPD) utilizando o sistema de secagem de amostras pelo ponto crítico de CO₂ (Autosamdri[®] 815, Series A), cobertos com uma película de carbono (utilizando o aparelho Denton Vacuum[®] Desk V) e analisados ao microscópio eletrônico de varredura Jeol, JSM 6610, Thermo scientific[®] pertencente ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução, UFG.

2.6 Microscopia óptica de fluorescência de folhas de *Vigna unguiculata* 72 horas após inoculação com *Metarhizium brunneum* e *Metarhizium robertsii*

Setenta e duas horas após a aplicação das suspensões fúngicas nas folhas dos feijões, estas foram analisadas por microscopia óptica de fluorescência. O protocolo de fixação e lavagem foi o mesmo utilizado no item 2.5. Após as lavagens em tampão cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,2), as folhas foram colocadas em poços de uma placa de cultivo celular contendo 1,5 ml do corante fluorescente Calcofluor White M2R (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, SP, Brasil) a 2% (v/v). As amostras foram mantidas *overnight*, no escuro e em temperatura ambiente. Posteriormente, os pedaços de folhas foram montados em lâminas de microscopia, cobertos com lamínula, analisadas e fotomicrografadas em um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i) no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão, localizado na cidade de Santo Antônio, Goiás.

2.7 Re-isolamento de *Metarhizium brunneum* em feijões após inoculação foliar

A ausência ou presença fúngica em plantas, foi confirmada pela cultura de partes das plantas (raízes, caules e folhas) em meio artificial CTC (Fernandes et al., 2010).

Um total de 12 plantas foram avaliadas. Plantas com 15 dias de crescimento foram expostas, por aplicação foliar, a uma suspensão de 1×10^8 conídios mL⁻¹ do fungo *M. brunneum* isolado ARSEF 1095. Sacos de polipropileno foram utilizados para criar um ambiente superúmido por 48 horas favorecendo a germinação dos conídios sobre as folhas. A capacidade endofítica de *M. brunneum* foi avaliada através da tentativa de re-isolamento fúngico 10 dias após a aplicação dos conídios nas folhas de feijão, seguindo a metodologia do item 2.3.2.

3 RESULTADOS

3.1 Re-isolamento fúngico de plantas após inoculação de *Metarhizium robertsii* e *Metarhizium acridum* em sementes

Sementes de feijão e pepino foram expostas a dois isolados fúngicos de diferentes espécies e com capacidade de produção de destruxinas diferenciada.

O percentual de germinação das suspensões fúngicas usadas na inoculação das sementes de feijão e pepino foi de 99% para ambos *M. robertsii* ARSEF 2575 e *M. acridum* ARSEF 324. A colonização endofítica foi confirmada 12 dias após a inoculação através da cultura de partes das plantas previamente esterilizadas na superfície (Figura 3). O grupo de plantas cujas sementes não foram expostas aos fungos (grupo controle) não apresentou crescimento fúngico ou bacteriano após cultivo em placas contendo BDAL e cloranfenicol. Nas plantas provenientes de sementes expostas, o crescimento fúngico pode ser observado em todas as partes das plantas (raízes, caules e folhas).

As culturas fúngicas foram então isoladas dos tecidos das plantas, plaqueadas em meio de cultura artificial BDA e caracterizadas morfológicamente de acordo com Tulloch (1976). Em todos os casos as características morfológicas foram consistentes com as características de isolados de *Metarhizium* spp.

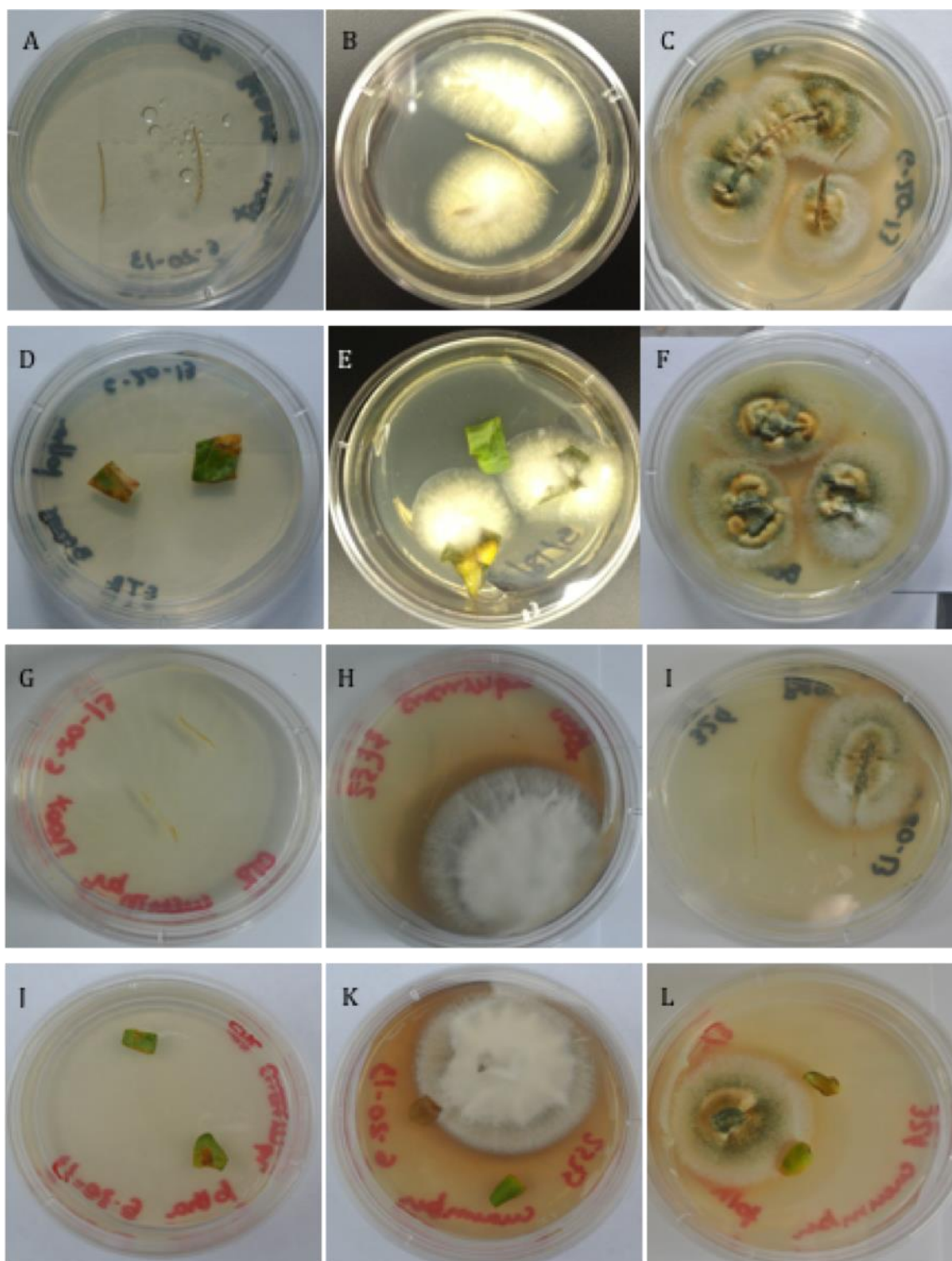


Figura 3. Exemplos representativos da colonização endofítica de diferentes espécies de *Metarhizium* em feijão (*Vigna unguiculata*) e pepino (*Cucumis sativus*). Plantas controle sem crescimento fúngico (A e G, raízes; D e J, folhas). *M. robertsii* crescendo em raízes (B) e folhas (E) de feijão que tiveram a superfície esterilizada; *M. robertsii* crescendo em raízes (H) e folhas (K) de pepino que tiveram a superfície esterilizada. *M. acridum* crescendo em raízes (C) e folhas (F) de feijão que tiveram a superfície esterilizada. *M. acridum* crescendo em raízes (I) e folhas (L) de pepino que tiveram a superfície esterilizada.

3.2 Detecção de destruxinas *in planta* após inoculação fúngica em sementes de feijão e pepino

Níveis detectáveis de destruxinas A, B, e E foram identificados em tecidos de feijão expostos ao fungo *M. robertsii* isolado ARSEF 2575 (Figura 4). As concentrações de cada composto foram as seguintes: $5,725 \pm 0,293$ μg de destruxina E/g de peso seco de planta; $1,557 \pm 0,288$ μg de destruxina A/ g de peso seco de planta; e $0,818 \pm 0,108$ μg de destruxina B/ g de peso seco de planta. Não foram detectadas destruxinas em tecidos de plantas cujas sementes não foram inoculadas com fungos ou colonizadas com *M. acridum*. Também não foram detectadas destruxinas em pepinos colonizados tanto por *M. robertsii* quanto por *M. acridum*.

As destruxinas foram detectadas em todos os controles positivos (feijão ou pepino que receberam padrões de destruxinas em sua superfície anteriormente à extração).

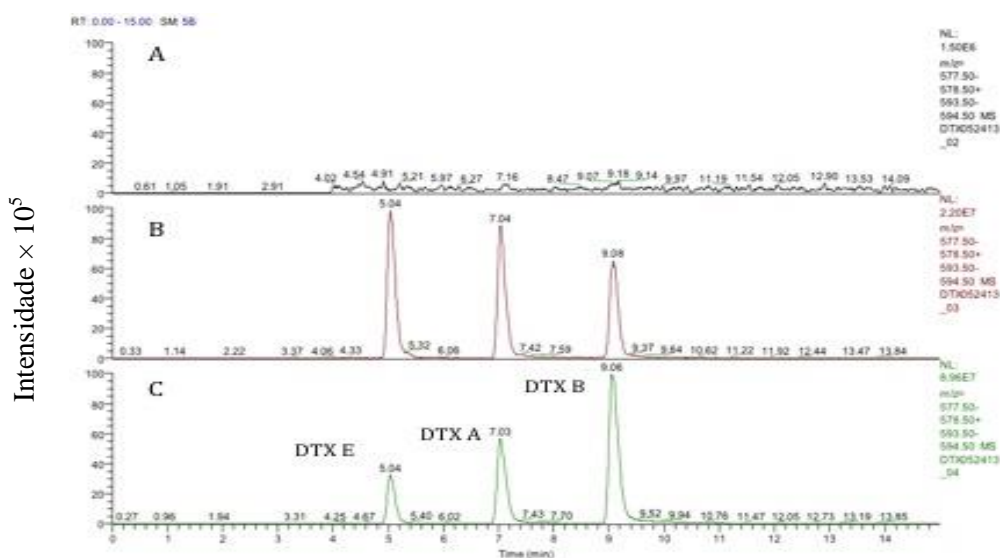


Figura 4. Perfil cromatográfico (HPLC-MS) do extrato de feijões (*Vigna unguiculata*) para a detecção de destruxinas. (A) Plantas não colonizadas por *Metarhizium robertsii* (controle negativo); (B) plantas colonizadas por *M. robertsii*; e (C) plantas não colonizadas por fungos mas pulverizadas com padrões de destruxinas (controle positivo). Ambas as sementes (com ou sem o fungo) foram incubadas por 12 dias em placas de Petri contendo filtro de papel umidificado sob condições controladas. Destruxinas foram extraídas utilizando-se metanol e cartuchos de extração em fase sólida.

3.3 Efeito da presença de de fungos artropodopatogênicos no peso seco das plantas

Nenhuma diferença ($P \geq 0.05$) foi detectada entre o peso de feijões *cowpea* e pepinos colonizados e não colonizados pelos isolados de *Metarhizium*. Ou seja, a produção *in planta* de destruxinas não foi um fator que alterou o peso seco das plantas até o 12º dia de crescimento.

3.4 Análise da germinação de *Metarhizium brunneum* e *Metarhizium robertsii* 24 e 48 horas após aplicação sobre folhas de *Vigna unguiculata* através de MEV.

Foram observados conídios germinados dos dois isolados estudados (*M. robertsii* ARSEF 2575 e *M. brunneum* ARSEF 1095), tanto nas folhas do controle quanto nas folhas sem o meio artificial 24, e 48 horas após a aplicação da suspensão fúngica. Uma visão geral do grupo controle (folhas com meio artificial) e do grupo sem a presença do meio artificial, 24 horas após a aplicação das suspensões fúngicas, pode ser observada na figura 5.

As análises mostraram que os conídios foram capazes de se aderir e germinar em qualquer local (parte adaxial e abaxial) das folhas de *V. unguiculata*. Foram observados conídios aderidos em locais diferentes do tegumento foliar, tais como estômatos, e tricomas. O primeiro sinal de germinação foi o aparecimento de um tubo germinativo em um dos polos do conídio. Cada conídio produziu um único tubo germinativo, com variação no comprimento.

Não foi observado a formação clara de apressório (estrutura cuja função é ancorar firmemente o fungo e auxiliar na penetração) em ambos os isolados estudados nas análises de MEV. A figura 6 (A e B) mostra indícios de formação de apressório e penetração pelo isolado de *M. brunneum* 48 horas após a aplicação foliar. A figura 6C mostra o desenvolvimento de tubos germinativos no interior de um estômato.

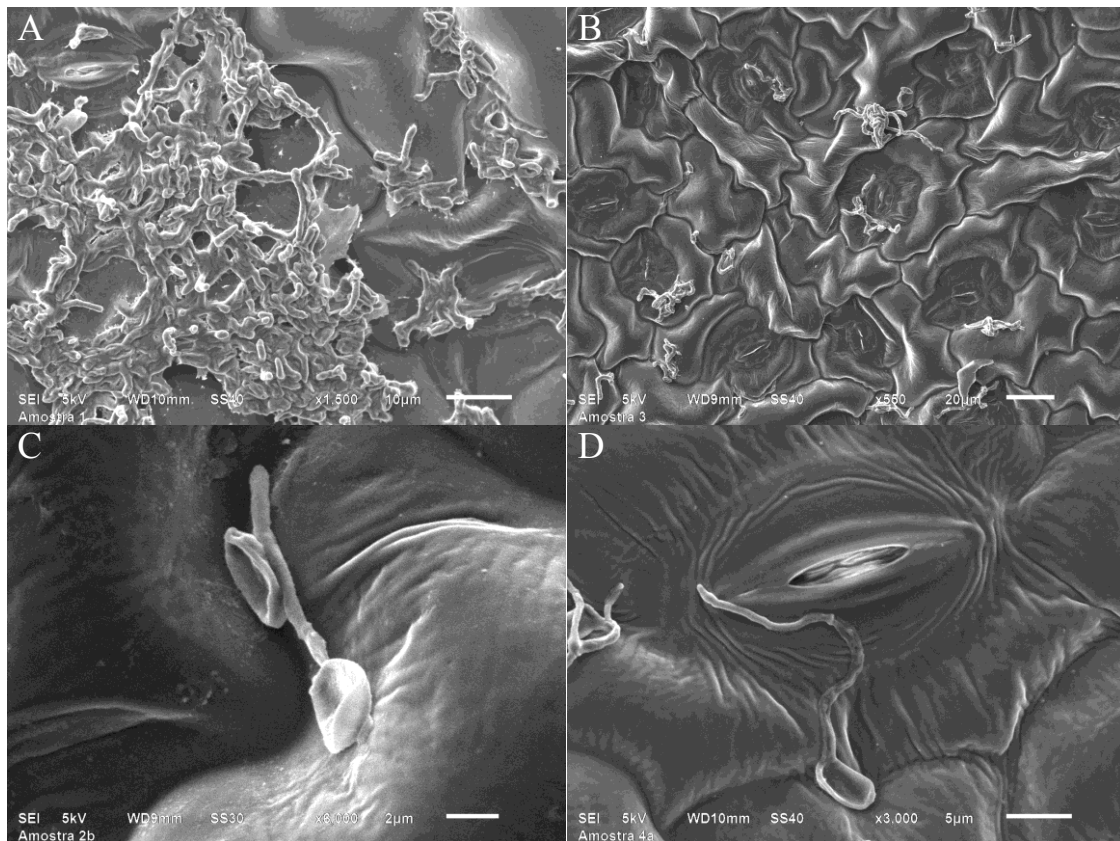


Figura 5. Eletromicrografia de varredura de folhas de *Vigna unguiculata* 24 horas após aplicação foliar de suspensões de *Metarhizium brunneum* (A; C) e *Metarhizium robertsii* (B; D), com (A; B) ou sem (C; D) prévia aplicação de meio artificial batata destrose ágar acrescido de cloranfenicol 0,05% e benomyl 0,002%.

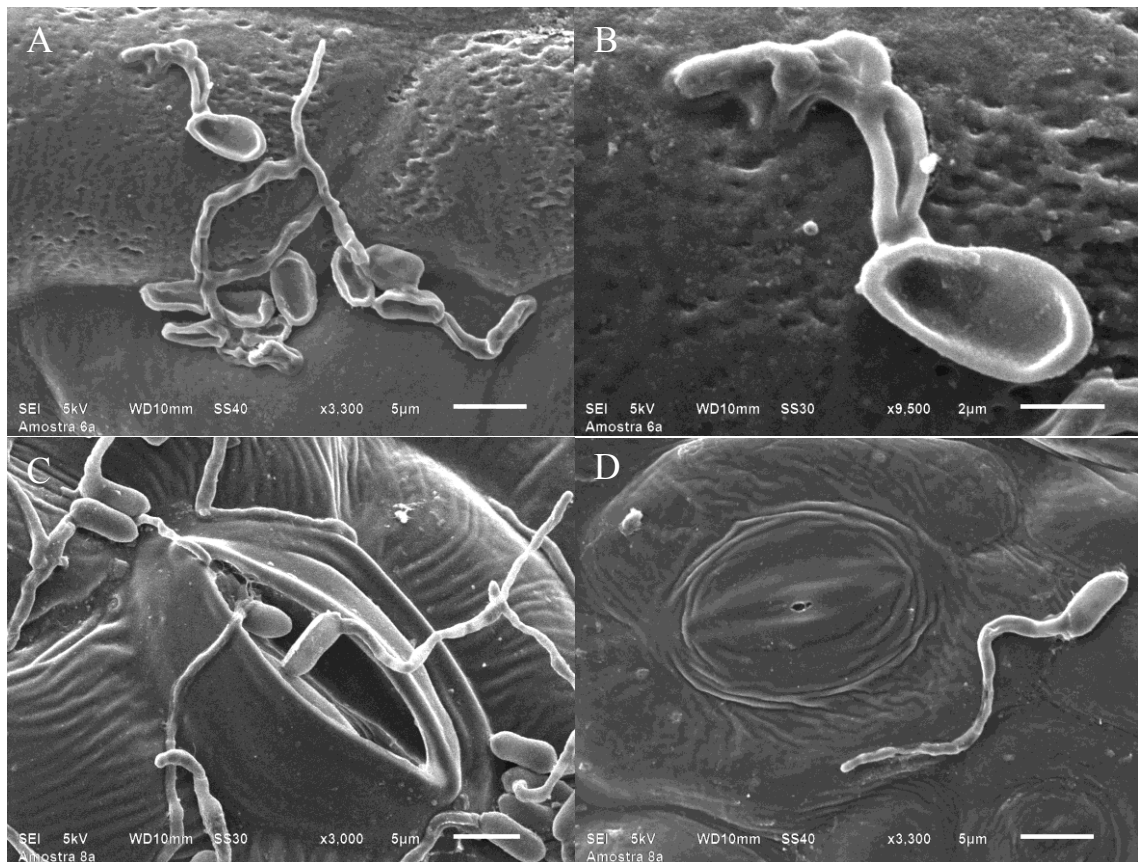


Figura 6. Eletromicrografia de varredura de folhas de *Vigna unguiculata* 48 horas após aplicação foliar de suspensões de *Metarhizium brunneum* (A; B) e *Metarhizium robertsii* (C; D) sem prévia aplicação de meio artificial batata destrose ágar acrescido de cloranfenicol e benomyl.

3.5 Microscopia óptica de fluorescência de folhas de *Vigna unguiculata* 72 horas após inoculação com *Metarhizium brunneum* e *Metarhizium robertsii*

Foram observados conídios germinados nos dois isolados estudados (*M. robertsii* ARSEF 2575 e *M. brunneum* ARSEF 1095), tanto em folhas do controle quanto em folhas sem o meio artificial 72 horas após a aplicação da suspensão fúngica. Entretanto, diferentemente das análises feitas com 24 e 48 horas, 72 horas após a exposição fúngica foi possível detectar a formação de apressório pelo isolado ARSEF 1095 de *M. brunneum* (Figura 7A) mesmo em folhas sem meio BDA. A formação de apressório não foi observada com o isolado ARSEF 2575 de *M. robertsii* (Figura 7B) tanto em folhas controle quanto em folhas sem o meio de cultura.

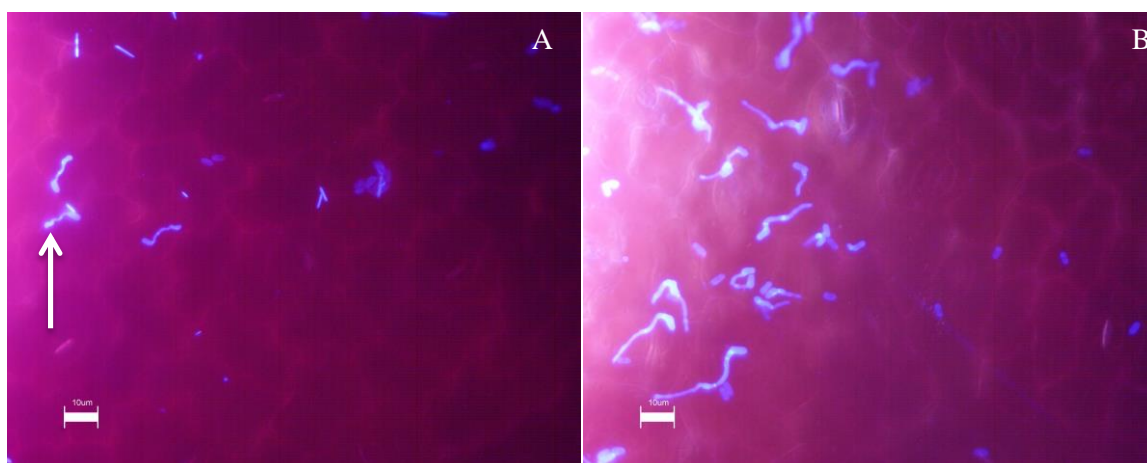


Figura 7. Microscopia óptica de fluorescência de folhas de *Vigna unguiculata* 72 horas após aplicação foliar de suspensões de *Metarhizium brunneum* isolado ARSEF 1095 (A) e *Metarhizium robertsii* isolado ARSEF 2575 (B) sem prévia aplicação de meio artificial. A seta indica a formação de apressório.

3.6 Re-isolamento de *Metarhizium brunneum* em feijões 15 dias após inoculação foliar

A capacidade de penetração *in planta* do fungo entomopatogênico *M. brunneum* após aplicação foliar pôde ser confirmada com o re-isolamento da colônia fúngica a partir de folhas de *V. unguiculata* após esterilização superficial (Figura 8). Das 12 plantas expostas a *M. brunneum*, 6 apresentaram crescimento fúngico a partir de folhas. Não foi observado crescimento fúngico a partir de caules ou raízes analisadas (Figura 8A e 8B) ou a partir de folhas não expostas ao fungo (grupo controle).

A cultura fúngica isolada das folhas das plantas foi inoculada em meio de cultura artificial BDA e caracterizada morfológicamente de acordo com Tulloch (1976). Em todos os casos as características morfológicas foram consistentes com as características de isolados de *Metarhizium* spp. As características macro-morfológicas da colônia fúngica foram consistentes com as de *M. brunneum*.

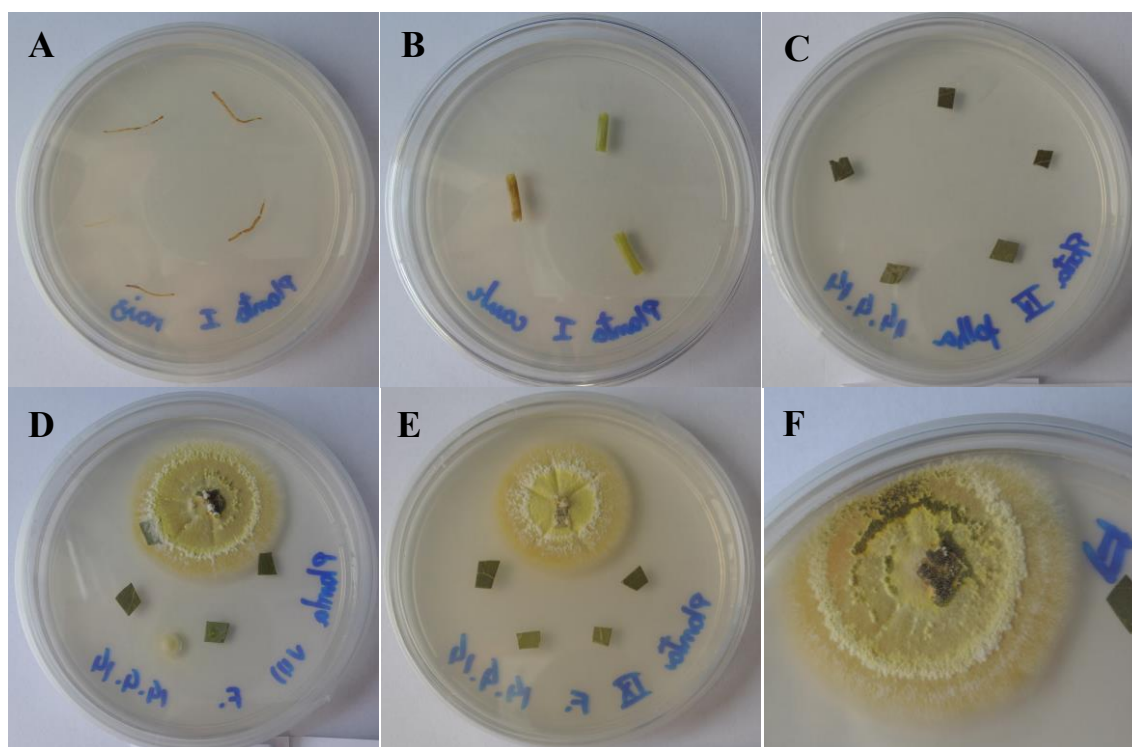


Figura 8. Re-isolamento fúngico em meio artificial CTC (Fernandes et al. 2010) a partir de folhas de feijão cowpea (*Vigna unguiculata*) após aplicação foliar de suspensão aquosa de conídios de *Metarhizium brunneum*. (A): ausência de crescimento fúngico em raiz de feijão cowpea; (B): ausência de crescimento fúngico em caule de feijão cowpea; (C): uma das placas que apresentou ausência de crescimento fúngico em folha de feijão cowpea expostas a *M. brunneum*; (D, E, F): pedaços de folhas de *V. unguiculata* após esterilização superficial com crescimento de *Metarhizium*. As placas com as partes das plantas foram mantidas em câmara climatizada a 28 °C

4 DISCUSSÃO

Desde que foram descobertas por Donald Roberts e reportadas por Kodaira em 1961, as destruxinas (metabólitos secundários produzidos por *Metarhizium* spp.) foram caracterizadas como compostos inseticidas. Entretanto, baseado nos resultados dos capítulos II e III da presente tese, e em trabalhos previamente publicados, principalmente Donzelli e colaboradores (2012) e Kershaw e colaboradores (1999), a produção *in vitro* de destruxinas não interfere diretamente na virulência dos isolados fúngicos para insetos. Então qual seria o papel desses metabólitos (produzidos em abundância por determinados isolados fúngicos) na patogenicidade de *Metarhizium* spp. contra artrópodes?

Alguns fungos entomopatogênicos têm sido relatados como endófitos (PETRINI, 1981; BILLS; POLISHOOK, 1991; VEGA et al., 2008; GURULINGAPPA et al., 2010; SASAN; BIDOCHKA, 2012; PARSA et al., 2013). Até o presente momento espécies de *Metarhizium* não haviam sido re-isoladas de plantas após inoculação em sementes ou aplicação foliar. Essa descoberta abre novas possibilidades de investigação para estudos filogenéticos, evolutivos, e também que objetivam avanços no controle biológico com essas espécies de fungo.

De acordo com O'Brien (2008), *M. acridum*, um fungo com alta especificidade para acridídeos, não é rizosfera-competente; Pava-Ripoll e colaboradores (2011) relataram que a germinação desta espécie em exsudatos radiculares de plantas foi significativamente menor se comparado com *M. robertsii* (= *M. anisopliae*). Entretanto, no presente capítulo, o isolado ARSEF 324 de *M. acridum* foi capaz de colonizar endofiticamente feijão *cowpea* ou pepino após inoculação em sementes indo de encontro com os resultados desses estudos prévios. Não se sabe se a aplicação foliar com este fungo permitirá o estabelecimento endofítico em folhas, caules e raízes.

Estudos relacionando a capacidade endofítica de fungos entomopatogênicos com a mortalidade de insetos pragas vem sendo relatados (BING; LEWS, 1991; VEGA et al., 2008; AKUTSE et al., 2013). Gurulingappa e colaboradores (2010) não relataram mortalidade, mas uma redução significativa da reprodução e da taxa de crescimento dos insetos estudados. Para discutir as possíveis causas envolvendo a redução populacional de insetos quando expostos a plantas colonizadas por fungos entomopatogênicos, muitos desses autores sugerem uma resposta à presença de metabólitos secundários produzidos por estes fungos que seriam tóxicos para os insetos.

Até a presente data nenhum estudo detectou a presença de destruxinas em plantas colonizadas por *Metarhizium*, ou a presença deste fungo nas diversas partes da planta após inoculação em sementes ou aplicação foliar. Por outro lado, *Metarhizium* spp. têm sido apontado como mediador das interações entre plantas, insetos e solo: por exemplo, Behie e colaboradores (2012) mostraram que plantas podem receber quantidades significativas de nitrogênio de insetos infectados com *Metarhizium*. Sasan e Bidochka (2012) relataram que a colonização endofítica de *M. robertsii* nas raízes de plantas induziu o crescimento dessas raízes com uma maior formação de pêlos radiculares. A capacidade de alguns isolados de *Metarhizium* em produzir destruxinas dentro de plantas, como relatado pelo presente estudo, sugere o estabelecimento de novas perspectivas para a potencialização do controle biológico de artrópodes-praga através do estabelecimento endofítico desses fungos.

Vale destacar que a produção de destruxinas por fungos artropodopatogênicos em plantas depende não somente do isolado fúngico, mas também das espécies/cultivares de plantas envolvidas. Nossos resultados mostraram que mesmo quando colonizados com *M. robertsii* ARSEF 2575 (um isolado que produz destruxinas *in vitro* e também em feijão *cowpea*), destruxinas não puderam ser detectadas em extratos de pepino. *Alternaria brassicae* é um fungo fitopatogênico, causador de uma doença conhecida como *Alternaria blackspot*;

este fungo é conhecido pela produção de destruxina B. Também é sabido que existem plantas resistentes a essa toxina, ou seja, apenas alguns cultivares de plantas são suscetíveis aos efeitos da toxina (PEDRAS et al., 2001; PEDRAS et al., 2002). Plantas resistentes têm enzimas que hidrolizam a destruxina B (PEDRAS et al., 2001); essa capacidade hidrolítica poderia explicar a ausência dessas moléculas nos extratos de pepino.

Estudos sobre os efeitos das destruxinas em organismos vertebrados após ingestão são necessários para apoiar o uso de fungos entomopatogênicos inoculados em sementes de plantas para o controle de insetos praga. Caso exista alguma hesitação por parte das agências reguladoras em relação à possibilidade da presença de destruxinas em um produto alimentício, o isolado de *Metarhizium* utilizado no controle biológico ou o cultivar das plantas podem ser selecionados para prevenir esse tipo de produção; ou seja, isolados que não produzem destruxinas *in vitro* ou cultivares de plantas que desintoxicam destruxinas podem ser usados. Ainda não foram relatados estudos que comprovem a presença de destruxinas após a aplicação foliar de *Metarhizium* spp.

Fungos fitopatogênicos representam um sério entrave para diversas culturas de plantas. Por esse motivo, muitas sementes já são comercializadas com produtos antifúngicos, o que inviabilizaria a germinação dos conídios após a inoculação nesta fase da planta. Por isso, o presente capítulo também objetivou reportar se *Metarhizium* é capaz de colonizar plantas após aplicação foliar. O isolado fúngico utilizado no experimento de re-isolamento foi um isolado que pode ser obtido comercialmente na Europa (*M. brunneum* ARSEF 1095, também conhecido como F52).

Através da MEV pôde-se observar que tanto *M. robertsii* quanto *M. brunneum* foram capazes de germinar sobre folhas de *V. unguiculata*. Somente 72 horas após a aplicação, os tubos germinativos de *M. brunneum* mostraram em sua extremidade a formação de apressório em análise por microscopia óptica de fluorescência sugerindo a capacidade de penetração no tecido foliar; o mesmo não pôde ser observado para o isolado ARSEF 2575 de *M. robertsii* (também conhecido como isolado ME1). Vários trabalhos relacionando a formação de apressório em diferentes condições físicas e nutricionais foram reportados (ST LEGER et al. 1989a,b; ST LEGER et al., 1991). A formação de apressório é estimulada pelo contato com uma superfície sólida (resposta trigmotrópica) (ST LEGER et al., 1989). Estes mesmos autores mostraram que a formação de apressório ocorre em uma ampla variedade de superfícies sólidas sugerindo um estímulo físico-químico não específico. Entretanto, a diferenciação dos tubos germinativos em apressório é estimulada por superfícies hidrofóbicas e só é possível se houver presença de nutrientes nitrogenados. Fungos fitopatogênicos também produzem esta estrutura, mas diferentemente de fungos artropodopatogênicos, para que haja formação de apressório nesses fungos é necessária prévia transcrição durante a germinação conidial, no caso de *M. robertsii* (= *M. anisopliae* isolado ME1) esta formação não é tão dependente do tempo (ST LEGER et al., 1989). Estes autores reportaram ainda que *M. robertsii* frequentemente apresentam extensivo crescimento de hifas antes da penetração, portanto, mesmo não sendo observado (até 72 horas após aplicação) a formação de apressório pelo isolado ARSEF 2575 de *M. robertsii*, não é possível afirmar que esse isolado não produz apressório em folhas.

O experimento de re-isolamento fúngico pôde comprovar a penetração do isolado ARSEF 1095 de *M. brunneum* em folhas de *V. unguiculata*. Não houve detecção do fungo em outras partes da planta, portanto sugere-se que após 15 dias de crescimento, o fungo não seja capaz de se disseminar para outras partes da planta. Num estudo publicado por Wagner e colaboradores (2000) a respeito da colonização endofítica de *B. bassiana* em milho e seus efeitos contra a broca do milho Européia (*O. lubialis*), reportou-se que nem todas as hifas desenvolvidas sobre a superfície das folhas foram capazes de penetrá-las. Os autores explicam ainda que, quando houve penetração fúngica, esta foi aleatória, indicando que este fungo não

exige sinais topográficos específicos em um sitio de entrada como ocorre com alguns fungos fitopatogênicos. Também foram reportadas hifas longas seguindo o apoplasto folear (conjunto dos compartimentos existentes exteriormente à membrana plasmática) em vários sentidos, a partir do ponto de penetração. Algumas hifas foram observadas dentro de elementos do xilema. Este estudo sugere que, a medida que feixes vasculares são interligados em toda a planta isso explicaria como *B. bassiana* se deslocou dentro da planta proporcionando ampla proteção inseticida.

Muitos aspectos, como os reportados acima para *B. bassiana*, ainda precisam ser esclarecidos em relação ao desenvolvimento de espécies de *Metarhizium* no interior de plantas e seus efeitos inseticidas para artrópodes praga. O presente estudo responde a algumas perguntas e principalmente começa a destacar outras maneiras de exploração do potencial patogênico de fungos classicamente relacionados somente com seus hospedeiros artrópodes.

REFERÊNCIAS

AKUTSE, K.S.; MANIANIA, N.K.; FIABOE, K.K.M.; VAN DEN BERG, J.; EKESI, S. Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on life history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). **Fungal Ecology**, v. 6, p. 293-301, 2013.

AMIRI, B.; IBRAHIM, L.; BUTT, T.M. Antifeedant properties of destruxins and their potential use with the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for improved control of crucifer pests. **Biocontrol Science and Technology**, v. 9, p. 487-498. 1999.

BEHIE, S.W.; ZELISKO, P.M.; BIDOCHKA, M.J. Endophytic Insect-Parasitic Fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. **Science**, v. 336, p. 1576-1577, 2012.

BILLS, G.F.; POLISHOOK, J.D. Microfungi from *Carpinus caroliniana*. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 1477-1482, 1991.

BING, L.A.; LEWIS, L.C. Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepdoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. **Environmental Entomology**, v. 20, p. 1207-1211, 1991.

DONZELLI, B.G.G.; KRASNOFF, S.B.; SUN-MOON, Y.; CHURCHILL, A.C.L.; GIBSON, D.M. Genetic basis of destruxin production in the entomopathogen *Metarhizium robertsii*. **Current Genetics**, v. 58, p. 105-116, 2012.

FERNANDES, E.K.K.; KEYSER, C.A.; RANGEL, D.E.N.; FOSTER, R.N.; ROBERTS, D.W. CTC medium: A novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, v. 54, p. 197-205, 2010.

GURULINGAPPA, P.; SWORD, G.A.; MURDOCH, G.; MCGEE P.A. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effect on two insect pests when *in planta*. **Biological Control** 55: 34-41. 2010.

KERSHAW, M.J.; MOORHOUSE, E.R.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S.E.; CHARNLEY, A.K. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.74, p. 213-223, 1999.

KODARIA, Y. Toxic substances to insects, produced by *Aspergillus ochraceus* and *Oospora destructor*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 25, p. 261-262, 1961.

LIU, B-L; TZENG, Y-M. Development and applications of destruxins: a review. **Biothecnology Advances**, v. 30, p. 1242-1254, 2012.

O'BRIEN, T.R. *Metarhizium anisopliae*'s persistence as a saprophyte, genetic basis of adaptation and role as a plant symbiont. Tese de doutorado, University of Maryland, 2008.

PARSA, S.; ORTIZ, V.; VEGA, F.E. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. **Journal of Video Experiments**, v. 74, e50360, 2013.

PAVA-RIPOLL, M.; ANGELINI, C.; FANG, W.; WANG, S.; POSADA, F.; ST. LEGER, R. The rhizosphere-competent entomopathogen *Metarhizium anisopliae* expresses a specific subset of genes in plant root exudates. **Microbiology**, v. 157, p. 47-55, 2011.

PEDRAS, M.S.; ZAHARIA, I.L.; GAI, Y.; ZHOU, Y.; WARD, D.E. *In planta* sequential hydroxylation and glycosylation of a fungal phytotoxin: avoiding cell death and overcoming. **Proceedings of National Academic of Science, USA**, v. 98, p. 747-752, 2001.

PEDRAS, M.S.C.; ZAHARIA, L.I.; WARD, D.E. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. **Phytochemistry**, v. 59, p. 579-596, 2002.

PETRINI, O. Endophytische pilze in *Epiphytischen araceae, Bromeliaceae* and *Orchidiaceae*. **Sydowia**, v. 34, p. 135-148, 1981.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. Belo Horizonte: FEPMVZ-Editora, 2002. 265p.

SASAN, R.K.; BIDOCHKA, M. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. **American Journal of Botany**, v. 99, p. 101-107, 2012.

ST LEGER, R.J.; BUTT, T.M.; GOETTEL, M.S.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, v. 13, p. 274-288, 1989a.

ST LEGER, R.J.; BUTT, T.M.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, v. 13, p. 253-262, 1989b.

ST LEGER, R.J.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. A model to explain differentiation of appressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 57, p. 299-310, 1991.

ST LEGER, R.J. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. **Journal of invertebrate pathology**, v. 98 p. 271-276, 2008.

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

VEGA, F.E.; POSADA, F.; AIME, M.C.; PAVA-RIPOLL, M.; INFANTE, F.; REHNER, S.A. Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control**, v. 44, p. 72-82, 2008.

CONCLUSÕES GERAIS

- 1- A radiação UV-B causou atraso na germinação ou inviabilizou os conídios testados
- 2- A presença do óleo nas suspensões fúngicas aumentou o percentual de germinação relativa dos conídios testados após exposição à radiação UV-B.
- 3- A produção das principais destruxinas (A, B, e E) não está, aparentemente, relacionada com a espécie fúngica.
- 4- Os ensaios biológicos permitiram confirmar uma maior susceptibilidade das larvas de *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor* em relação às larvas de *Rhipicephalus microplus* ao tratamento com fungos entomopatogênicos.
- 5- De maneira geral, os isolados fúngicos não apresentaram especificidade para insetos ou carrapatos (exceto os isolados ARSEF 724, ARSEF 729 e ARSEF 1885). Entretanto, interessante, os isolados mais virulentos para larvas de carrapato não foram os mais virulentos para insetos.
- 6- Baseado na capacidade de produção *in vitro* de destruxinas dos isolados fúngicos testados e nos resultados dos ensaios biológicos, a produção *in vitro* de destruxinas não está relacionada aos níveis de virulência dos isolados fúngicos.
- 7- A virulência do isolado ARSEF 782 (depositado no Brasil como CG 148) em larvas de carrapato não foi elevada pelo aumento dos níveis conidiais de Pr1, nas concentrações conidiais testadas.
- 8- Cinquenta e duas proteínas foram identificados nos ovos de *R. microplus*, dentre essas, cinco inibidores de serino proteases (Serpinas) estão possivelmente relacionados a uma resposta constitutiva ou adaptativa das fêmeas deste carrapato após tratamento com o isolado ARSEF 782 (CG 148).
- 9- O fungo artropodopatogênico *Metarhizium robertsii* é capaz de colonizar endofiticamente *Vigna unguiculata* (feijão) e produzir destruxinas nessas plantas. A presença das destruxinas nas plantas pode representar um passo a mais na procura por novas abordagens do controle biológico, um vez que a presença desses metabólitos secundários pode interferir negativamente no comportamento de insetos-praga.
- 10- Aspectos relacionados a ecologia dos fungos artropodopatogênicos precisam ser melhor explorados, haja visto que o fungo artropodopatogênico *Metarhizium brunneum* (comercializado na Europa como biopesticida) é capaz de penetrar e colonizar folhas de *V. unguiculata* após aplicação foliar.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos que esclareçam os vários desdobramentos da utilização de fungos artropodopatogênicos no controle de artrópodes praga são necessários para o avanço dessa ciência. Muitos são os fatores envolvidos na interação artrópode *versus* fungos artropodopatogênicos. Hoje, sabemos que as plantas possuem um papel ímpar nessa interação e que muito provavelmente a predileção desses fungos por artrópodes tenha se iniciado através da interação planta *versus* fungo.

Além da abordagem que envolve as características fúngicas (tolerância à radiação UV-B; produção de enzimas e toxinas) e suas interações com o meio ambiente, outro fator precisa ser levado em consideração: a capacidade de resposta dos artrópodes.

A presente tese abordou diferentes aspectos relacionados ao uso de fungos no controle de artrópodes, especialmente carrapatos. Dentre os fungos estudados, os isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 782 e ARSEF 3643 e o isolado de *Metarhizium robertsii* ARSEF 2575 destacaram-se por apresentar resultados positivos nas diferentes características estudadas, isto é, suas tolerâncias à radiação UV-B e níveis de virulência. Estes isolados seriam, portanto, indicados para integrarem futuros programas de controle de pragas (incluindo carrapatos) que utilizem fungos artropodopatogênicos a campo.

Para que a produção *in planta* de destruxinas possa ser considerada uma nova abordagem para o controle biológico, ensaios biológicos precisam ser realizados objetivando testar os possíveis efeitos negativos da presença destas toxinas no comportamento de insetos praga.