

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

**TESE**

**Caracterização e Seleção de Isolados de *Beauveria*  
*bassiana* para o Controle Microbiano do Carrapato  
*Boophilus microplus***

**Éverton Kort Kamp Fernandes**

**2007**



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

**CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE ISOLADOS DE**  
***Beauveria bassiana* PARA O CONTROLE MICROBIANO DO**  
**CARRAPATO *Boophilus microplus***

**ÉVERTON KORT KAMP FERNANDES**

**Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt**

*e Co-orientação de*

**Dra. Gisela Lara da Costa e Dra. Raquel da Silva Pacheco**

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

Seropédica, RJ

Março de 2007

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

**ÉVERTON KORT KAMP FERNANDES**

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 30/03/2007

---

**Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. Dr. UFRRJ**  
(Orientador)

---

Márcia Cristina de Azevedo Prata. Dr. EMBRAPA

---

Drauzio Eduardo Naretto Rangel. Dr. USU

---

Áurea Maria Lage de Moraes. Dr. FIOCRUZ

---

Viviane Zahner. Dr. FIOCRUZ

*Dedico este trabalho  
a Deus, que orientou os meus passos,  
a meus pais, a Alessandra,  
e a todos que fizeram parte dele.*

*“ Como sistemas biológicos, as sociedades humanas buscam fazer o melhor possível para evitar mutações e guardar as formas básicas intactas. Mas há uma instituição humana que não é conservadora. Esta instituição é a ciência. Por sua própria natureza, a pesquisa científica está sempre mudando a sociedade ao descobrir novas coisas, inventar novas idéias. Enquanto todas as outras instituições são essencialmente voltadas para trás, tentando preservar o passado, a pesquisa científica está inerentemente voltada para frente, buscando o futuro, tentando achar o que poderia existir depois da próxima colina .”*

*Bova (1998)*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus* por orientar e sustentar os meus passos, guiando-me por um caminho bom. Agradeço a *Profa. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt* pelos sábios ensinamentos que conduziram este trabalho e pela afetuosa relação que compartilhamos. Obrigado pela confiança depositada em mim! Agradeço também ao *Dr. Donald W. Roberts* pela orientação dedicada a este trabalho, e pela pessoa maravilhosa que é. A *Dra. Áurea Maria Lage de Moraes* pela orientação, confiança e incentivos. Obrigado mesmo! A *Dra. Raquel da Silva Pacheco* que se fez sempre presente com sábias críticas a este trabalho. Agradeço ao *Dr. Drauzio Eduardo Naretto Rangel* que me transmitiu muitos ensinamentos e foi um grande companheiro em Utah. Obrigado por tudo! A *Dra. Gisela Lara da Costa* que esteve sempre pronta a ajudar. Aos amigos de laboratório, agradeço a *Isabele da Costa Angelo* que foi meu “braço forte” na Rural. Nossa! Obrigado mesmo! Ao meu grande e velho amigo *Thiago Campanharo Bahiense* agradeço por acompanhar passo a passo esta trajetória e pela nossa amizade cada vez maior. Valeu amigo! Agradeço também a *Ana Paula Rodrigues Moraes*, a *Andréia Loureiro Musso Terra*, e ao *Wendell Marcelo de Souza Perinotto* pelas longas horas de dedicação nos bioensaios, e pela nossa amizade, claro! Agradeço a todos os professores, funcionários e alunos do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Aos amigos do Departamento de Micologia da Fundação Oswaldo Cruz, em especial as “meninas”: *Verônica Leite de Holanda Gomes Coutinho* que me ensinou a técnica de isoenzimas e muito me auxiliou nos experimentos, a *Renata Buarque Fernandes*, a *Marcelly Maria dos Santos Brito*, *Bárbara Graziela* e *Mônica de França Guedelha* pelo apoio em todos os momentos e pela nossa amizade. Vocês são 10! Agradeço a todos do Laboratório de Sistemática Bioquímica da Fundação Oswaldo Cruz, e em especial a *Marize Quinhones Pires* pelo precioso auxílio na fase experimental da análise molecular. Agradeço também àqueles que não estavam presentes nas salas de aula, nem nos experimentos, mas muito que me ajudaram. Agradeço a meus pais, *Evaldo Fernandes* e *Bibiana Kort Kamp Fernandes*, que nunca mediram esforços para oferecer sempre o melhor para mim e meus irmãos, pelo exemplo de lar que nos forneceu e pelo exemplo de vida que são para mim. Esta vitória é fruto da dedicação de vocês! A meus irmãos *Evaldo* e *Evandro Kort Kamp Fernandes* que sempre se preocupam comigo. Agradeço de forma especial a minha esposa *Alessandra Mendes Kort Kamp Fernandes* pelo companheirismo sem medida. Sem comentários... O que seria de mim sem você? Amo você! Agradeço a meu amigo *Léo Soares Vianna* e ao meu amigo e colega *Mário César Guedes Chavão* por serem presentes na minha vida. Tenho certeza que vocês aprenderam algo de *Beauveria* e *Boophilus*, não é possível! Agradeço a *Alene Alder Rangel* pela nossa amizade, pelos ensinamentos e correções nos textos em inglês. Você é especial! Agradeço ao CNPq pelo auxílio financeiro que foi fundamental para realização deste trabalho. A todos vocês meus sinceros agradecimentos!!

## **BIOGRAFIA**

Éverton Kort Kamp Fernandes, filho de Evaldo Fernandes e Bibiana Kort Kamp Fernandes, nasceu no dia 8 de janeiro de 1978, na cidade de São Gonçalo – RJ.

Em agosto de 1996 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, no curso de Medicina Veterinária e o concluiu em setembro de 2001. Durante esses anos foi monitor da disciplina de Doenças Parasitárias e estagiário do Laboratório de Controle Microbiano da UFRRJ, permitindo que logo em seguida fosse bolsista de Iniciação Científica PIBIC / CNPq pelo Departamento de Micologia da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

Em março de 2002 iniciou o Mestrado no Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ com Área de Concentração em Parasitologia Veterinária. Foi bolsista CAPES e beneficiado pelo programa bolsa nota dez da FAPERJ. O Mestrado foi concluído em julho de 2003, e ainda neste mês foi iniciado o Doutorado na mesma instituição e sob a mesma orientação da Dra. Vânia R. E. P. Bittencourt. Nesta ocasião foi bolsista CNPq e contou com a orientação de pesquisadores da FIOCRUZ. Em julho de 2005 foi contemplado com uma bolsa de Doutorado Sanduíche pelo CNPq de sete meses de duração, o que permitiu executar parte dos experimentos de tese na Universidade do Estado de Utah - USU, nos Estados Unidos, sob orientação do Dr. Donald W. Roberts.

Durante esses anos tem participado de Congressos e Simpósios Científicos e publicado artigos em periódicos indexados nacionais e internacionais.



## RESUMO

FERNANDES, Éverton Kort Kamp. **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.

*Beauveria bassiana* é um fungo entomopatogênico utilizado em várias partes do mundo como agente de controle biológico de artrópodes. Baseado nisso, o presente estudo buscou caracterizar diversos isolados de *B. bassiana* e selecionar aqueles com maior potencial para controlar populações de carrapatos e outros artrópodes em condições naturais. Neste sentido, 53 isolados de *B. bassiana* e mais sete isolados incluindo cinco espécies de *Beauveria* spp. e uma de *Engyodontium album* (= *Beauveria alba*) foram estudadas. Esses isolados foram oriundos de várias regiões geográficas brasileiras e estrangeiras, e de diferentes hospedeiros ou substratos. Os isolados foram inicialmente avaliados morfológicamente e quanto ao potencial de produção de conídios. Em seguida, buscou-se investigar a diversidade genética dos isolados brasileiros de *B. bassiana*, avaliar a distribuição espacial de genótipos, e conhecer a relação genética entre os isolados das diferentes espécies. Para esta finalidade os isolados foram submetidos as técnicas de eletroforese de isoenzimas, AFLP-PCR e seqüenciamento de regiões ITS1 e ITS2. Os resultados permitiram a confirmação taxonômica dos isolados e a seleção daqueles com maior capacidade de produção de conídios. Permitiram também detectar grande variabilidade genética entre os isolados de *B. bassiana* indicando que este fungo representa um agregado de espécies. Além disso, a distância genética detectada entre os isolados foi fortemente relacionada a distância geográfica de origem dos isolados. Posteriormente, os isolados também foram avaliados quanto a tolerância à radiação UV-B, tolerância ao calor e atividade ao frio. Tanto o calor quanto o frio são fatores abióticos ambientais que restringem o uso de fungos como agentes de biocontrole, enquanto a radiação solar, particularmente UV-B, é o maior fator ambiental que pode afetar negativamente a ação deste entomopatógeno. Neste sentido, foi observada alta variabilidade entre os isolados analisados em relação à tolerância a UV-B após duas horas de exposição à radiação, obtendo-se percentuais de germinação de conídios que variaram entre 0% e aproximadamente 80%. Além disso, foi observado atraso na germinação dos conídios, e revelado que os isolados originados de baixas latitudes tenderam a apresentar menor tolerância a UV-B do que aqueles provenientes de latitudes mais elevadas. Foi também encontrada alta variabilidade em termotolerância dos conídios após duas horas de exposição a 45 °C, variando entre baixa, média e alta viabilidade. Os conídios mais resistentes não toleraram exposição entre 44 °C e 45 °C por seis horas. Quando submetidos a 5 °C a maioria dos isolados apresentaram atividade. Os isolados de *B. bassiana* obtidos de latitudes mais elevadas foram mais ativos ao frio do que aqueles originados próximos à linha do equador. Além disso, os isolados também foram avaliados quanto ao potencial virulento sobre larvas de *Boophilus microplus*, e neste sentido foi possível diferenciá-los em baixa, média e alta virulência. Foi detectado também que diferentes populações desta espécie de carrapato podem manifestar diferentes níveis de suscetibilidade à infecção por *B. bassiana*. Neste sentido, o presente estudo permitiu selecionar isolados deste entomopatógeno com maior potencial para o controle biológico de *B. microplus* e outros artrópodes em condições de campo.

**Palavras-chave:** controle biológico, *Boophilus microplus*, *Beauveria* spp.

## ABSTRACT

FERNANDES, Éverton Kort Kamp. **Characterization and selection of *Beauveria bassiana* isolates to microbiological control of *Boophilus microplus* tick.** 2007. 130p Thesis (Doctor Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

*Beauveria bassiana* is an entomopathogenic fungus used worldwide as a biological control agent of pest arthropods. The present study aimed at characterizing several isolates of *B. bassiana* and selects those with major potential to control ticks' population and other arthropods under natural conditions. Thus, 53 isolates of *B. bassiana* and 7 isolates including 5 other *Beauveria* spp. and 1 *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) were investigated. These isolates were originally from different regions of Brazil and other nations, and different hosts or substrate. Initially, all the isolates were morphologically analyzed and investigated about the potential of conidial production. Afterwards, experiments were conducted to investigate the genetic diversity of Brazilian isolates of *B. bassiana*, to evaluate the spatial distribution of genotypes, and to understand the genetic relationship among isolates of different species of *Beauveria*. Thus, all isolates were analyzed by isozymes electrophoresis, AFLP-PCR and sequencing of ITS1 and ITS2 regions. The results have permitted the taxonomic identification of isolates and the selection of those with major potential to conidial production. The results have also showed the detection of high genetic variability among *B. bassiana* isolates, indicating that this fungus represents a species aggregate. Furthermore, the genetic distance among isolates was directly related to the geographic distances. In addition, the isolates were evaluated to UV-B tolerance, heat tolerance, and cold activity. Heat and cold are two abiotic factors of the environment that restrict the use of entomopathogenic fungi as agents for biological control of insects. In addition, solar radiation, particularly the UV-B wavelength, is a major environmental factor that can negatively affect this entomopathogenic fungus in the field. High variability in UV-B tolerance was detected among the isolates after 2 h of radiation exposure. Conidial relative germination ranged from 0% to almost 80%, and a delayed germination was detected. Moreover, isolates of *B. bassiana* originating from lower latitudes tended to have lower UV-B tolerance than isolates from higher latitudes. A high variability in thermotolerance was also observed among the isolates after 2 h of heat exposure at 45 °C, ranging from low, to medium, to high viability. The thermal death point of most resistant isolates was between 44 °C and 45 °C after 6 h of heat exposure. At cold temperatures most of the isolates grew at 5 °C. An attempt to correlate the latitude of origin with thermotolerance or cold activity indicated that isolates from higher latitudes were more cold-active than isolates from nearer the equator. The present study also evaluated the virulence of the isolates toward *Boophilus microplus* larvae, and virulence ranged from very low to very high. It was observed that different populations of *B. microplus* may present different susceptibility to *B. bassiana* infection. Therefore, the present study has selected isolates of this entomopathogenic fungus with major effective potential to control *B. microplus* and other pest arthropods under environmental conditions.

**Key-words:** biological control, *Boophilus microplus*, *Beauveria* spp.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Isolados de *Beauveria bassiana* e “outgroup” com isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*), seus hospedeiros ou substratos, regiões geográficas de origem, ano de isolamento e coleção de cultura procedente. .... 17

**Tabela 2.** Cultivo dos isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) em meio Aveia ágar sob temperaturas e períodos variáveis de acordo com a espécie. .... 18

### CAPÍTULO II

**Tabela 1.** Isolados de *Beauveria bassiana* e “outgroup” com isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*), seus hospedeiros ou substratos, regiões geográficas e latitudes de origem, ano de isolamento e coleção de cultura procedente. .... 31

**Tabela 2.** Soluções tampão utilizadas nos eletrodos e nos géis para a eletroforese de isoenzimas. .... 33

**Tabela 3.** Sistemas de revelação das 16 enzimas que demonstraram bandas bem definidas e constantes, e tiveram os perfis de isoenzimas analisados. .... 35

**Tabela 4.** Informações dos oligonucleotídeos utilizados na AFLP. .... 37

**Tabela 5.** Eletromorfos encontrados em *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) através de análise isoenzimática. .... 40

### CAPÍTULO III

**Tabela 1.** Isolados de *Beauveria bassiana* e “outgroup” com isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*), seus hospedeiros ou substratos, regiões geográficas e latitudes de origem, ano de isolamento e coleção de cultura procedente. .... 61

**Tabela 2.** Isolados de *Metarhizium anisopliae*, seus hospedeiros ou substratos, regiões geográficas e latitudes de origem, ano de isolamento e coleção de cultura procedente. .... 62

### CAPÍTULO IV

**Tabela 1.** Isolados de *Beauveria bassiana* e “outgroup” com isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*), seus hospedeiros ou substratos, regiões geográficas e latitudes de origem, ano de isolamento e coleção de cultura procedente. .... 78

### CAPÍTULO V

**Tabela 1.** Isolados de *Beauveria bassiana* e “outgroup” com isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium album* (= *Beauveria alba*), seus hospedeiros ou substratos, regiões geográficas de origem, ano de isolamento e coleção de cultura procedente. .... 91

**Tabela 2.** Percentual médio de mortalidade das larvas de *Boophilus microplus* obtido no primeiro bioensaio 30 dias após exposição aos diferentes isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) ( $P < 0,05$ ). Experimento realizado sob condições controladas de  $27 \pm 1$  °C e Umidade Relativa superior a 80%. ..... 95

**Tabela 3** Concentração letal (CL50 e CL90) dos diferentes isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) obtida no primeiro bioensaio com larvas de *Boophilus microplus* 30 dias após tratamento. Experimento realizado sob condições controladas de  $27 \pm 1$  °C e Umidade Relativa superior a 80%. ..... 98

**Tabela 4.** Concentração letal (CL50 e CL90) dos isolados de *Beauveria bassiana* obtida no segundo bioensaio com larvas de *Boophilus microplus* aos 10, 20 e 30 dias após tratamento. Experimento realizado sob condições controladas de  $27 \pm 1$  °C e Umidade Relativa superior a 80%. ..... 106

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

**Tabela 1.** Resumo do desempenho de cada um dos isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*). ..... 112

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Colônias de *Beauveria bassiana* cultivadas em meio aveia ágar, apresentando tamanhos e aspectos variados. A: CG 464 – Colônia branca, lanosa e lisa, medindo 22,80 mm; B: ESALQ 986 – Colônia levemente amarelada, lanosa e zonada, medindo 22,57 mm; C: CG 66 – Colônia branca, lanosa e lisa, medindo apenas 9,48 mm; D: Bb 15 - Colônia branca, aveludada e lisa, medindo 20,39 mm; E: CG 17 - Colônia branca, aveludada e zonada, medindo 20,05 mm; F: Bb 13 – Colônia levemente amarelada, flocosa e zonada, medindo 20,10 mm; G: CG 484 – Colônia branca, flocosa e zonada, medindo 21,18 mm; H: Colônia da figura G em vista aproximada, notar presença de exsudato hialino sobre a colônia. .... 22

**Figura 2.** Isolados de *Beauveria* observados sob microscopia em magnitude de 1000 ×. Barras = 10 µm: **A:** *B. bassiana* com células conidiogênicas formando densos cachos; **B:** *B. bassiana* com células conidiogênicas em tamanhos variados e pouco agrupadas, notar presença da célula pedunculosa lateral em destaque; **C:** *B. bassiana* com célula conidiogênica solitária e com forma delgada; **D:** *B. brongniartii*; **E:** *B. amorpha*; **F:** *B. velata*; **G:** *B. vermiconia*; **H:** *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*)..... 23

**Figura 3.** Produção de conídios dos isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) cultivados em meio PDAY a 25 °C durante 20 dias em total ausência de luz. O número de conídios expressa a produção média dos isolados em uma área de 0,589 cm<sup>2</sup> da cultura. O desvio padrão foi baseado em dois ensaios. .... 24

### CAPÍTULO II

**Figura 1.** Dendrograma baseado nos perfis isoenzimáticos dos isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* utilizando-se o Coeficiente de Concordância Simples (Simple Match Coefficient) e algoritmo de agrupamento UPGMA. .... 43

**Figura 2.** Dendrograma gerado pela análise de “Bootstrap” com 1000 repetições e baseado nos perfis isoenzimáticos dos 60 isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus*. .... 44

**Figura 3.** Dendrograma baseado na Distância Genética de Nei entre os isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus*. .... 45

**Figura 4.** Posição espacial dos isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria bassiana*) baseada na Análise de Coordenadas Principais. .... 47

**Figura 5.** Dendrograma baseado nos perfis de amplificação dos 53 isolados de *Beauveria bassiana* por análise de AFLP utilizando-se o Coeficiente de Concordância Simples e algoritmo de agrupamento UPGMA. .... 48

**Figura 6.** Estrutura populacional dos isolados brasileiros de *Beauveria bassiana* revelado pelo teste de Mantel. .... 49

**Figura 7.** Dendrograma baseado nos perfis de amplificação dos sete isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) pertencentes ao “outgroup” e o isolado ARSEF 252 de *Beauveria bassiana* por análise de AFLP utilizando-se o Coeficiente de Jaccard e algoritmo de agrupamento UPGMA. .... 50

**Figura 8.** Dendrograma de “Neighbour-joining” gerado através dos dados do seqüenciamento de DNA dos 23 isolados de *Beauveria bassiana* e um isolado de *Beauveria brongniartii* (ATCC 58798). .... 52

### CAPÍTULO III

**Figura 1.** Temperatura e umidade relativa monitorada com HOB0 H8 logger nas caixas de metal mantidas a 5 °C. .... 63

**Figura 2.** Germinação relativa de quatro isolados de *Beauveria bassiana* expostos a 43 °C (A) e 45 °C (B) por zero, uma, duas, três ou quatro horas. Colunas com a mesma letra em um mesmo isolado não diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ). .... 64

**Figura 3.** Germinação relativa dos isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) expostos a 45 °C por uma ou duas horas. Os isolados foram organizados a partir daqueles de menor tolerância para os de maior tolerância média a 45 °C por duas horas. Os isolados expostos por uma hora foram organizados seguindo a mesma ordem dos isolados expostos por duas horas. Notar variabilidade em termotolerância entre os isolados. .... 66

**Figura 4.** Velocidade de germinação dos conídios de *Beauveria bassiana* (Bb19) expostos a 45 °C por uma hora e dos conídios não submetidos ao calor (controle). A germinação foi avaliada a cada 12 horas após a exposição. Notar atraso na germinação dos conídios induzido pelo calor. .... 67

**Figura 5.** Curva de sobrevivência de três isolados termotolerantes de *Beauveria bassiana* expostos a 43, 44, 45, 46 e 47 °C por uma, duas, quatro e seis horas. .... 68

**Figura 6.** Germinação relativa dos isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) após incubação a 5 °C por 15 dias. Os isolados foram organizados a partir daqueles de menor atividade para os de maior atividade ao frio. .... 69

**Figura 7.** Germinação relativa dos isolados de *Metarhizium anisopliae* comparada a do isolado padrão de *B. bassiana* (ARSEF 252) após 15 dias de incubação a 5 °C. Colunas com a mesma letra em um mesmo isolado não diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ). .... 70

**Figura 8.** Relação entre latitude de origem de todos os 53 isolados de *Beauveria bassiana* e a germinação média relativa após 15 dias de incubação a 5 °C, caracterizado por um modelo cumulativo generalizado. A não germinação foi potencialmente maior nos isolados obtidos das latitudes mais baixas. .... 70

### CAPÍTULO IV

**Figura 1.** Espectro da irradiação após passagem em filme de diacetato de celulose na câmara de tratamentos com UV-B. Lâmpadas produzindo radiação UV-B à 978 mW m<sup>-2</sup>. .... 79

**Figura 2.** Germinação relativa dos isolados de *Beauveria bassiana* após exposição por 0, 30, 60 90, 120, 150 ou 180 minutos à radiação de 978 mW m<sup>-2</sup>. Colunas com a mesma letra em um mesmo isolado não diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ). ..... 81

**Figura 3.** Germinação dos conídios do isolado Bb 19 de *Beauveria bassiana* após duas horas de exposição à radiação de 978 mW m<sup>-2</sup> e dos conídios não expostos à radiação (Controle) e sua velocidade de germinação. .... 82

**Figura 4.** Tolerância dos isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) à radiação UV-B após duas horas de exposição à radiação de 978 mW m<sup>-2</sup>. Os isolados foram organizados a partir daqueles de menor tolerância para os de maior tolerância média à radiação UV-B. .... 83

**Figura 5.** Relação entre latitude de origem e a germinação média relativa dos 53 isolados de *Beauveria bassiana* após duas horas de exposição à radiação ultravioleta caracterizado por um modelo cumulativo generalizado ( $P < 0,0001$ ). ..... 84

## CAPÍTULO V

**Figura 1.** Percentuais de mortalidade das larvas de *Boophilus microplus* obtidos no primeiro bioensaio 30 dias após exposição a  $1,0 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> dos diferentes isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*). Experimento realizado sob condições controladas de  $27 \pm 1$  °C e Umidade Relativa superior a 80%. O desvio padrão foi baseado nos resultados obtidos no ensaio e na sua respectiva repetição. .... 97

**Figura 2.** Percentuais de mortalidade das larvas de *Boophilus microplus* obtidos no primeiro (A) e no segundo bioensaios (B) após exposição a  $1,0 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> do isolado Bb 23 de *Beauveria bassiana*. Experimentos realizados sob condições controladas de  $27 \pm 1$  °C e Umidade Relativa superior a 80%. O desvio padrão foi baseado nos resultados obtidos no ensaio e na sua respectiva repetição. .... 101

**Figura 3.** Percentuais de mortalidade das larvas de *Boophilus microplus* obtidos no primeiro (A) e no segundo bioensaios (B) após exposição a  $1,0 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> do isolado Bb 44 de *Beauveria bassiana*. Experimentos realizados sob condições controladas de  $27 \pm 1$  °C e Umidade Relativa superior a 80%. O desvio padrão foi baseado nos resultados obtidos no ensaio e na sua respectiva repetição. .... 102

**Figura 4.** Percentuais de mortalidade das larvas de *Boophilus microplus* obtidos no primeiro (A) e no segundo bioensaios (B) após exposição a  $1,0 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> do isolado ESALQ 986 de *Beauveria bassiana*. Experimentos realizados sob condições controladas de  $27 \pm 1$  °C e Umidade Relativa superior a 80%. O desvio padrão foi baseado nos resultados obtidos no ensaio e na sua respectiva repetição. .... 103

**Figura 5.** Percentuais de mortalidade das larvas de *Boophilus microplus* obtidos no primeiro (A) e no segundo bioensaios (B) após exposição a  $1,0 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> do isolado ESALQ 747 de *Beauveria bassiana*. Experimentos realizados sob condições controladas de  $27 \pm 1$  °C e Umidade Relativa superior a 80%. O desvio padrão foi baseado nos resultados obtidos no ensaio e na sua respectiva repetição. .... 104

**Figura 6.** Percentuais de mortalidade das larvas de *Boophilus microplus* obtidos no primeiro (A) e no segundo bioensaios (B) após exposição a  $1,0 \times 10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  do isolado CG 480 de *Beauveria bassiana*. Experimentos realizados sob condições controladas de  $27 \pm 1$  °C e Umidade Relativa superior a 80%. O desvio padrão foi baseado nos resultados obtidos no ensaio e na sua respectiva repetição. .... 105



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
“Caracterização morfológica de isolados de <i>Beauveria</i> spp. e avaliação da produção de conídios”	<b>12</b>
Resumo	13
Abstract	14
1 Introdução	15
2 Material e métodos	16
2.1 Local e período de execução dos experimentos	16
2.2 Isolados estudados	16
2.3 Caracterização morfológica dos isolados	16
2.4 Avaliação da produção de conídios	19
3 Resultados	19
3.1 Caracterização morfológica dos isolados	19
3.2 Avaliação da produção de conídios	21
4 Discussão	21
<b>CAPÍTULO II</b>	
“Caracterização molecular de isolados de <i>Beauveria</i> spp.”	<b>26</b>
Resumo	27
Abstract	28
1 Introdução	29
2 Material e métodos	30
2.1 Local e período de execução dos experimentos	30
2.2 Isolados estudados	30
2.3 Análise isoenzimática	30
2.4 Análise de AFLP	34
2.5 Seqüenciamento de rDNA	38
3 Resultados	39
3.1 Análise isoenzimática	39
3.2 Análise de AFLP	46
3.3 Seqüenciamento de rDNA	51
4 Discussão	51
<b>CAPÍTULO III</b>	
“Seleção de isolados de <i>Beauveria</i> spp. termotolerantes e com atividade ao frio”	<b>56</b>
Resumo	57
Abstract	58
1 Introdução	59
2 Material e métodos	59
2.1 Local e período de execução dos experimentos	59
2.2 Isolados estudados	60
2.3 Efeito do calor sobre a germinação relativa	60
2.4 Efeito da baixa temperatura sobre a germinação	60
2.5 Análise estatística	63
3 Resultados	64
3.1 Seleção de temperatura e tempo de exposição	64
3.2 Variação em termotolerância entre os isolados	65
3.3 Efeito do calor sobre o desenvolvimento do tubo germinativo	65
3.4 Limites de tolerância ao calor em <i>B. bassiana</i>	65
3.5 Correlações entre termotolerância e atividade ao frio	65
3.6 Correlação entre latitude de origem e termotolerância	70
4 Discussão	71

<b>CAPÍTULO IV</b>	
“Seleção de isolados de <i>Beauveria</i> spp. tolerantes à radiação UV-B”	<b>73</b>
Resumo	74
Abstract	75
1 Introdução	76
2 Material e métodos	77
2.1 Local e período de execução dos experimentos	77
2.2 Isolados estudados	77
2.3 Germinação relativa dos conídios expostos à radiação UV-B	77
2.4 Análise estatística	80
3 Resultados	80
3.1 Seleção da dose	80
3.2 Velocidade de germinação dos conídios	80
3.3 Tolerância dos isolados de <i>Beauveria</i> spp. e <i>E. albus</i> à UV-B	81
3.4 Correlação entre tolerância à radiação UV-B e a latitude de origem dos isolados de <i>B. bassiana</i>	81
4 Discussão	84
<b>CAPÍTULO V</b>	
“Avaliação da virulência de isolados de <i>Beauveria</i> spp. sobre larvas de <i>Boophilus microplus</i> ”	<b>86</b>
Resumo	87
Abstract	88
1 Introdução	89
2 Material e métodos	90
2.1 Local e período de execução dos experimentos	90
2.2 Isolados estudados	90
2.3 Obtenção das larvas de <i>Boophilus microplus</i>	90
2.4 Preparo das suspensões e viabilidade dos conídios	92
2.5 Infecção <i>in vitro</i> de larvas de <i>Boophilus microplus</i>	93
2.6 Isolamento dos fungos após bioensaios	93
2.7 Análise estatística e próbites	94
3 Resultados	94
3.1 Viabilidade dos conídios	94
3.2 Virulência dos isolados sobre larvas de <i>Boophilus microplus</i>	94
3.3 Isolamento dos fungos após bioensaios	96
4 Discussão	107
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	<b>109</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>111</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>116</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

*Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 é um fungo entomopatogênico de ocorrência generalizada, sendo o mais freqüente sobre insetos e amostras de solo. Esta espécie possui uma ampla variedade de insetos hospedeiros, e por isso é considerado um patógeno generalista. Esta ampla distribuição e variedade de hospedeiros têm indicado este entomopatógeno como um bom candidato para o controle microbiano de insetos e outros artrópodes.

Diversos estudos têm comprovado o potencial de *B. bassiana* para controle de diferentes espécies de carrapatos. A maioria desses estudos considera a virulência como fator primordial para eleição de isolados em programas de biocontrole. No entanto, esses estudos são realizados, em sua maioria, em condições laboratoriais as quais muitas vezes não refletem as condições reais do controle microbiano no meio ambiente. Baseado nisso, o presente estudo propõe investigar diferentes aspectos que indiquem isolados do entomopatógeno *B. bassiana* como promissores agentes de biocontrole. Neste sentido, o presente estudo reuniu isolados de *Beauveria* spp. originados de diferentes hospedeiros e regiões geográficas, e buscou caracterizá-los através de análise morfológica, da capacidade de produção de conídios, e através da verificação da variabilidade genotípica. Além disso, buscou selecionar isolados de *B. bassiana* com maior potencial para controle do carrapato *Boophilus microplus* em condições de campo. Para isso, os isolados foram avaliados quanto sua tolerância ao calor e a radiação ultravioleta, e quanto ao potencial virulento para larvas de *B. microplus*. Cada um desses assuntos será abordado separadamente em capítulos, e em uma etapa final serão concluídas as informações discutidas acerca deste tema. Sendo assim, o presente estudo tem o intuito de orientar futuros estudos na área de controle microbiano de carrapatos sob as condições naturais de países tropicais.

### O controle do carrapato *Boophilus microplus*

O carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) é conhecido como o carrapato dos bovinos, e segundo Wharton (1974), é originário da Ásia, introduzido na maioria dos países tropicais e subtropicais através da importação de gado bovino.

*Boophilus microplus* é uma espécie de carrapato parasita de um único hospedeiro, no qual seu ciclo evolutivo pode ser dividido em duas fases: uma parasitária e outra não parasitária. A primeira é iniciada pela fixação das larvas no hospedeiro suscetível e finalizada quando os adultos, incluindo as fêmeas fecundadas e ingurgitadas, desprendem-se do hospedeiro e caem ao chão. A fase não parasitária do ciclo representa a segunda etapa, que é marcada pela oviposição das fêmeas no chão seguida da eclosão das larvas e do acesso destas ao hospedeiro suscetível (WHARTON, 1974).

A distribuição do carrapato *B. microplus* ocorre entre os paralelos 32° Norte e 32° Sul compreendendo, portanto, a América Central, América do Sul, Austrália, Oriente, Sul da Flórida e África (GONZÁLES, 2002). A ocorrência e a dispersão do carrapato em bovinos no Brasil são favorecidas por fatores climáticos, com exceção do período do inverno na região sul do país, e pela maior disponibilidade de raças sensíveis como é o caso das raças européias taurinas e de seus cruzamentos (GRISI *et al.*, 2002).

As perdas econômicas anuais causadas pelo carrapato *B. microplus* no Brasil podem ultrapassar os dois bilhões de dólares (GRISI *et al.*, 2002). Esse cálculo foi baseado em um estudo elaborado por Horn (1983) com base em informações colhidas junto às Secretarias de Agricultura nos Estados e considerando o crescimento do rebanho bovino de 76 milhões de cabeças em 1983 para 169 milhões no ano de 2000. Os prejuízos causados pelo carrapato *B.*

*microplus* estão relacionados à mortalidade, diminuição no ganho de peso, efeitos sobre o couro, gastos com carrapaticidas e diminuição na produção de leite (GRISI *et al.*, 2002). Além disso, pode-se citar a predisposição ao surgimento de miíases e a transmissão de patógenos causadores da anaplasmose e babesiose (HORN; ARTECHE, 1985).

Já na década de 60 os produtos carrapaticidas eram largamente difundidos e empregados, sendo considerado o principal método de controle de carrapatos (WHARTON, 1967). Penna (1990) expõe que no tratamento convencional, geralmente empregado pelos criadores, os animais são banhados com esses produtos quando o número de fêmeas ingurgitadas nos animais atinge um nível pré-determinado. Este mesmo autor relata que, além de problemas de custo e de mão-de-obra, de contaminação da carne, do leite e do meio ambiente, o controle baseado apenas no uso de acaricidas contribui para o desenvolvimento da resistência dos carrapatos aos acaricidas.

González (2002) em uma revisão histórica e conceitual do carrapato dos bovinos, conclui que na manifestação do fenômeno da resistência aos produtos químicos, os carrapatos e demais parasitas exercem o papel de “denúncia” contra os inadequados procedimentos dos homens.

No empenho em diminuir o emprego desses produtos, e os problemas por eles acarretados, Barros e Evans (1989), afirmaram a necessidade da utilização de métodos alternativos a serem empregados em sistemas integrados para o controle desse carrapato.

Outros métodos de controle de carrapatos incluem a rotação de pastagens, a criação de animais de raças resistentes aos carrapatos, o controle biológico, o uso de pastagens que matam ou diminuem a sobrevivência das larvas, a introdução de machos estéreis na população, além de atividades como a queimada. No entanto, alguns desses métodos são deficientes ou contra-indicados (PENNA, 1990). O controle biológico é uma alternativa promissora para o controle de *B. microplus*, e de outros carrapatos, que vem sendo examinada por pesquisadores no Brasil e no mundo com o propósito de comprovar exaustivamente sua eficiência, segurança e praticidade de aplicação.

Tais métodos não devem ser encarados como método único de controle, mas sim como parte de um programa de medidas com o objetivo de reduzir as populações de carrapato, evitando danos econômicos, ao ambiente e a saúde animal e humana.

Segundo Chandler *et al.* (2000), os micopesticidas têm-se mostrado bastante eficientes contra várias pestes, particularmente onde o uso de pesticidas químicos é inadequado, devido ao desenvolvimento de resistência ou por causarem danos ao ambiente. Exemplos incluem o uso de *Simplicillium lanosoniveum* (= *Verticillium lecanii*) contra os pulgões e mosca branca que atacam estufas para plantas (QUINLAN, 1988), *Metarhizium* spp. contra baratas, gafanhotos e cupins (ZIMMERMAN, 1993; HARMON, 1994; BATERMAN, 1997; MILNER *et al.*, 1998), e *Beauveria brongniartii* para controlar o besouro *Melolontha melolontha* (KELLER, 1992).

Ácaros e carrapatos também são suscetíveis a fungos entomopatogênicos, e existem oportunidades para explorar esses microorganismos para o controle biológico. Existem registros de 58 espécies de fungos infectando pelo menos 73 espécies de acarinos, naturalmente ou em experimentos. Fungos têm sido relatados por causar mortalidade em representantes de todas as ordens de Parasitiformes - Gamasida (=Mesostigmata) e Ixodida - e de Acariformes - Astigmata (=Acaridida) e Actinedida (=Prostigmata) (CHANDLER *et al.*, 2000).

Os fungos entomopatogênicos geralmente infectam seus hospedeiros através de esporos especializados que se fixam para germinar e penetrar o tegumento. O fungo penetrante se multiplica na hemocele do hospedeiro, e a morte deste ocorre geralmente dentro de três a dez dias após a infecção por perda de água, privação de nutrientes, danos mecânicos graves e ação de toxinas. Sob condições favoráveis, o fungo esporula amplamente sobre o

cadáver para facilitar novas infecções na população de hospedeiros e então continuar o ciclo da doença (CHANDLER *et al.*, 2000).

Os principais fungos entomopatogênicos citados na literatura são as espécies *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. São espécies patogênicas para várias pragas de plantas cultivadas no Brasil e têm sido testadas no controle microbiano de vários artrópodes de importância médica e veterinária.

A espécie *B. bassiana* (Ascomycota: Clavicipitaceae) é de ocorrência generalizada em todos os países, sendo a mais freqüente sobre insetos e amostras de solo, onde pode subsistir por longo tempo em saprogênese. Em condições de laboratório, pode colonizar a maioria dos insetos, sendo que em campo ocorre de forma enzoótica e epizoótica. A infecção ocorre naturalmente via tegumento, onde o fungo germina em doze a dezoito horas, dependendo da presença de nutrientes, como por exemplo, glicose, quitina e nitrogênio, entre outros (ALVES, 1998).

Samsinakova (1957) foi o primeiro a relatar a ocorrência do fungo *B. bassiana* sobre carrapatos, onde uma fêmea de *Ixodes ricinus* coletada no campo foi naturalmente infectada por este fungo. A fêmea realizou postura normalmente e após a sua morte foi verificado a presença de hifas projetando-se de sua abertura oral. Em seguida, Boycev e Rizvanov (1960) observaram que *B. bassiana* inviabilizava os ovos desta espécie de carrapato, e isso foi demonstrado ao colocar uma cultura do fungo juntamente com fêmeas em postura. Após vinte dias todas as fêmeas estavam mortas e havia uma postura média de 750 ovos, o qual o percentual de eclosão foi de apenas 6,5%. Gorskova (1996) também verificou infecção por *B. bassiana* promovendo diminuição do percentual de eclosão de larvas de *I. ricinus* e mortalidade de larvas variando entre 86% e 100%. Resultados satisfatórios foram obtidos também em estudos realizados com *Hyalomma* sp. (TIAN, 1984), demonstrando o potencial patogênico deste entomopatógeno também para esta espécie de carrapato.

Mwangi *et al.* (1995) estudaram a infecção de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em todos os estádios de desenvolvimento do carrapato *Rhipicephalus appendiculatus* em condições laboratoriais, e os isolados de *B. bassiana* foram mais patogênicos para os estádios não alimentados do carrapato. Também Kaaya *et al.* (1996) avaliaram a infecção dessas espécies de fungos sobre fêmeas ingurgitadas de *R. appendiculatus* e observaram 85% a 99% de redução da fecundidade. Os autores concluíram que tais fungos possuem elevada atividade acaricida e persistência de uma a três semanas após a aplicação dentro do pavilhão auditivo de bovinos naturalmente infestados.

Bittencourt *et al.* (1996) verificaram a patogenicidade *in vitro* de dois isolados de *B. bassiana* sobre ovos e larvas do carrapato *B. microplus*. Os isolados ESALQ 986 e ESALQ 747 foram obtidos de carrapato naturalmente infectado, e da formiga *Solenopsis invicta*, respectivamente. Os autores observaram redução do percentual médio de eclosão das larvas nos grupos de ovos tratados com ambos os isolados, e um percentual de mortalidade das larvas variando entre 18,8% e 88,0%. Os mesmos isolados foram avaliados por Bittencourt *et al.* (1997) quanto à ação sobre fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* e observaram uma tendência à diminuição dos índices de eficiência reprodutiva e nutricional de acordo com o aumento na concentração de conídios.

A eficácia de *B. bassiana* e *M. anisopliae* também foi avaliada sobre outras espécies de carrapatos como *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Ixodes scapularis*. Infecções controladas promoveram 50 a 70% de mortalidade de adultos de *I. scapularis* e *R. sanguineus*, no entanto, este percentual foi menor que 20% em *D. variabilis* mesmo após um período de 28 dias de infecção. Em contrapartida, ninfas de *R. sanguineus* foram altamente sensíveis a ambos entomopatógenos, mostrando mais de 90% de mortalidade em 21 a 28 dias de infecção. Ninfas de *D. variabilis* e *I. scapularis* foram menos sensíveis e apresentaram 20 a 40% e 45% de mortalidade, respectivamente. Os resultados indicam que *B. bassiana* e *M.*

*anisopliae* apresentam potencial para o controle de populações destas espécies de carrapatos, no entanto, uma concentração elevada de conídios é necessária para causar infecção seguida de morte (KIRKLAND *et al.*, 2004). O efeito de *B. bassiana* também foi avaliado sobre ovos de *R. sanguineus* causando redução no percentual de eclosão das larvas (0,7 a 12% de eclosão) e no percentual de ecdise de larvas (4,7 a 33,7% de ecdise) e ninfas (0 a 16,7% de ecdise) (PRETTE *et al.*, 2005).

Souza *et al.* (1999) estudou os efeitos de ovos e larvas de *Amblyomma cajennense* expostas a diferentes concentrações dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Tanto o percentual de eclosão quanto o de mortalidade das larvas foi proporcional a concentração de conídios utilizada, ou seja, quanto maior a concentração de conídios menor o percentual de eclosão e maior o percentual de mortalidade das larvas. O percentual de mortalidade das larvas chegou a atingir 100% nos grupos tratados com elevadas concentrações de conídios.

Segundo Kaaya e Hassan (2000), fungos entomopatogênicos devem substituir os acaricidas ou serem utilizados de forma integrada para controlar *B. decoloratus* e para amenizar os problemas de indução de resistência. Além disso, o uso dos fungos entomopatogênicos no controle de carrapatos pode reduzir a frequência de aplicação de acaricidas e o uso de medicamentos contra as doenças transmitidas pelos mesmos. Esses autores concluem ainda que micopesticidas são mais seguros para o meio ambiente do que os acaricidas convencionais.

### **A variabilidade dos fungos entomopatogênicos e as técnicas para sua detecção**

A variabilidade é uma das características fundamentais dos seres vivos, pois é ela que permite a distinção de indivíduos dentro das espécies e foi ela que possibilitou o surgimento de novas espécies em resposta às modificações do ambiente durante o processo evolutivo. Em espécies que apresentam algum mecanismo de recombinação, inclusive naquelas que se reproduzem assexuadamente, existe variabilidade (AZEVEDO, 1998).

Até o início dos anos 80, a variação entre isolados era basicamente reconhecida através da avaliação da patogenicidade, da virulência e dos aspectos comportamentais. Com a utilização de técnicas bioquímicas, sorológicas e moleculares foi possível expandir o conhecimento da variabilidade intra-específica dos fungos entomopatogênicos mais utilizados no controle biológico. Todos os métodos apresentam vantagens e limitações, sendo que a escolha dependerá dos objetivos a serem atingidos no estudo, das condições de trabalho e do custo de utilização de cada técnica (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 1998).

As técnicas biomoleculares têm sido muito utilizadas para a detecção de variabilidade genética entre indivíduos, e inclusive entre isolados e espécies de fungos entomopatogênicos. Uma técnica bastante difundida é a eletroforese de multilocus enzimáticos (MLEE – “Multi Locus Enzyme Electrophoresis”), técnica também conhecida como eletroforese de isoenzimas.

Isoenzimas são diferentes formas moleculares de uma enzima catalisando a mesma reação na célula. Elas são controladas geneticamente por alelos ou genes situados em diferentes locos. Elas representam a consequência bioquímica da substituição, deleção ou adição de um ou mais aminoácidos no polipeptídeo, afetando sua carga elétrica, e consequentemente, sua mobilidade durante a eletroforese. Após sua separação por eletroforese, as isoenzimas são identificadas por meio de reações químicas baseadas em suas atividades catalíticas específicas. Cada banda revelada corresponde a uma enzima, tendo sua síntese controlada por 1, 2 ou mais genes, logo os fenótipos enzimáticos observados podem ser interpretados em termos de genótipos, ou seja, genes e seus alelos. A revelação fenótipo – genótipo baseia-se em: um gene – uma enzima, e assim diferentes bandas de uma enzima, estariam relacionadas a diferentes genes (MICALES *et al.*, 1998).

A análise isoenzimática tem sido empregada atualmente para resolver controvérsias taxonômicas, identificar *taxa* desconhecidos, reconhecer e patentear linhagens fúngicas, estimar a variabilidade em populações, traçar origem de patógenos e identificar a condição nuclear e o nível de ploidia do organismo durante o ciclo vital (MICALES *et al.*, 1998).

Através de perfis enzimáticos diversos autores detectaram a presença de variação genética em isolados de *B. bassiana* obtidos de insetos. Alguns dados indicam uma alta variabilidade genética em isolados de *B. bassiana*, sugerindo que esse grupo taxonômico pode estar representando um agregado de espécies. No entanto, em algumas situações observa-se certa homogeneidade entre isolados indicando uma estrutura clonal de populações relacionadas a um hospedeiro ou região geográfica (POPRAWSKI *et al.*, 1988; BRIDGE *et al.*, 1990; STLEGER *et al.*, 1992a).

A análise isoenzimática revelou isolados altamente polimórficos de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, no entanto, as linhagens brasileiras mostraram alta similaridade indicando um grupamento geográfico (STLEGER *et al.*, 1992b). Em concordância, Bidochka *et al.* (2002) observaram perfis enzimáticos de *B. bassiana* relacionados com a preferência por habitat. Um grupo de isolados geneticamente semelhantes apresentava isolados obtidos de regiões de agricultura, em dois outros grupos os isolados eram oriundos de regiões de floresta, e um último grupo eram oriundos de regiões árticas do Canadá.

A análise isoenzimática empregada para isolados de duas espécies de *Tolyocladium* muito semelhantes morfológicamente confirmou a separação entre as espécies analisadas e revelou uma variabilidade intra-específica importante (RIBA *et al.*, 1986b). Resultados similares foram também observados por Tigano-Milani *et al.* (1995b) ao estudarem duas espécies de *Isaria*, confirmando assim a eficiência da técnica de eletroforese de isoenzimas na taxonomia de isolados fúngicos.

O desenvolvimento da biologia molecular também permitiu o surgimento de diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível do DNA. A tecnologia de PCR (“Polymerase Chain Reaction” ou Reação em Cadeia da Polimerase) foi concebida por Kary Mallis em meados da década de 80 e desde sua concepção esta tecnologia causou uma verdadeira revolução na biologia, tanto na pesquisa visando o entendimento de processos biológicos fundamentais, como nas áreas aplicadas envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de plantas e animais domésticos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A técnica de PCR é muito semelhante ao princípio natural de replicação do DNA. Ela se baseia na hibridização e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados como “primers” (iniciadores) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Estes “primers” são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas que flanqueiam a região alvo. O objetivo da reação em cadeia da polimerase não é reproduzir a seqüência inteira de DNA, mas consiste na replicação sucessiva de uma região específica do DNA na presença da enzima DNA polimerase, permitindo uma amplificação que segue uma progressão geométrica de maneira que após apenas 20 ciclos é produzido mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de seqüência escolhida. Os fragmentos resultantes da amplificação são separados por eletroforese em gel de agarose ou de acrilamida diferenciados pelo seu tamanho, corados com brometo de etídio e visualizados diretamente, sob luz ultravioleta, na forma de uma banda no gel (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Segundo estes autores, a facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR, a torna particularmente poderosa para estudos genético-moleculares, envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo. Muitos métodos tradicionais de clonagem, seqüenciamento e análise de polimorfismo de DNA foram acelerados ou substituídos pelo uso de inúmeras derivações da técnica de PCR.

Uma técnica derivada da PCR é a RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA” ou polimorfismo por amplificação de segmentos ao acaso de DNA). Esta técnica foi introduzida simultaneamente por Williams *et al.* (1990) e Welsh e McClelland (1990). Diferentemente da PCR convencional, esta técnica utiliza apenas um único iniciador e não um par deles, além disso, os iniciadores utilizados são oligonucleotídeos simples, de seqüências pequenas (entre cinco e dez bases – “mers”) e arbitrárias. Por esse motivo, não requer informação prévia da seqüência alvo específica. A amplificação, só vai acontecer em regiões do DNA do espécime que são homólogas aos iniciadores em ambas as fitas, dentro de certo limite de bases. Por repetidos ciclos de amplificação obtém-se quantidades consideráveis de segmentos amplificados. A complexidade dos perfis irá variar de acordo com o número de distribuição de sítios no genoma aos quais o iniciador se hibridiza (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O estudo de Scott e Straus (2000) relata que os polimorfismos ou diferenças no padrão de bandas observados na eletroforese, podem ser causados pelos seguintes fatores: presença ou ausência de sítios de hibridização do iniciador ao DNA molde, deleção ou inserção de bases no sítio de hibridização, que alteram a habilidade destes se ligarem ao DNA, ou inserções que provocam um aumento no tamanho da seqüência a ser amplificada, que supera a capacidade da DNA polimerase que então não polimeriza novos fragmentos. Os polimorfismos podem indicar diferenças inter ou intra-específicas sendo, portanto úteis em fins diagnósticos ou na epidemiologia como marcadores moleculares.

RAPD apresenta várias vantagens que favorecem a sua utilização. Dentre elas pode-se citar a simplicidade e rapidez, uma vez que não é necessário o desenvolvimento de uma biblioteca de sondas específicas; permite gerar uma grande quantidade de polimorfismo de segmentos de DNA distribuídos por todo o genoma, mostrando inclusive regiões do DNA repetitivo; identificação de genótipos e obtenção de “fingerprint” que podem ser facilmente isolados do gel de eletroforese e mantidos na forma de biblioteca genômica *in vitro*. O fato do polimorfismo de DNA amplificado ao acaso ter natureza binária (presença ou ausência da banda), por um lado não permite a distinção de heterozigotos, por outro é uma característica excelente para a automação do processo de aquisição de dados dentro da sistemática binária de ambientes computacionais (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Esta técnica tem sido utilizada para identificar espécies e isolados de fungos entomopatogênicos (BIDOCHKA *et al.*, 1994; DRIVER *et al.*, 2000), na detecção da variabilidade entre isolados de *B. bassiana* (MAUER *et al.*, 1997; CASTRILLO; BROOKS, 1998 e CASTRILLO *et al.*, 1999) assim como em *M. anisopliae* (FEGAN *et al.*, 1993 e TIGANO-MILANI *et al.*, 1995a), *M. anisopliae* var. *acridum* (= *M. flavoviridae*) (COBB; CLARKSON, 1993), *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (TIGANO-MILANI *et al.*, 1995c) e *Aspergillus* spp. (MORAES, 2003).

Bidochka *et al.* (1994) interessados na taxonomia dos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* visaram estabelecer um método prático para identificar isolados fúngicos. Estes autores, baseados em marcadores RAPD, identificaram vários isolados de *Metarhizium* agrupando-os em *M. anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* (= *M. flavoviridae*) de acordo com a presença de bandas específicas. Estes isolados não foram previamente classificados por apresentarem características morfológicas intermediárias entre estas duas variedades.

Através da RAPD, Tigano-Milani *et al.* (1995a) verificaram que isolados de *M. anisopliae* obtidos de *Deois* sp. foram muito similares, e que o genótipo dos isolados parecem estar mais relacionados ao hospedeiro do que a região geográfica de origem. Os resultados também permitiram concluir que o solo constitui grande fonte de variabilidade para *M. anisopliae* isolados de uma área específica. Neste sentido, Fungaro *et al.* (1996) também estudaram a diversidade entre isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e concluíram que os isolados obtidos de *D. flavopicta* apresentaram 87% de similaridade entre si, comparado a



uma grande diversidade observada entre os isolados obtidos do solo que apresentaram apenas 13% de similaridade, sugerindo que este fungo tem desenvolvido um certo grau de especificidade ao hospedeiro.

Mauer *et al.* (1997) examinaram isolados de *B. bassiana* obtidos de diversas espécies de Lepidoptera e Coleoptera de várias regiões geográficas por meio de análise RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição) e RAPD. Os dendrogramas de ambas as técnicas apresentaram resultados semelhantes e revelaram diferentes populações homogêneas dentro da espécie *B. bassiana*. A maioria dos isolados agrupados estavam relacionados a mesma espécie hospedeira. Os isolados foram agrupados sem consideração às regiões geográficas de origem, sugerindo que o inseto hospedeiro parece ser o fator predominante em algumas estruturas populacionais em *B. bassiana*. No entanto, alguns isolados obtidos da mesma espécie hospedeira produziram diferentes seqüências de bandas em ambas as técnicas, indicando que alguns fatores biológicos podem estar envolvidos neste processo, pois os isolados foram obtidos de diferentes áreas sendo algumas regiões frias e outras tropicais.

Tigano e Aljanabi (2000) também relatam que RAPD é um poderoso método de investigação da variabilidade genética para *Nomuraea rileyi* e contribui para um melhor conhecimento das interações entre essa espécie fúngica e seus hospedeiros.

A análise de marcadores RAPD também permite correlacionar genótipos com grupos específicos de patogenicidade. Fegan *et al.* (1993) ao estudarem a diversidade genética de *M. anisopliae* usando marcadores RAPD, evidenciaram uma considerável diversidade genética nesta espécie fúngica que, em determinadas situações, pode estar relacionada a localização geográfica dos isolados e a grupos definidos de acordo com a patogenicidade.

Uma outra vantagem da utilização da RAPD para o controle microbiano é a de permitir gerar marcadores moleculares com a finalidade de identificar precisamente os isolados introduzidos no ambiente e compará-los com os isolados de população endógena ou residente. Neste sentido, seria determinado qual isolado estaria sendo responsável pela morte dos hospedeiros sob condições de campo, demonstrando a efetividade dos agentes de biocontrole (TIGANO-MILANI *et al.*, 1995b).

Castrillo *et al.* (2003) utilizaram marcadores RAPD para pesquisar iniciadores que pudessem diferenciar o isolado GHA de *B. bassiana*, que é comercializado e utilizado como agente de controle microbiano de insetos pestes da agricultura, de outros isolados endógenos. Estes autores após testarem oitenta e oito iniciadores, quatro deles produziram bandas específicas para o isolado GHA quando comparados a outros isolados de *B. bassiana*, *B. amorpha*, *B. brongniartii* e *M. anisopliae*. Os amplicons gerados por RAPD foram clonados, seqüenciados e usados como base na construção de iniciadores. Estes iniciadores foram altamente sensíveis e capazes de detectar o DNA genômico do isolado GHA que poderão, então, ser utilizados na detecção deste isolado entre os demais fungos endógenos presentes nas amostras colhidas no campo. Dessa forma, será possível estudar a eficácia e a persistência deste isolado nos estudos de campo.

Embora a RAPD seja uma técnica simples e rápida para examinar polimorfismos, sabe-se que muitas vezes ela não permite obter resultados reproduzíveis. Isto é uma problemática, especialmente quando se compara dados obtidos em diferentes laboratórios. Muitas variações observadas têm sido atribuídas ao anelamento em baixa temperatura e ao grande número de ciclos de amplificação usados durante a reação. Bandas de RAPD também podem variar em função do uso de *Taq* polimerase e tampões de diferentes origens e/ou por conduzir reações em diferentes máquinas de PCR (SCHIERWATER; ENDER, 1993; MEUNIER; GRIMONT, 1993).

A técnica ISSR (“Inter-simple Sequence Repeat”) é similar a RAPD, mas utiliza iniciadores mais longos, com 15-20 nucleotídeos e durante a PCR é utilizada maior temperatura na etapa de anelamento (47-53 °C) do que comparado com a utilizada na RAPD (35-39 °C), o que a torna mais reproduzível (DE MURO *et al.*, 2005). Essa técnica tem sido usada com sucesso para verificar variabilidade genética em *B. bassiana* (DE MURO *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2005).

Uma alternativa estratégica é também a análise de AFLP (Amplified Fragment Length polymorphism ou Polimorfismo por Comprimento de Fragmento Amplificado) que utiliza elevada temperatura na etapa de anelamento e poucos ciclos na amplificação (BOUCIAS *et al.*, 2000). AFLP é uma nova técnica baseada em marcadores PCR para verificação de diversidade genética. AFLP gera centenas de marcadores de DNA altamente replicáveis de qualquer organismo, permitindo alta resolução na qualidade de genotipagem de “fingerprinting”. A eficiência em tempo e custo, replicabilidade e resolução da AFLP é superior ou igual àqueles de outros marcadores como isoenzimas, RAPD, RFLP e microsátélites, exceto pelo fato do AFLP gerar marcadores dominantes. Devido a sua facilidade de uso, marcadores AFLP estão emergindo com extensa aplicação em sistemática genética de população, “DNA fingerprinting” e mapeamento (MUELLER; WOLFENBARGER, 1999).

Para gerar marcadores AFLP, uma pequena quantidade de DNA genômico é cortada por duas enzimas de restrição e adaptadores são imediatamente ligados às extremidades livres. Cada extremidade de fragmento adaptado consiste da seqüência de nucleotídeos dos adaptadores mais a porção da seqüência onde atuou a enzima de restrição. Essa extremidade de seqüência conhecida atua como sítio de iniciação da AFLP. Dependendo do tamanho do genoma esta etapa de restrição e ligação gera milhares de fragmentos adaptados. Devido a alta seletividade, iniciadores diferindo em um único par de bases na extensão amplifica um diferente lote de fragmentos. O comprimento de extensão varia de acordo com o tamanho do genoma e resulta em um ótimo número de produtos, traduzidos em bandas. Utilizando combinações de iniciadores com diferentes extensões uma série de amplificações pode analisar uma fração representativa do genoma (MUELLER; WOLFENBARGER, 1999).

Essa técnica tem-se mostrado extremamente útil na detecção de polimorfismo em *Nomuraea rileyi*. A detecção da diversidade genética neste entomopatógeno tem demonstrado que os isolados tendem a se agrupar de acordo com o inseto hospedeiro e região geográfica de origem (BOUCIAS *et al.*, 2000; SUWANNAKUT *et al.*, 2005). Segundo Boucias *et al.* (2000) a técnica de AFLP demonstrou ser um método mais sensível e confiável para detecção de diferenças genéticas entre populações de *N. rileyi*.

AFLP também revelou populações clonais de *B. bassiana* no Quênia, e mostrou-se eficiente na diferenciação entre isolados de *B. brongniartii* e *B. bassiana*, demonstrando ser uma técnica sensível para identificação interespecífica de isolados (DE MURO *et al.*, 2003). Além disso, a análise AFLP indicou presença de variabilidade intra-específica em *B. bassiana* e a formação de alguns grupos associados com a região geográfica de origem dos isolados (DE MURO *et al.*, 2005).

A análise de DNA ribossomal é também uma técnica bem difundida no estudo de variabilidade genotípica. Os genes rDNA são relativamente bem conhecidos, altamente repetidos em cromossomos específicos e contém vários tipos de região. As regiões codificantes se mantêm altamente conservadas durante o processo evolutivo em todos os eucariotas (WHITE *et al.*, 1990 *apud* NEUVÉGLISE *et al.*, 1994), o que permite análises filogenéticas de organismos pouco relacionados. As regiões espaçadoras são menos conservadas e evoluem mais rápido do que as regiões codantes (NEUVÉGLISE *et al.*, 1994).

A amplificação e seqüenciamento das regiões ITS (“Internal Transcribed Spacers”) foi usada com sucesso na taxonomia de *Metarhizium* spp. (DRIVER *et al.*, 2000) e na detecção

de variabilidade genotípica em *B. brongniartii* (NEUVÉGLISE *et al.*, 1994) e *B. bassiana* (GLARE; INWOOD, 1998). Através de análise das regiões ITS1 e ITS2, Glare e Inwood (1998) observaram um grupo geneticamente distinto de *B. bassiana* contendo apenas isolados obtidos de diferentes hospedeiros da Nova Zelândia.

Neste sentido, podemos concluir que diversas análises podem ser realizadas para a caracterização de isolados fúngicos, e que a caracterização é de grande valor nos estudos de epizootiologia e de distribuição espaço temporal, permitindo avaliar sua capacidade de recombinação. Também possibilita o reconhecimento de isolados mais adaptados a um local específico, facilita o entendimento das relações patógeno-hospedeiro e traz informações relacionadas à variação e estrutura de populações. Esses aspectos são importantes quando se pretende introduzir e estabelecer um patógeno para o controle permanente de uma praga, ou quando se quer avaliar o impacto ambiental resultante da aplicação de um microorganismo. Além disso, a caracterização permite a identificação precisa de isolados, o que se tornou um pré-requisito para o registro e a obtenção da patente de um produto comercial ou de microorganismos melhorados. Isso facilita o acompanhamento da pureza durante os processos de produção e comercialização dos agentes de controle microbiano (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 1998).

### **Fatores naturais limitantes para o controle microbiano de artrópodes**

O desempenho de fungos entomopatogênicos é afetado por uma variedade de fatores ambientais, dentre eles a temperatura. A maioria dos fungos entomopatogênicos é considerada mesofílica, com crescimento entre 10 e 40 °C e temperatura ótima entre 25 e 35 °C (COONEY; EMERSON, 1964).

Elevadas temperaturas podem afetar as células em diferentes modos quando o calor é acompanhado por elevada umidade e provocar, por exemplo, a desnaturação de proteínas (SETLOW; SETLOW, 1995) e a desorganização de membrana (CRISAN, 1973). A exposição ao calor em baixa umidade causa danos ao DNA através da perda de bases e leva a depurinação (SETLOW; SETLOW, 1996).

Dimbi *et al.* (2004) relatam que a temperatura ótima observada para germinação e crescimento micelial de *M. anisopliae* foi 25 °C para todos os isolados analisados. No entanto, ensaios de patogenicidade com moscas das frutas mostraram que os isolados foram mais efetivos nas temperaturas de 25, 30 e 35 °C do que aos 20 °C, e o TL<sub>90</sub> diminuiu com o aumento da temperatura até a temperatura limite de 30 °C.

Isolados de *B. bassiana* foram testados quanto à habilidade de germinar e crescer em condições de temperatura similares as encontradas no ambiente de zonas tropicais. A temperatura de 25 °C foi relatada como ótima para *B. bassiana* e ciclos de 32 °C por 8 h e 25 °C por 16 h promoveram mais de 90% de crescimento relativo em todos os isolados. Ciclos com temperatura maior que 32 °C por 8h de duração promoveram atraso e/ou diminuição da germinação em alguns isolados (DEVI *et al.*, 2005).

Notável variabilidade em termotolerância foi encontrada entre conídios de isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e um isolado de *M. anisopliae* var. *acridum* obtidos de latitudes entre 61°N e 54°S. A maioria dos isolados toleraram 40 °C com germinação relativa maior que 90% após 12 horas de exposição. Após 8 e 12 horas de exposição a 45 °C, apenas dois isolados de *M. anisopliae* patogênicos para gafanhotos (ARSEF 324 e ARSEF 3609) apresentaram elevada germinação relativa dos conídios. A dose letal média para o isolado ARSEF 324 foi 49,4 °C e 47,9 °C para duas e quatro horas de exposição, respectivamente. Em geral, isolados originados de elevadas latitudes demonstraram maior susceptibilidade ao calor do que isolados originados próximos à linha do equador (RANGEL *et al.*, 2005).

Dois isolados de *M. anisopliae* foram avaliados quanto à capacidade de desenvolver-se sob as condições de temperatura encontrada na superfície de bovinos, e de promover patogenicidade para o carrapato *B. microplus*. Os ensaios de patogenicidade realizados em temperatura padrão de 28 °C demonstrou que os isolados são patogênicos para *B. microplus*. Em contrapartida, nos ensaios realizados sob temperaturas variando entre 31 e 35 °C um dos isolados não diferiu do tratamento controle. Também foi observado que o crescimento radial dos isolados diminuiu de acordo com o aumento da temperatura (POLAR *et al.*, 2005a).

Segundo Rangel *et al.* (2005), a exposição ao calor por condução no solo ou por radiação direta é um dos fatores de estresse mais importantes na utilização de fungos entomopatogênicos no campo. Além disso, o calor associado com a radiação ultravioleta danifica o conídio e contribui para falhas em programas de controle biológico de insetos, no entanto, a seleção de isolados termo-tolerantes ajudaria a melhorar a eficácia dos fungos.

Os danos e a total inativação causados aos conídios pela radiação solar ultravioleta (UV-A e UV-B) têm sido freqüentemente apontados como fator capaz de reduzir a eficiência de fungos em programas de controle biológico. Sendo assim, estudos têm visado a seleção de isolados mais tolerantes a UV e a adição de fotoprotetores nas formulações usadas como inóculo (ROBERTS; CAMPBELL, 1977; FARGUES *et al.*, 1988).

Braga *et al.* (2001a) observaram que isolados de *M. anisopliae* apresentam extensa variação em tolerância quando expostos a luz solar total, e observaram também que um período de quatro horas de exposição a radiação ultravioleta solar é capaz de reduzir o cultivo de alguns isolados de *M. anisopliae* em até 100%.

Assim como *Metarhizium*, espécies de fungos entomopatogênicos dos gêneros *Beauveria* e *Isaria* também são sensíveis à radiação ultravioleta. Fargues *et al.* (1996) irradiaram suspensões fúngicas com UV-B utilizando lâmpadas artificiais simulando a luz natural do sol, e constataram que isolados de *M. anisopliae* var. *acridum* foram os mais resistentes a radiação, seguidos pelos isolados de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea*.

*Simplicillium lanosoniveum* (= *Verticillium lecanii*) e *Lecanicillium aphanocladii* (= *Aphanocladium album*) também são sensíveis à radiação ultravioleta. Isolados destas espécies foram expostos à elevada radiação UV-B e foi observada diminuição do percentual de cultivo em todos os isolados. O período de quatro horas de exposição à UV-B foi suficiente para reduzir o cultivo próximo a zero (BRAGA *et al.*, 2002).

Diferentes espécies e isolados de *Metarhizium* foram expostos por uma e duas horas à radiação UV-B e foi observado que quanto maior a latitude de origem dos isolados, menor era a tolerância à radiação UV-B (BRAGA *et al.*, 2001c). Esses autores observaram também que a exposição à radiação induziu um atraso na germinação em *M. album*, *M. anisopliae* e *M. taii*. O atraso na germinação foi proporcional a dose recebida e aparentemente independente do nível de tolerância apresentado pelo isolado.

Os danos causados pela radiação ultravioleta podem induzir a uma série de respostas, como o bloqueio do ciclo da célula (HAIN *et al.* 1996), vagarosidade na replicação do DNA (PETIT-FRÈRE *et al.*, 1996; WANG; HSU, 1996), e aumento da transcrição de genes codificantes de proteínas que participam na replicação e reparo do DNA. A função deste tipo de resposta tem o intuito de prevenir a duplicação de moléculas danificadas e a segregação de cromossomos fendidos (ELLEDGE, 1996).

Conídios de diferentes isolados de *M. anisopliae* expostos diretamente à radiação UV-B apresentam declínio do percentual de cultivo de acordo com o aumento no período de exposição, no entanto conídios incubados em meio PDAY (Batata Dextrose Ágar acrescido de Extrato de Levedura) em diferentes tempos antes de serem expostos à radiação UV-B apresentaram diferentes níveis de tolerância (BRAGA *et al.*, 2001b). Por exemplo, conídios do isolado ARSEF 2575 incubados por 12 horas apresentaram 53% de germinação relativa média quando expostos por uma hora à radiação UV-B a 920 mW m<sup>-2</sup>. A germinação relativa

aumentou para 86% e 94% respectivamente quando o tempo de incubação dos conídios foi de 24 e 48 horas antes da exposição à UV-B pelo mesmo período de uma hora. Resultados similares foram observados também para o isolado ARSEF 23. Baseado nesses dados, Braga *et al.* (2001b) construíram a hipótese de que com o aumento geral na atividade metabólica no início da germinação, o fungo deve reparar de modo mais rápido e eficiente o dano causado a seu material genético, inativar os fotoprodutos tóxicos e restituir os componentes celulares danificados.

Além disso, outros fatores como o substrato e o favorecimento nutricional nos quais os conídios são produzidos influenciam a tolerância a radiação UV-B. Conídios de *M. anisopliae* produzidos sobre cadáveres de insetos foram significativamente mais sensíveis à radiação UV-B do que conídios produzidos em meio PDAY. Conídios produzidos também em meio Czapek e Emerson YpSs ou em grãos de arroz obtiveram maior tolerância à radiação UV-B. Neste sentido, a manipulação destas variáveis poderia ser usada para obtenção de conídios com maior tolerância à radiação UV-B (RANGEL *et al.*, 2004).

## **CAPÍTULO I**

### **CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Beauveria spp.* E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CONÍDIOS**

## RESUMO

*Beauveria* é um gênero cosmopolita de fungo entomopatogênico facilmente distinguida morfológicamente. No entanto, o reconhecimento e a identificação de espécies do gênero *Beauveria* é uma problemática devido uma deficiência de informação sobre suas variações morfológicas. O presente estudo avaliou a macro e micromorfologia de 60 isolados, incluindo 5 espécies de *Beauveria* spp. e 1 espécie de *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*), originários de diversas regiões geográficas, artrópodes hospedeiros ou substratos. A análise morfológica buscou confirmar a identificação dos isolados e caracterizá-los. Além disso, o presente estudo também avaliou a quantidade de conídios produzidos pelos isolados a fim de selecionar aqueles com maior potencial para produção massal de conídios. Sendo assim, todos os isolados apresentaram características macro e micromorfológicas compatíveis com as características citadas na literatura para cada espécie estudada. No entanto, os isolados de *B. bassiana* apresentaram características bastante variáveis. Muitos isolados apresentavam grande quantidade de células conidiogênicas agrupadas formando densos cachos, enquanto em outros isolados as células conidiogênicas apresentavam-se formando apenas pequenos cachos, ou poucos cachos densos ou mesmo solitárias. Os isolados de *B. bassiana* também apresentaram grande variabilidade em produção de conídios, enquanto os isolados das demais espécies de *Beauveria* e o de *E. albus* apresentaram, em geral, baixo potencial para produção de conídios. Interessante que os isolados de *B. bassiana* portadores de células conidiogênicas agrupadas em pequeno número ou solitárias foram também os isolados com menor produção de conídios. Possivelmente esses isolados apresentavam-se degenerados em função do cultivo sucessivo em meios artificiais por longos períodos, visto que são isolados que foram obtidos há muitos anos. Neste sentido, os resultados indicam que a produção dos conídios parece estar fortemente relacionada à condição morfológica dos conidióforos dos isolados.

**Palavras-chave:** *Beauveria bassiana*; *Beauveria* spp.; *Engyodontium albus*; morfologia; produção de conídios.

## ABSTRACT

*Beauveria* is a cosmopolitan genus of entomopathogenic fungus easy to distinguish morphologically. However, species recognition and identification are problematic because of a lack of informative morphological variation. The present study evaluated the macro and micromorphology of 60 isolates, including five species of *Beauveria* spp. and one species of *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*), originated from various geographic regions, arthropods hosts or substrates. The morphology study has identified and characterized the isolates. Furthermore, the present study evaluated the conidial production potential of the isolates in order to select those with greater potential for massive conidial production. Thus, all isolates showed consistent macro and micromorphology to species description as they are mentioned in the literature. However, *B. bassiana* isolates presented different characteristics. Several isolates presented a great amount of conidiogenous cells tightly clustered, while other isolates presented conidiogenous cells in small groups or even solitarily. The *B. bassiana* isolates also presented great variability in conidial production, while the majority of isolates of other *Beauveria* species and *E. albus* presented a low potential of conidial production. Interestingly, *B. bassiana* isolates supporting conidiogenous cells in small groups or solitarily were also isolates with low conidial production. It is possible that these isolates were degenerated due to culturability in artificial media for years, since they were obtained several years ago. Therefore, the results indicate that conidial production appears to be close related to isolates' conidiophore morphology.

**Key words:** *Beauveria bassiana*; *Beauveria* spp.; *Engyodontium albus*; morphology; conidial production.



# 1 INTRODUÇÃO

*Beauveria* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) é um gênero cosmopolita de fungo entomopatogênico. Foi um dos primeiros a ser descoberto pela investigação da muscardine branca, uma doença devastadora que afligiu a indústria européia do bicho-da-seda nos séculos XVIII e XIX, dando início ao estudo de patologias fúngicas dos insetos. Neste contexto, o cientista italiano Agostino Bassi (1773-1856) deixou significativas e duradouras contribuições à biologia com seus estudos sobre a doença muscardine branca e seu organismo causador (REHNER, 2005).

Balsamo Crivelli (1835) nomeou formalmente o fungo muscardine *Botrytis bassiana* em honra a Bassi, facilitando a comunicação científica e tecnológica sobre o organismo e a doença. Vuillemin (1912) descreveu formalmente o gênero *Beauveria* nomeando *Botrytis bassiana* como a espécie tipo, *Beauveria bassiana* em reconhecimento a J. Beauverie em 1914 por seus estudos sobre *Beauveria* e a doença muscardine.

Devido as espécies de *Beauveria* spp. se reproduzirem através da produção de conídios, elas foram inferidas como assexuadas e foram tradicionalmente classificados como fungos Deuteromicetos na Classe dos Hifomicetos assexuados. No entanto, com o surgimento de técnicas moleculares foi possível agrupar essas espécies para junto de seus parentes sexuados (REHNER, 2005).

*Beauveria* é facilmente distinguida morfológicamente. Sua característica mais inconfundível são os grupos de células conidiogênicas curtas e globosas ou em “flask-shaped” que produzem uma sucessão de conídios unicelulares a partir de uma raque alongada e em zig-zag (KIRK *et al.*, 2001). No entanto, o reconhecimento e a identificação de espécies de *Beauveria* é uma problemática devido a deficiência de informação sobre suas variações morfológicas. A forma dos conídios é a única característica morfológica em *Beauveria* útil na diferenciação entre espécies, e podem variar de globoso, elipsóide, cilíndrico, reniforme e vermiforme e com uma grande variedade de tamanhos (REHNER, 2005).

Novas espécies de *Beauveria* foram descritas nos séculos XIX e XX, complicando ainda mais a nomenclatura e a identificação dessas espécies. Um total de 49 espécies foi classificado em *Beauveria*, das quais aproximadamente 22 são recentemente consideradas válidas. No entanto, uma sobreposição na variação em tamanho e forma dos conídios tem questionado esta validade e complicado a rotina de identificação das espécies (REHNER, 2005).

Petch (1926) discerniu com segurança dois espécimes baseado na forma dos conídios e os referiu como *B. bassiana* e *B. densa*. MacLeod (1954), como Petch, diferenciou diversos espécimes em apenas duas espécies de *Beauveria*, *B. bassiana* e *B. tenella*. Após alguns anos, De Hoog (1972) obteve conclusões similares mas utilizou *B. brongniartii* (Sacc.) Petch para designar as espécies *B. densa*, nomeado por Petch (1926) e *B. tenella*, nomeado por MacLeod (1954), e além disso reconheceu uma nova espécie nomeada *B. alba* (Limber) Saccas. Esta espécie foi posteriormente transferida para *Engyodontium* (Limber) Hoog (DE HOOG, 1978).

Após a análise de De Hoog (1972), várias outras espécies foram descritas na América do Sul. *Beauveria vermiconia* com pequenos conídios em forma de foice (DE HOOG; RAO, 1975), *B. velata* com conídios verrugosos e *B. amorpha* caracterizada por seus largos e cilíndricos conídios (SAMSON; EVANS, 1982). Mais recentemente uma outra espécie de *Beauveria* foi descrita, *B. caledonica*, na Escócia. Também produz conídios cilíndricos similares aos descritos em *B. amorpha* (BISSETT; WIDDEN, 1986).

Sendo assim, estas seis espécies são as mais distinguíveis e conhecidas espécies de *Beauveria*: *B. amorpha*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. caledonica*, *B. velata* e *B. vermiconia*. É importante também notar que muitas espécies com morfologia similar a *B.*

*bassiana* foram descritas, e são por isso, consideradas sinonímia para *B. bassiana*: *B. densa*, *B. doryphorae*, *B. effusa*, *B. globulifera*, *B. shiotae*, *B. stephanoderis* e *B. sulfurescens* (REHNER, 2005).

Baseado nisso, o presente estudo avaliou a macro e micromorfologia de 60 isolados, incluindo cinco espécies de *Beauveria* e um isolado de *Engyodontium album* (= *Beauveria alba*), originários de diversas regiões geográficas, artrópodes hospedeiros ou substratos. A análise morfológica buscou confirmar a identificação dos isolados e então caracterizá-los. Além disso, tendo em vista que a utilização de fungos para o controle de artrópodes depende da grande produção de conídios, o presente estudo também avaliou a quantidade de conídios produzidos por cada isolado a fim de selecionar aqueles com maior potencial para produção massal de conídios.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local e período de execução dos experimentos.

A caracterização morfológica dos isolados foi realizada entre os meses de maio e julho de 2005 no Departamento de Micologia da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, no Rio de Janeiro. A avaliação da produção de conídios foi realizada no mês de dezembro de 2005 no Departamento de Biologia da Universidade do Estado de Utah – USU, nos Estados Unidos.

### 2.2 Isolados estudados.

Cinquenta e três isolados de *B. bassiana* e sete isolados de outras espécies foram estudadas. Os isolados foram obtidos de coleções de culturas de diferentes instituições e suas origens geográficas e hospedeiros ou substratos estão disponíveis na Tabela 1.

Todos os isolados estudados foram preservados em solução de glicerol a 2% e sob óleo mineral e estão mantidos sob refrigeração integrando o acervo de fungos entomopatogênicos do Laboratório de Controle Microbiano da UFRRJ.

### 2.3 Caracterização morfológica dos isolados.

Os isolados de *Beauveria* spp. e *E. albus* foram transferidos para placas de Petri (100 × 15 mm, Fisherbrand) contendo 23 ml do meio de cultura aveia ágar (60 g de farinha de aveia; 12,5 g de ágar-ágar; 1000 ml de água destilada) em ponto único de inóculo localizado no centro da placa. Os isolados foram então incubados em temperatura e período que variaram de acordo com cada espécie analisada (Tabela 2).

Após o cultivo, foi feita a descrição das características macroscópicas através da observação do diâmetro das colônias, aspecto e coloração das massas conidiais e reverso, e verificação da produção de exsudatos. O diâmetro de cada colônia foi aferido usando-se um calíper digital Mitutoyo com resolução de 0,01 mm.

Os isolados também foram avaliados quanto suas características microscópicas, e para isso foi utilizada a técnica de microcultivo entre lâmina e lamínula (RIVALIER; SEYDEL, 1932) utilizando-se meio de cultura aveia ágar. As placas foram incubadas sob as mesmas condições estabelecidas para avaliação da macromorfologia. Após o cultivo, foram confeccionadas lâminas temporâneas coradas com Lactofenol de Amman acrescido de Azul de Algodão (20 g de ácido fênico – Sigma, 20 ml de ácido láctico – Reagen, 40 ml de glicerina – Vetec, 0,05 g de azul de algodão – Merck, 20 ml de água destilada), sendo estas observadas sob microscópio óptico com magnitude de 400 ×. Neste sentido, a descrição das

**Tabela 1.** Isolados de *Beauveria bassiana* e “outgroup” com isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium album* (= *Beauveria alba*), seus hospedeiros ou substratos, regiões geográficas de origem, ano de isolamento e coleção de cultura procedente (continua).

<b>Isolados de <i>Beauveria</i> agrupados de acordo com hospedeiro / substrato de origem</b>				
<b>#</b>	<b>Isolado*</b>	<b>Hospedeiro, Substrato</b>	<b>Origem</b>	<b>Ano</b>
<i>Beauveria bassiana</i>				
01	Bb 02	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
02	Bb 09	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
03	Bb 13	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
04	Bb 15	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
05	Bb 19	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
06	Bb 21	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
07	Bb 23	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
08	Bb 27	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
09	Bb 31	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
10	Bb 35	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
11	Bb 38	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
12	Bb 44	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
13	Bb 46	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
14	LCM 01	(Acari: Ixodidae)	Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil	2002
15	ESALQ 986	(Acari: Ixodidae)	Piracicaba, São Paulo, Brasil	1990
16	CG 66	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Brasília, Distrito Federal, Brasil	1988
17	CG 222	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Costa do Surubim, Amazonas, Brasil	1981
18	CG 227	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Pacajus, Ceará, Brasil	1982
19	CG 228	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Manaus, Amazonas, Brasil	1991
20	CG 319	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil	1990
21	CG 464	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Francisco Beltrão, Paraná, Brasil	1984
22	CG 481	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Ribeira do Pombal, Bahia, Brasil	1985
23	CG 484	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Ponta Porã, Mato Grosso do Sul, Brasil	1983
24	CG 495	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Londrina, Paraná, Brasil	1987
25	CG 500	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Goiânia, Goiás, Brasil	1985
26	ARSEF 252	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Orono, Maine, Estados Unidos	1978
27	GHA	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Montana, Estados Unidos	1980
28	CG 02	(Coleoptera: Curculionidae)	Manaus, Amazonas, Brasil	1988
29	CG 138	(Coleoptera: Curculionidae)	Recife, Pernambuco, Brasil	1989
30	CG 367	(Coleoptera: Curculionidae)	Aracaju, Sergipe, Brasil	1991
31	CG 471	(Coleoptera: Curculionidae)	Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil	1984
32	CG 478	(Coleoptera: Curculionidae)	Campinas, São Paulo, Brasil	1983
33	CG 483	(Coleoptera: Curculionidae)	Goiânia, Goiás, Brasil	1982
34	EP 01	(Coleoptera: Curculionidae)	Itajaí, Santa Catarina, Brasil	1989
35	CG 17	(Coleoptera: Scolytidae)	Piracicaba, São Paulo, Brasil	1988
36	UFPE 496	(Coleoptera: Scolytidae)	Estados Unidos	1955
37	CG 01	(Homoptera: Cercopidae)	Brasília, Distrito Federal, Brasil	1984
38	CG 149	(Homoptera: Cercopidae)	Goiânia, Goiás, Brasil	1982
39	CG 154	(Homoptera: Cercopidae)	Jataí, Goiás, Brasil	1983
40	CG 234	(Homoptera: Cicadellidae)	Ponta Porã, Mato Grosso do Sul, Brasil	1983
41	CG 206	(Hymenoptera: Vespidae)	Costa do Arapapa, Amazonas, Brasil	1981
42	CG 235	(Hymenoptera: Vespidae)	Costa do Arapapa, Amazonas, Brasil	1981
43	CG 479	(Hymenoptera: Vespidae)	Santana do Ipanema, Alagoas, Brasil	1985
44	ESALQ 747	(Hymenoptera: Formicidae)	Belém Novo, Rio Grande do Sul, Brasil	1988
45	CCT 4641	(Hymenoptera: Formicidae)	Cuiabá, Mato Grosso, Brasil	1988
46	CG 251	(Hymenoptera: Formicidae)	Colinas do Sul, Goiás, Brasil	1991
47	CG 480	(Hymenoptera: Formicidae)	Ribeira do Pombal, Bahia, Brasil	1985
48	CG 487	(Hymenoptera: Apoidae)	São Carlos, Santa Catarina, Brasil	1984

**Tabela 1.** Continuação.

#	Isolado*	Hospedeiro, Substrato	Origem	Ano
49	UFPE 479	(Lepidoptera: Bombycidae)	Brasil	1955
50	CG 307	Solo	Goiás, Brasil	1990
51	CG 309	Solo	Salto da Divisa, Minas Gerais, Brasil	1990
52	CG 310	Solo	Jequié, Bahia, Brasil	1990
53	CCT 3161	Contaminante de Laboratório	Estados Unidos	1970
OUT GROUP				
#	Isolado*	Hospedeiro, Substrato	Origem	Ano
<i>Beauveria amorpha</i>				
54	ARSEF 656	(Homoptera: Cicadellidae)	Hunan, China	1981
55	ARSEF 1682	(Coleoptera: Scarabaeidae)	Nagano Prefecture, Japão	1980
56	ARSEF 4755	Solo	Bruny Island, Tasmânia, Austrália	1988
<i>Beauveria brongniartii</i>				
57	ATCC 58798	(Diptera: Tipulidae)	Czechoslovakia	?
<i>Beauveria velata</i>				
58	ARSEF 2998	(Lepidoptera)	Equador	1990
<i>Beauveria vermiconia</i>				
59	ARSEF 2922	Cinza vulânica	Valdivia, Los Lagos, Chile	1974
<i>Engyodontium albus</i> (= <i>Beauveria alba</i> )				
60	UFPE 3138	Solo marinho	Pernambuco, Brasil	1989

\* Coleção de Culturas: **Bb** = Laboratório de Coleção de Cultura de Fungos – Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Brasil; **LCM** = Laboratório de Controle Microbiano - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Brasil; **ESALQ** = Departamento de Entomologia - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ / USP, Brasil; **CG** = Centro Nacional de Recursos Genéticos - CENARGEN / EMBRAPA, Brasil; **ARSEF** = ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures - ARSEF / USDA, Estados Unidos; **EP** = Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A. – EPAGRI, Brasil; **UFPE** = Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Brasil; **CCT** = Coleção de Culturas Tropicais André Tosello, Brasil; **GHA** = Isolado comercializado por Emerald Bioagriculture Corporation, MYCOTROL ES<sup>®</sup>, EPA 070810-00006, Estados Unidos; **ATCC** = American Type Culture Collection, Estados Unidos.

**Tabela 2.** Cultivo dos isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) em meio Aveia ágar sob temperaturas e períodos variáveis de acordo com a espécie.

<b>Condições de cultivo dos isolados</b>		
Espécies dos gêneros <i>Beauveria</i> e <i>Engyodontium</i>	Temperatura (°C)	Período (dias)
<i>B. amorpha</i>	25	14
<i>B. bassiana</i>	20	8
<i>B. brongniartii</i>	20	8
<i>B. velata</i>	25	7
<i>B. vermiconia</i>	20	8
<i>E. albus</i>	20	8

características microscópicas foi feita através de observação da forma e medida dos conídios, células conidiogênicas e células laterais.

A descrição das características macro e micromorfológicas, bem como as condições estabelecidas para o cultivo de cada espécie, foram baseadas nos roteiros estabelecidos por De Hoog (1972) para o isolado previamente nomeado *B. alba*, *B. bassiana* e *B. brongniartii*, De Hoog e Rao (1975) para *B. vermiconia* e Samson e Evans (1982) para *B. amorpha* e *B. velata*.

## 2.4 Avaliação da produção de conídios.

Os isolados de *Beauveria* spp. e *E. albus* foram cultivados em 23 ml de meio batata dextrose ágar (Difco Laboratories, Detroit, MI) suplementados com 1 g  $\Gamma^{-1}$  de extrato de levedura (Technical, Difco) (PDAY) em placas de Petri (100 × 15 mm, Fisherbrand) a 25 °C durante 20 dias em total ausência de luz.

Com auxílio de um furador de rolha medindo 0,5 cm de diâmetro, cada cultura foi cortada em três diferentes pontos escolhidos aleatoriamente e os fragmentos de ágar contendo a cultura foram removidos da placa e transferidos para um pequeno tubo contendo 1 ml de solução de Tween 80 (0,01% v/v). O tubo foi então agitado vigorosamente em “vortex” por 30 segundos, e em seguida, uma amostra de 10  $\mu$ l da suspensão foi colhida e quantificada em hematocítmetro. Neste sentido, a capacidade de produção de conídios pelos isolados foi avaliada pela quantificação dos conídios produzidos em uma área de 0,589 cm<sup>2</sup> da cultura. Os experimentos foram repetidos duas vezes em dias diferentes e com um novo lote de conídios para cada.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Caracterização morfológica dos isolados.

Todos os isolados estudados apresentaram características macro e micromorfológicas compatíveis com as descritas na literatura (DE HOOG, 1972, DE HOOG; RAO, 1975, SAMSON; EVANS, 1982).

Os diferentes isolados de *B. bassiana* apresentaram colônias de tamanhos variados entre 9,48 mm (CG 66) e 22,93 mm (Bb19), obtendo-se um diâmetro médio de  $19,59 \pm 3,18$  mm. As colônias também apresentaram aspectos variando entre lanoso, flocoso ou aveludado, e em sua maioria com aparência lisa, e em alguns casos, apresentaram-se zonadas (Bb 09, Bb 44, ESALQ 986, CG 484, CG 17, ESALQ 747 e CG 310), ou sulcadas (Bb 13, CG 500, CG 478, CG 149, CG 235, CG 307). Os isolados apresentaram colônias brancas em sua maioria, no entanto, alguns apresentaram colônias de coloração levemente amarelada (Bb 13, ESALQ 986, CG 500, CG 471, CG 154, CG 206, CG 235, CG 479, CG 251, CG 307 e CG 310). Em alguns casos foi observada a presença de exsudatos de coloração hialina (Bb 19, Bb 38, CG 66, CG 222, CG 227, CG 319, CG 484, CG 500, ARSEF 252, CG 02, CG 478, CG 483, CG 149, CG 154, CG 206, CG 235, CG479, CG 251, CG 307 e CG 310) (Figura 1). Quanto à coloração do reverso das colônias, os isolados variaram entre o amarelo e o rosa, e apenas um isolado apresentou reverso incolor (CG 234).

Em relação às características micromorfológicas os isolados de *B. bassiana* apresentaram conídios de textura lisa de forma globosa e subglobosa, e em certos casos alguns conídios elipsóides. Os conídios apresentavam tamanhos bastante variados (1,0 a 4,0  $\mu$ m × 1,0 a 3,0  $\mu$ m), ainda que em um mesmo isolado. As células laterais estavam mais presentes em alguns isolados do que em outros e a medida era também variável entre 2,5 a 4,0  $\mu$ m × 3,0 a 6,0  $\mu$ m. As células conidiogênicas apresentavam-se geniculada na maioria dos

isolados e a região basal em forma globosa medindo em média de 2,5  $\mu\text{m}$ , ou mais delgada em “flask-shaped”. As células conidiogênicas apresentavam raques com comprimentos bastante variados em um mesmo isolado (4,0 a 18  $\mu\text{m}$ ). Alguns isolados, entretanto, apresentavam maior frequência de células conidiogênicas com raques alongadas (como por exemplo: Bb 02, Bb 19, CG 138, UFPE 479 e UFPE 496) enquanto outros apresentavam células conidiogênicas curtas com maior frequência (como por exemplo: CG 66, CG 149, CG 154, CG 251 e CG 309). Interessante, que muitos isolados apresentavam grande quantidade de células conidiogênicas agrupadas formando densos cachos (Figura 2A), entretanto, em outros isolados as células conidiogênicas apresentavam-se formando apenas pequenos cachos ou poucos cachos densos (Bb 09, Bb 13, Bb 27, Bb 35, Bb 46, CG 495, CG 367, CG 01, CG 234, CG 479 e CG 307) (Figura 2B), ou mesmo solitárias (Bb 21, Bb 31, Bb 44, LCM 01, CG 464, EP 01, UFPE 496, CCT 4641, UFPE 479 e CCT 3161) (Figura 2C).

O isolado ATCC 58798 de *B. brongniartii* apresentou colônia medindo 18 mm de diâmetro de aspecto flocoso, lisa, de coloração levemente amarelada e reverso amarelo, sem presença de exsudatos. Sob microscopia observou-se conídios de textura lisa em sua maioria de forma elipsóide medindo 2,0  $\mu\text{m} \times 2,5$  a 3,0  $\mu\text{m}$ . Alguns conídios, no entanto, chegaram a medir até 2,5  $\mu\text{m} \times 5,0$   $\mu\text{m}$ . Células laterais robustas mediam de 2,0 a 3,0  $\mu\text{m} \times 4,0$  a 7,0  $\mu\text{m}$  em sua maioria. As células conidiogênicas apresentavam-se com a região basal globosa ou em “flask-shaped” (2,0 a 3,5  $\mu\text{m}$ ), geniculadas e com raques compridas medindo até 20,0  $\mu\text{m}$  de comprimento. Apresentavam-se agrupadas formando cachos, mas eram principalmente vistas solitárias (Figura 2D).

O isolado de *B. velata* (ARSEF 2998) apresentou colônia branca com aspecto aveludado de textura lisa e reverso incolor, sem presença de exsudatos e medindo 15,22 mm de diâmetro. A microscopia revelou conídios de textura verrugosa coberto por camada gelatinosa, de forma globosa e elipsóide e com medida de 3,0 a 4,0  $\mu\text{m} \times 3,0$  a 5,0  $\mu\text{m}$ . As células conidiogênicas de formato elipsoidal mediam em média 2,0  $\mu\text{m} \times 8,0$   $\mu\text{m}$ . Não formavam cachos, mas apresentavam-se agrupadas em pequenos números ou solitárias (Figura 2E).

O isolado ARSEF 2922 de *B. vermiconia* apresentou colônia medindo 16,52 mm de diâmetro, aspecto lanoso com bordas rasteiras diferenciadas, de coloração branca e reverso rosa, e exsudato ausente. À microscopia observou-se os conídios peculiares em forma de vírgula. Células laterais mediam em média de 2,0 a 3,0  $\mu\text{m} \times 5,0$  a 6,0  $\mu\text{m}$ . As células conidiogênicas variavam em forma globosa, elipsoidal e em “flask-shaped” medindo em média 2,0  $\mu\text{m} \times 5,0$   $\mu\text{m}$ , no entanto algumas se apresentavam mais delgadas e compridas. A maioria das células conidiogênicas estavam agrupadas formando cachos pouco densos (Figura 2F).

Os isolados de *B. amorpha* apresentaram macromorfologia diversificada. O isolado ARSEF 656 apresentou aos 14 dias de cultivo, colônia pulverulenta, lisa, de cor branca e reverso rosa, com 29,94 mm de diâmetro. O isolado ARSEF 1682 apresentou colônia lanosa, lisa, levemente amarelada com reverso amarelo e medindo 40,94 mm. O isolado ARSEF 4755, em contrapartida, apresentou colônia algodonosa, de aspecto zonado, de coloração branca e ao centro rosa, de reverso amarelo e medindo 38,85 mm. Este isolado, diferindo dos demais, apresentou exsudato hialino. À microscopia todos os isolados apresentaram conídios de forma cilíndrica e alguns levemente curvos de textura lisa, as células conidiogênicas possuíam a região basal globosa ou cilíndrica e albergavam vários conídios. Os isolados apresentavam, entretanto, algumas diferenças. O ARSEF 656 apresentou conídios medindo 1,5 a 4,0  $\mu\text{m} \times 2,0$  a 5,0  $\mu\text{m}$  e células conidiogênicas podendo medir 2,0 a 2,5  $\mu\text{m} \times 4,0$  a 21,0  $\mu\text{m}$  e usualmente agrupadas formando densos cachos. O isolado ARSEF 1682 apresentou conídios medindo 1,5 a 2,0  $\mu\text{m} \times 3,0$  a 5,0  $\mu\text{m}$  e células conidiogênicas medindo em média

1,5 a 2,0  $\mu\text{m} \times 8,0$  a 17,0  $\mu\text{m}$  e em sua maioria apresentavam-se solitárias (Figura 2G). O isolado ARSEF 4755 por sua vez, apresentou conídios medindo 1,5 a 2,0  $\mu\text{m} \times 3,0$  a 6,0  $\mu\text{m}$  e as células conidiogênicas medindo 2,0  $\mu\text{m} \times 4,0$  a 12,0  $\mu\text{m}$  apresentavam-se agrupadas em densos cachos.

O único isolado de *E. albus* (UFPE 3138) apresentou colônia medindo 12,95 mm de diâmetro com aspecto flocoso e zonada, de coloração branca e reverso incolor, sem presença de exsudatos. Quanto às características microscópicas, foram observados conídios de textura lisa, em sua maioria globosos medindo (1,5 a 2,0  $\mu\text{m} \times 1,5$  a 2,0  $\mu\text{m}$ ) e tendendo a homogeneidade. As células conidiogênicas surgiam a partir de hifas pouco diferenciadas que mediam cerca de 2,0  $\mu\text{m} \times 6,0$  a 12,0  $\mu\text{m}$  e apresentaram-se geniculadas e alongadas medindo cerca de 1,5  $\mu\text{m} \times 10$  a 35  $\mu\text{m}$ , e também denticuladas com dentículos medindo até 1  $\mu\text{m}$ . As células conidiogênicas também eram dispersas e raramente dicotomizadas (Figura 2H).

### 3.2 Avaliação da produção de conídios.

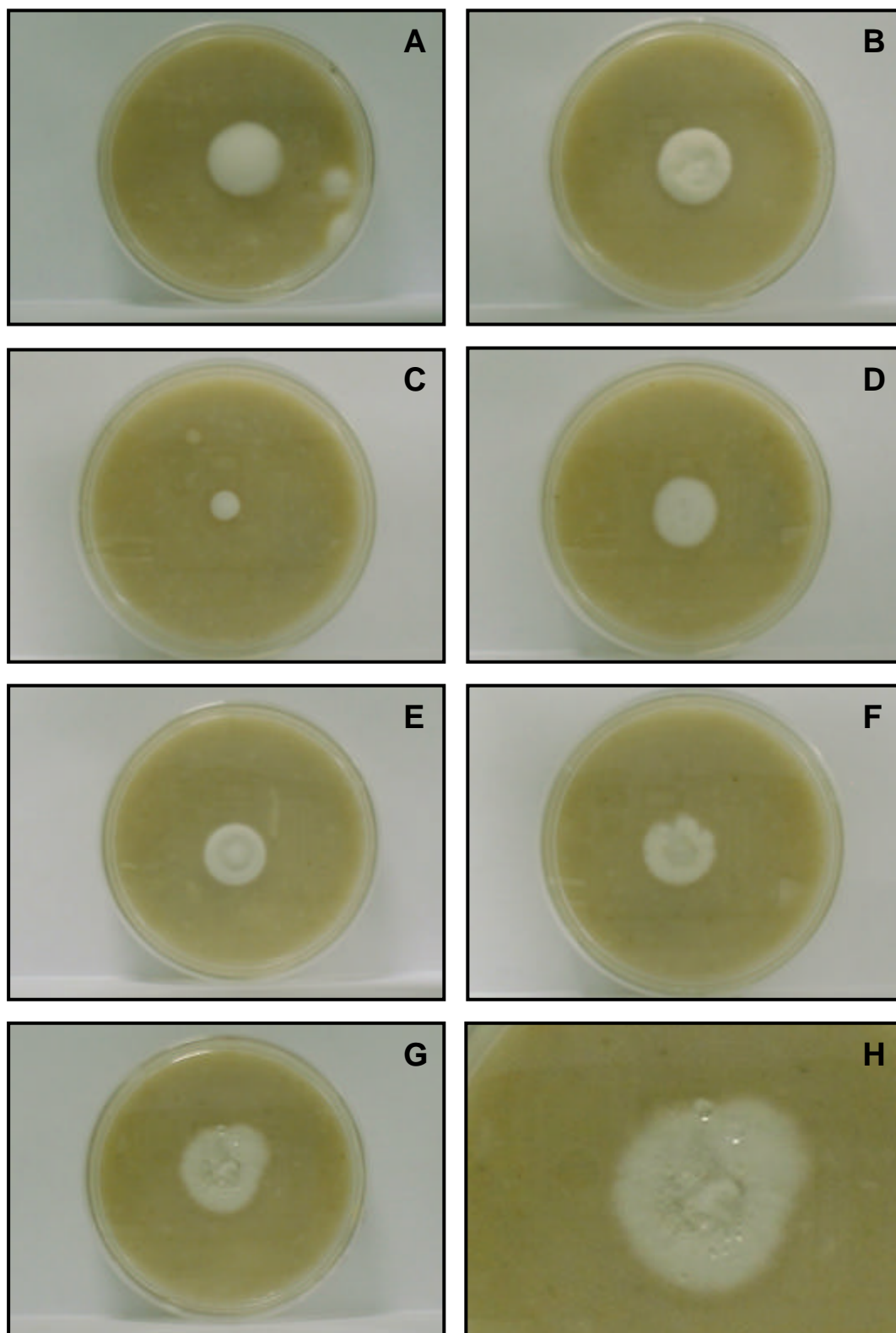
Os isolados de *B. bassiana* apresentaram grande variabilidade quanto a produção de conídios. Dentre eles, 17 isolados produziram menos de  $2000 \times 10^4$  conídios em 0,589  $\text{cm}^2$  da cultura em meio PDAY, apresentando baixo potencial para produção dos conídios. Outros 23 isolados produziram entre 2000 e  $5000 \times 10^4$  conídios, apresentando potencial médio de produção. Os isolados com maior produção foram: ARSEF 252, CG 228, CG 483, CG 251, CG 319, CG 480 e Bb 19 produzindo entre  $6000 \times 10^4$  e  $10000 \times 10^4$  conídios, e os isolados CG 484, GHA, CG 154, CG 149, CG 227 e CG 206 produzindo quantidade superior a  $10000 \times 10^4$  conídios em 0,589  $\text{cm}^2$  da cultura.

Os isolados das demais espécies de *Beauveria* spp. e *E. albus* apresentaram baixo potencial para produção de conídios, com exceção do isolado ARSEF 4755 de *B. amorpha* que produziu mais de  $4000 \times 10^4$  conídios, apresentando assim, potencial médio de produção quando comparado aos demais isolados (Figura 3).

## 4 DISCUSSÃO

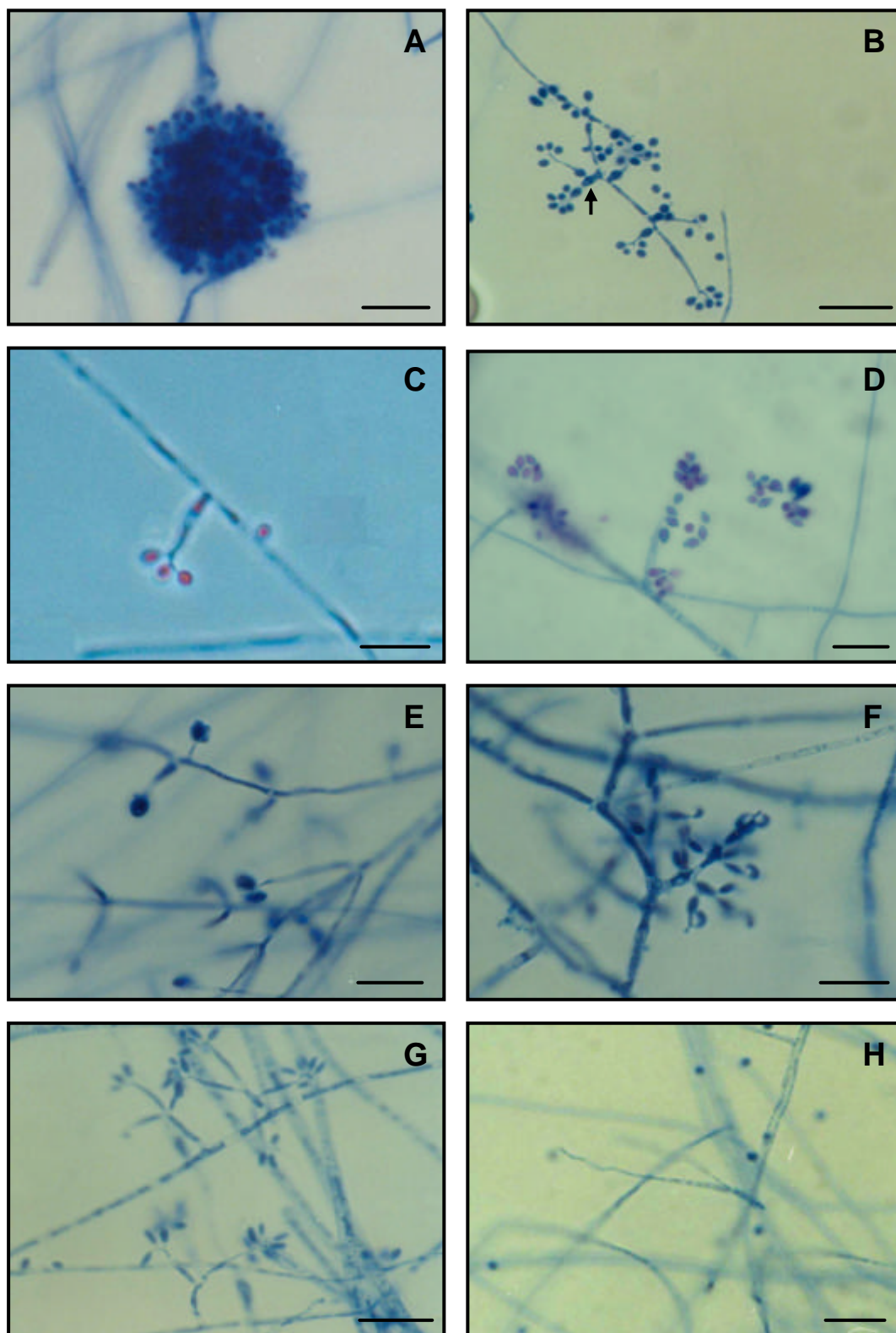
As características macro e micromorfológicas de cada espécime estudado, apresentavam-se de acordo com as descrições estabelecidas por De Hoog (1972) para *B. bassiana* e *B. brongniartii*, De Hoog e Rao (1975) para *B. vermiconia* e Samson e Evans (1982) para *B. amorpha* e *B. velata*. O isolado de *E. albus* foi analisado conforme descrito por De Hoog em 1972, quando fora nomeado *B. alba*, e as características observadas neste isolado eram pertinentes às descritas em tal literatura.

As características microscópicas do gênero *Beauveria* são células conidiogênicas erguendo-se a partir de células pedunculadas mais ou menos intumescidas, freqüentemente em densos cachos, dispersas ou ainda em espiral surgindo a partir de hifas indiferenciadas. As células conidiogênicas apresentam parte basal variando de globosa a fusiforme e apresentam raques geniculadas e denticuladas. Quanto aos conídios, são unicelulares, hialinos de textura lisa, parede fina e de forma globosa a elipsoidal (DE HOOG, 1972). Segundo De Hoog (1972), o isolado de *E. albus*, até então *B. alba*, diferenciava-se das demais espécies *B. bassiana* e *B. brongniartii* por apresentar células conidiogênicas na maioria das vezes em espiral ao longo de hifas ascendentes, mas no entanto, apresentava as demais características pertinentes ao gênero *Beauveria* como os conídios de textura lisa, em sua maioria globosos com tamanhos tendendo a homogeneidade, e presença de células conidiogênicas geniculadas e denticuladas.



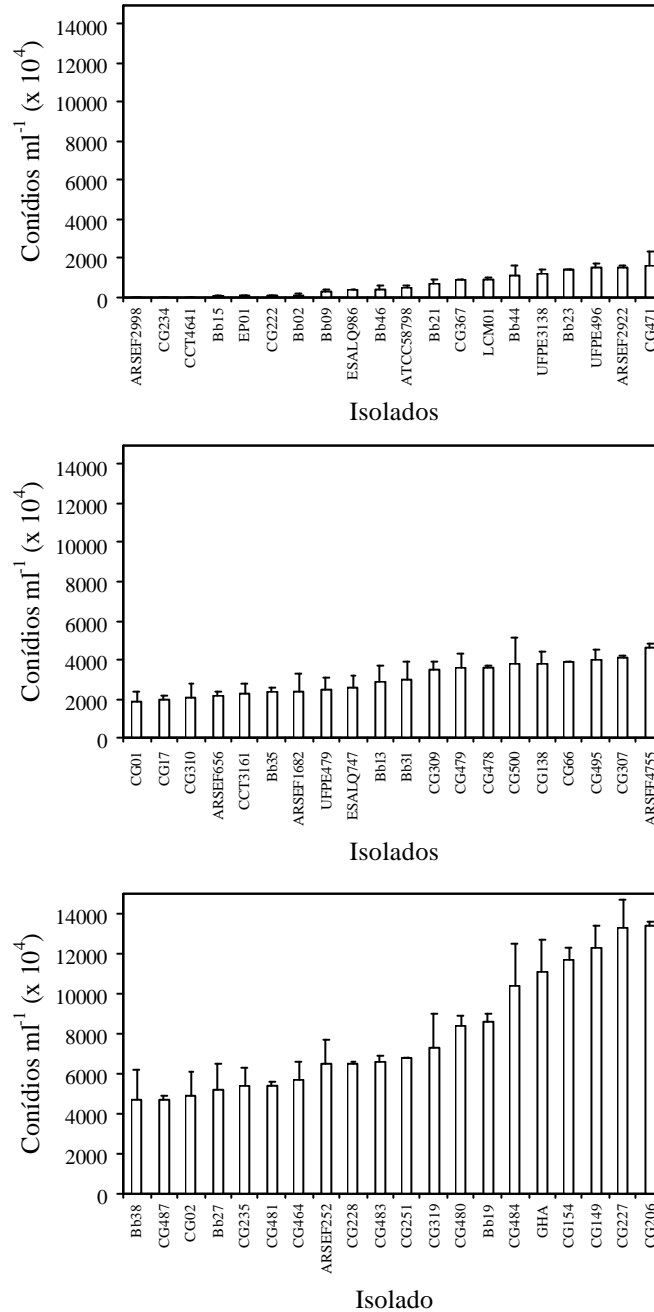
**Figura 1.** Colônias de *Beauveria bassiana* com tamanhos e aspectos variados. **A:** CG 464 – Colônia branca, lanosa e lisa, medindo 22,80 mm; **B:** ESALQ 986 – Colônia levemente amarelada, lanosa e zonada, medindo 22,57 mm; **C:** CG 66 – Colônia branca, lanosa e lisa, medindo apenas 9,48 mm; **D:** Bb 15 - Colônia branca, aveludada e lisa, medindo 20,39 mm; **E:** CG 17 - Colônia branca, aveludada e zonada, medindo 20,05 mm; **F:** Bb 13 – Colônia levemente amarelada, flocosa e zonada, medindo 20,10 mm; **G:** CG 484 – Colônia branca, flocosa e zonada, medindo 21,18 mm; **H:** Colônia da figura G em vista aproximada, notar presença de exsudato hialino sobre a colônia.





**Figura 2.** Isolados de *Beauveria* observados sob microscopia em magnitude de 1000  $\times$ . Barras = 10  $\mu$ m: **A:** *B. bassiana* com células conidiogênicas formando densos cachos; **B:** *B. bassiana* com células conidiogênicas em tamanhos variados e pouco agrupadas, notar presença da célula pedunculosa lateral em destaque; **C:** *B. bassiana* com célula conidiogênica solitária e com forma delgada; **D:** *B. brongniartii*; **E:** *B. velata*; **F:** *B. vermiconia*; **G:** *B. amorpha*; **H:** *Engyodontium album* (= *Beauveria alba*).

### Produção de Conídios



**Figura 3.** Produção de conídios dos isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) cultivados em meio PDAY a 25 °C durante 20 dias em total ausência de luz. O número de conídios expressa a produção média dos isolados em uma área de 0,589 cm<sup>2</sup> da cultura. O desvio padrão foi baseado em dois ensaios.

No entanto, em 1978 o mesmo autor relata que a exclusão de *B. alba* do gênero *Beauveria* permitiria tornar este gênero mais homogêneo, permanecendo restrito às espécies que apresentam densos grupos de pequenos ramos e células conidiogênicas em hifas indiferenciadas, embora estas características estejam também presentes em isolados de *Beauveria* quando cultivadas em meios de cultura artificiais. Dessa forma, em 1978 *B. alba* foi transferida para o gênero *Engyodontium* e a espécie renomeada *E. albus*. Contudo, por alguns anos certos autores permaneceram reconhecendo a espécie *B. alba* (MUGNAI *et al.*, 1989; ST LEGER *et al.*, 1992a), mas posteriormente esta foi reconhecida então como *E. albus* (SEKHON *et al.*, 1997; REHNER, 2005).

Os isolados de *B. bassiana* apresentaram algumas peculiaridades em relação a disposição do aparato conidial. Alguns isolados apresentavam células conidiogênicas agrupadas formando densos cachos, no entanto outros isolados apresentavam as células conidiogênicas formando pequenos cachos ou mesmo dispostas solitariamente. Segundo De Hoog (1972), *B. bassiana* quando cultivada em substrato natural apresenta aparato conidial compactamente agrupado com células conidiogênicas em densos cachos, porém quando cultivada em meios artificiais pode degenerar e diminuir muito brevemente a capacidade de apresentar ramos férteis fortemente agrupados e as células conidiogênicas também tendem a alongar-se e tornar-se mais delgadas. Sendo assim, faz-se entender o motivo de diversos isolados terem apresentado células conidiogênicas pouco agrupadas ou solitárias e com forma alongada e delgada, visto que praticamente todos os isolados estudados foram obtidos nas décadas de 70 a 90, e certamente vem sendo cultivados em diferentes meios artificiais e submetidos a diferentes métodos de preservação. Possivelmente os isolados pouco degenerados tenham menor sensibilidade ao cultivo artificial ou foram pouco manipulados. Os isolados UFPE 479 e UFPE 496, por exemplo, foram obtidos em 1955 e inicialmente identificados como *B. effusa* e *B. stephanoderis*, respectivamente. Esses dois isolados foram uns dos quais apresentaram as características mais marcantes de células conidiogênicas solitárias com raques bem alongadas.

Foi possível selecionar os isolados de *B. bassiana* com maior potencial de produção de conídios, no entanto, os isolados apresentaram grande variabilidade. Variação similar foi anteriormente relatada por Varela e Morales (1996) e Liu *et al.* (2003). Liu *et al.* (2003), porém, relataram que os isolados produtores de conídios de maior tamanho foram também os maiores produtores de conídios. Também foi observado no presente estudo que os isolados portadores de células conidiogênicas agrupadas em pequeno número ou solitárias foram também os isolados com menor produção de conídios quando comparados àqueles portadores de células conidiogênicas agrupadas formando densos cachos. Neste sentido, os resultados indicam que a produção de conídios parece estar fortemente relacionada a morfologia dos isolados, e que a baixa produção de conídios pode estar relacionada a degeneração dos isolados conforme fora relatado por De Hoog (1972).

Tanto características macro quanto microscópicas em *B. bassiana* foram bastante variadas entre os isolados. Baseado em resultados similares Varela e Morales (1996) relataram que a característica morfológica de colônias não deve ser considerada útil para seleção de isolados em *B. bassiana* considerando a ampla variação observada entre isolados. No entanto, o estudo morfológico é importante para identificação de espécimes obtidos de isolamento ou para utilização em determinado estudo, na avaliação das condições gerais dos isolados, e no monitoramento da cadeia de produção de fungos entomopatogênicos para fins de controle biológico identificando contaminantes e preservando assim a qualidade do produto biológico.

## **CAPÍTULO II**

### **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Beauveria* spp.**

## RESUMO

A genética de *Beauveria* não está ainda bem caracterizada. A investigação da variabilidade genética entre isolados de *B. bassiana* não só complementa informações biológicas fundamentais, mas também contribui para fazer cumprir as exigências para o registro de produtos biológicos. Além disso, permite uma identificação pontual de isolados favorecendo o melhor monitoramento da persistência e do comportamento de um isolado introduzido no ambiente para finalidade de controle. Baseado nisso, o presente estudo buscou caracterizar molecularmente 60 isolados, incluindo cinco espécies de *Beauveria* e um isolado de *Engyodontium album* (= *Beauveria alba*), originários de diversas regiões geográficas e artrópodes hospedeiros ou substratos. Os isolados foram caracterizados pelas análises de eletroforese de isoenzimas, AFLP e seqüenciamento de regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossomal. A eletroforese de isoenzimas permitiu revelar que o isolado de *E. album* difere geneticamente dos de *B. bassiana*. No entanto, a distinção dos isolados das demais espécies de *Beauveria* só foi possível pela análise de AFLP e o seqüenciamento de ITS de rDNA. As análises de eletroforese de isoenzimas e a análise de AFLP revelaram que os isolados brasileiros de *B. bassiana* apresentam considerável variação genética. Foi demonstrado ainda que a distância genética entre os isolados de *B. bassiana* está fortemente relacionada à distância geográfica. O nível de variação genética obtido entre os isolados reforça os resultados obtidos em estudos prévios e indicam que *B. bassiana* representa um agregado de espécies. Em alguns casos foram observados determinados isolados brasileiros de *B. bassiana* apresentando elevado coeficiente de similaridade e até mesmo total similaridade entre si evidenciando uma estrutura clonal. Essa semelhança de caracteres, porém, foi associada a isolados originados de mesma área geográfica. Esses dados revelam que a distância geográfica é fator importante para variabilidade genética entre isolados de *B. bassiana*, sendo portanto, fator relevante de influência na estrutura populacional em *B. bassiana*.

**Palavras-chave:** *Beauveria bassiana*; *Beauveria* spp.; *Engyodontium album*; isoenzimas; AFLP; seqüenciamento; regiões ITS; variabilidade genética.

## ABSTRACT

The genetic of *Beauveria* is not well characterized. The investigation of genetic variability among *B. bassiana* isolates do not only provide fundamental biological information, but also helps to satisfy the requirements for biopesticide registration. Besides, accurate identification of isolates would better monitor the persistence and behaviour of an isolate following release into the environment. Therefore, the present study aimed at characterizing 60 isolates, including five species of *Beauveria* and one species of *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*), originated from various geographic regions, arthropods hosts or substrates. The isolates were examined using isozymes electrophoresis, AFLP, and ITS1 and ITS2 sequencing. The isozymes phenotypes revealed genetic differences among *E. albus* and *B. bassiana* isolates. However, genetic distinctions among *Beauveria* spp. isolates were detected by AFLP and ITS sequencing analysis. Isozymes and AFLP analysis revealed that Brazilian isolates of *B. bassiana* presents significant genetic variation. Moreover, it was revealed that the genetic distance among *B. bassiana* isolates is associated with geographical distance. The level of genetic variation observed among isolates is in agreement with previous studies and reveals that *B. bassiana* represents a species aggregate. In addition, it was observed that certain Brazilian isolates of *B. bassiana* with high similarity coefficient, provided evidence of clonal structure. These similarities were associated with isolates which originated from the same geographic area. These data reveal that geographical distance is an important factor in genetic variability among *B. bassiana* isolates, in other words, it is a relevant factor of influence on population structure of the fungus *B. bassiana*.

**Key words:** *Beauveria bassiana*; *Beauveria* spp.; *Engyodontium albus*; isozymes; AFLP; sequencing; ITS regions; genetic variability.

# 1 INTRODUÇÃO

A partir da década de 70, o surgimento de numerosas técnicas moleculares permitiu novas oportunidades para o avanço de estudos nas áreas da taxonomia, filogenia e genética de população de *Beauveria*. Durante as décadas de 80 e 90, numerosos estudos foram publicados utilizando-se da quimiotaxonomia, bioquímica e técnicas baseadas na análise direta do DNA para caracterizar modelos de variação genética e relacioná-los ao gênero *Beauveria* (REHNER, 2005).

A proporção da variação natural em populações de *B. bassiana* avaliada através de pesquisa de perfis de esterase indicou certa homogeneidade entre isolados associado ao hospedeiro de origem e a determinada área geográfica (RIBA *et al.*, 1986a; POPRAWSKI *et al.*, 1988). Por outro lado, através de caracteres bioquímicos e da eletroforese de diferentes isoenzimas tem sido indicado grande variabilidade natural em populações de *B. bassiana* (MUGNAI *et al.*, 1989; ST LEGER *et al.*, 1992a).

Técnicas baseadas em análise direta do DNA em sistemas baseados na PCR também têm contribuído para o conhecimento de variação genética nas populações de *B. bassiana* e grande heterogeneidade intra-específica tem sido observada por Mauer *et al.* (1997), Berreta *et al.* (1998), Bidochka *et al.* (2002), Wang *et al.* (2003). No entanto, esta grande heterogeneidade demonstrada nesta complexa espécie tem permitido poucas conclusões sólidas sobre as estruturas de população e taxonomia (MUGNAI *et al.*, 1989).

As variações genéticas observadas em *B. bassiana* permitem identificar pelo menos três tipos de relação entre os isolados. Primeiramente, os isolados originários de uma mesma localidade demonstram elevada similaridade genética (ST LEGER *et al.*, 1992a; GLARE; INWOOD *et al.*, 1998). Em um segundo momento, os isolados geneticamente relacionados são altamente associados à espécie hospedeira (MAUER *et al.*, 1997; NEUVÉGLISE *et al.*, 1997). E finalmente, quando parece não existir nenhuma associação aparente entre origem geográfica ou hospedeiro entre diferentes isolados (BIDOCHKA *et al.*, 1994; BERRETA *et al.*, 1998; CASTRILLO; BROOKS, 1998). Contudo, a genética de *Beauveria* não está ainda bem caracterizada (REHNER, 2005).

Para avaliar *B. bassiana* como um agente de biocontrole, é importante investigar variações genéticas entre os isolados e suas capacidades de distribuição, persistência e o potencial de realizar permuta gênica dentro de uma mesma população e com outras populações. Esses dados não só complementaríamos informações biológicas fundamentais, mas também contribuiríamos em fazer cumprir as exigências para o registro de produtos biológicos (WANG *et al.*, 2003). Além disso, esse tipo de investigação permite uma identificação pontual de isolados favorecendo o melhor monitoramento da persistência e do comportamento de um isolado introduzido no ambiente para finalidade de controle (WANG *et al.*, 2005).

Baseado nessas informações, o presente estudo buscou caracterizar molecularmente 60 isolados, incluindo cinco espécies de *Beauveria* e um isolado de *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*), originários de diversas regiões geográficas, artrópodes hospedeiros ou substratos. A análise buscou investigar a variabilidade genética dos isolados brasileiros de *B. bassiana* e avaliar a distribuição espacial de genótipos. Além disso, buscou-se confirmar a identificação taxonômica dos isolados e conhecer a relação genética entre os isolados das diferentes espécies.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local e período de execução dos experimentos.

A caracterização molecular dos isolados foi realizada em duas instituições diferentes. A análise isoenzimática foi realizada no período entre junho de 2004 e julho de 2005 no Laboratório de Sistemática Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, no Rio de Janeiro. A análise de AFLP e seqüenciamento de rDNA foram realizadas no período entre dezembro de 2005 e fevereiro de 2006 no Departamento de Biologia da Universidade do Estado de Utah – USU, nos Estados Unidos.

### 2.2 Isolados estudados.

Cinquenta e três isolados de *B. bassiana* obtidos de diferentes hospedeiros e localidades foram estudados, 49 deles são originários de diferentes regiões geográficas brasileiras e quatro são isolados originários dos Estados Unidos. Também seis isolados de outras quatro espécies de *Beauveria* spp. e um isolado de *Engyodontium album* (= *Beauveria alba*) foram analisados como “outgroup”. Os isolados foram obtidos de coleções de culturas de diferentes instituições e suas origens geográficas e hospedeiros ou substratos estão disponíveis na Tabela 1.

### 2.3 Análise isoenzimática.

Os isolados foram cultivados em frascos contendo 50 ml de meio líquido mínimo de Pontecorvo (6,0 g NaNO<sub>3</sub>; 0,52 g KCl; 0,52 g MgSO<sub>4</sub>; 1,52 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10g Dextrose; 0,015 Traços de Fe; 0,015 g Traços de Zn; 1000 ml Água destilada) (PONTECORVO *et al.*, 1953). As culturas foram mantidas agitadas a 130 oscilações por minuto a 25 °C durante três dias. O micélio foi então coletado por filtração a vácuo utilizando-se papel de filtro estéril e armazenado em tubo “eppendorf” a –20 °C.

Posteriormente, o micélio foi macerado com auxílio de gral e pistilo previamente resfriados, e mantidos sob gelo durante a maceração. Ao micélio macerado foi acrescentado tampão de lise celular (0,37 M Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 5 mM β-mercaptoetanol; 1 × Triton ×-100 - Sigma) e pérolas de vidro (Sigma). Esta mistura foi homogeneizada em “vortex” por 30 segundos com pequenos intervalos a cada 10 segundos e novamente estocada a –20 °C (ALFENAS *et al.*, 1998).

Os géis para a eletroforese foram preparados utilizando-se agarose tipo V (Sigma) em solução tampão apropriado a cada enzima na proporção de 1:2 (Tabela 2). Aproximadamente 65 ml da solução eram vertidos sobre uma película plástica (GelBond® – Amersham Pharmacia) apoiada sobre um suporte nivelado. Após solidificação do gel, este era estocado a 4 °C para ser utilizado em até 48 horas.

Após a secagem do gel com papel de filtro, foi colocada sobre o gel uma fita de aplicação com 24 orifícios equidistantes. As amostras eram aplicadas nos orifícios da fita, com exceção de um orifício de cada extremidade da fita onde era aplicada uma solução de mistura de corantes (34 mg Azul de bromofenol - Sigma; 28 mg Xilenocianol - Sigma; 10 ml Água destilada) que servia como indicador de velocidade e término da corrida.

O gel era então colocado sobre a placa de cerâmica resfriada da cuba de eletroforese horizontal Modelo Multiphor II (Amersham Pharmacia). A placa resfriada a 9 °C era mantida nesta temperatura por um circulador de água resfriada Modelo Multitemp (Amersham



**Tabela 1.** Isolados de *Beauveria bassiana* e “outgroup” com isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium album* (= *Beauveria alba*), seus hospedeiros ou substratos, regiões geográficas e latitudes de origem, ano de isolamento e coleção de cultura procedente (continua).

<b>Isolados de <i>Beauveria</i> agrupados de acordo com hospedeiro / substrato de origem</b>					
#	Isolado*	Hospedeiro, Substrato	Origem	Latitude	Ano
<i>Beauveria bassiana</i>					
01	Bb 02	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
02	Bb 09	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
03	Bb 13	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
04	Bb 15	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
05	Bb 19	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
06	Bb 21	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
07	Bb 23	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
08	Bb 27	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
09	Bb 31	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
10	Bb 35	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
11	Bb 38	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
12	Bb 44	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
13	Bb 46	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
14	LCM 01	(Acari: Ixodidae)	Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil	22°45' S	2002
15	ESALQ 986	(Acari: Ixodidae)	Piracicaba, São Paulo, Brasil	22°43' S	1990
16	CG 66	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Brasília, Distrito Federal, Brasil	15°47' S	1988
17	CG 222	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Costa do Surubim, Amazonas, Brasil	2°33' S	1981
18	CG 227	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Pacajus, Ceará, Brasil	4°10' S	1982
19	CG 228	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Manaus, Amazonas, Brasil	3°07' S	1991
20	CG 319	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil	31°46' S	1990
21	CG 464	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Francisco Beltrão, Paraná, Brasil	26°50' S	1984
22	CG 481	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Ribeira do Pombal, Bahia, Brasil	10°50' S	1985
23	CG 484	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Ponta Porã, MS, Brasil	22°32' S	1983
24	CG 495	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Londrina, Paraná, Brasil	23°18' S	1987
25	CG 500	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Goiânia, Goiás, Brasil	16°44' S	1985
26	ARSEF 252	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Orono, Maine, Estados Unidos	44°53' N	1978
27	GHA	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Montana, Estados Unidos	44°53' N	1980
28	CG 02	(Coleoptera: Curculionidae)	Manaus, Amazonas, Brasil	3°07' S	1988
29	CG 138	(Coleoptera: Curculionidae)	Recife, Pernambuco, Brasil	8°05' S	1989
30	CG 367	(Coleoptera: Curculionidae)	Aracaju, Sergipe, Brasil	1°054' S	1991
31	CG 471	(Coleoptera: Curculionidae)	Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil	28°23' S	1984
32	CG 478	(Coleoptera: Curculionidae)	Campinas, São Paulo, Brasil	22°55' S	1983
33	CG 483	(Coleoptera: Curculionidae)	Goiânia, Goiás, Brasil	16°44' S	1982
34	EP 01	(Coleoptera: Curculionidae)	Itajaí, Santa Catarina, Brasil	26°54' S	1989
35	CG 17	(Coleoptera: Scolytidae)	Piracicaba, São Paulo, Brasil	22°43' S	1988
36	UFPE 496	(Coleoptera: Scolytidae)	Estados Unidos	38°54' N	1955
37	CG 01	(Homoptera: Cercopidae)	Brasília, Distrito Federal, Brasil	15°47' S	1984
38	CG 149	(Homoptera: Cercopidae)	Goiânia, Goiás, Brasil	16°44' S	1982
39	CG 154	(Homoptera: Cercopidae)	Jataí, Goiás, Brasil	17°53' S	1983
40	CG 234	(Homoptera: Cicadellidae)	Ponta Porã, MS, Brasil	22°32' S	1983
41	CG 206	(Hymenoptera: Vespidae)	Costa do Arapapa, Amazonas, Brasil	0°33' S	1981
42	CG 235	(Hymenoptera: Vespidae)	Costa do Arapapa, Amazonas, Brasil	0°33' S	1981
43	CG 479	(Hymenoptera: Vespidae)	Santana do Ipanema, Alagoas, Brasil	9°22' S	1985
44	ESALQ 747	(Hymenoptera: Formicidae)	Belém Novo, RS, Brasil	30°13' S	1988
45	CCT 4641	(Hymenoptera: Formicidae)	Cuiabá, Mato Grosso, Brasil	15°37' S	1988
46	CG 251	(Hymenoptera: Formicidae)	Colinas do Sul, Goiás, Brasil	14°12' S	1991
47	CG 480	(Hymenoptera: Formicidae)	Ribeira do Pombal, Bahia, Brasil	10°50' S	1985

**Tabela 1.** Continuação.

#	Isolado*	Hospedeiro, Substrato	Origem	Latitude	Ano
48	CG 487	(Hymenoptera: Apoidae)	São Carlos, Santa Catarina, Brasil	27°04' S	1984
49	UFPE 479	(Lepidoptera: Bombycidae)	Brasil	15°47' S	1955
50	CG 307	Solo	Goiás, Brasil	15°56' S	1990
51	CG 309	Solo	Salto da Divisa, Minas Gerais, Brasil	16°00' S	1990
52	CG 310	Solo	Jequié, Bahia, Brasil	13°52' S	1990
53	CCT 3161	Contaminante de Laboratório	Estados Unidos	38°54' N	1970
OUT GROUP					
#	Isolado*	Hospedeiro, Substrato	Origem	Latitude	Ano
<i>Beauveria amorpha</i>					
54	ARSEF 656	(Homoptera: Cicadellidae)	Hunan, China	28°43' N	1981
55	ARSEF 1682	(Coleoptera: Scarabaeidae)	Nagano Prefecture, Japão	36°39' N	1980
56	ARSEF 4755	Solo	Bruny Island, Tasmania, Austrália	43°25' S	1988
<i>Beauveria brongniartii</i>					
57	ATCC 58798	(Diptera: Tipulidae)	Czechoslovakia	50°50' N	?
<i>Beauveria velata</i>					
58	ARSEF 2998	(Lepidoptera)	Equador	0°11' S	1990
<i>Beauveria vermiconia</i>					
59	ARSEF 2922	Cinza vulânica	Valdivia, Los Lagos, Chile	39°49' S	1974
<i>Engyodontium albus</i> (= <i>Beauveria alba</i> )					
60	UFPE 3138	Solo marinho	Pernambuco, Brasil	8°05' S	1989

\* Coleção de Culturas: **Bb** = Laboratório de Coleção de Cultura de Fungos – Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Brasil; **LCM** = Laboratório de Controle Microbiano - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Brasil; **ESALQ** = Departamento de Entomologia - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ, USP, Brasil; **CG** = Centro Nacional de Recursos Genéticos - CENARGEN, EMBRAPA, Brasil; **ARSEF** = ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures - ARSEF, USDA, Estados Unidos; **EP** = Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A. – EPAGRI, Brasil; **UFPE** = Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Brasil; **CCT** = Coleção de Culturas Tropicais André Tosello, Brasil; **GHA** = Isolado comercializado por Emerald Bioagriculture Corporation, MYCOTROL ES®, EPA 070810-00006, Estados Unidos; **ATCC** = American Type Culture Collection, Estados Unidos.

Pharmacia). Na cuba de eletroforese eram colocados aproximadamente dois litros de tampão, o qual variava de acordo com a enzima a ser revelada (Tabela 2). A solução tampão utilizada na cuba de eletroforese era a mesma solução utilizada previamente na preparação do gel. A voltagem era mantida em torno de 20 V cm<sup>-1</sup> e fornecida por uma fonte de energia LKB Modelo 2103.

Ao término da corrida a revelação da atividade enzimática no gel foi feita por meio de soluções contendo os reagentes necessários para que ocorresse a reação enzimática e posteriormente a visualização da mesma. O gel era incubado em estufa a 37 °C até que houvesse a revelação das bandas. Quando as bandas apresentavam-se nítidas, a revelação era interrompida adicionando-se solução de ácido acético a 5%. Os géis eram lavados nesta mesma solução até que o excesso de material não precipitado fosse removido. Os géis eram secos em temperatura ambiente e posteriormente analisados e guardados em álbuns fotográficos.

Foram testados 26 sistemas enzimáticos baseados em Harris e Hopkinson (1976) e Alfenas *et al.* (1998) a fim de se obter a revelação das seguintes “loci” gênicos: Aconitase (ACON – E.C. 4.2.1.3), Adenilato cinase (ADK – E.C. 2.7.4.3), Alanina desidrogenase (ALDH – E.C. 1.4.1.1), Álcool desidrogenase (ADH - E.C. 1.1.1.1), Catalase (CAT – E.C. 1.11.1.6), Enzima málica (EM – E.C. 1.1.1.40), Esterase (EST – E.C. 3.1.1.1), Fosfatase ácida

**Tabela 2.** Soluções tampão utilizadas nos eletrodos e nos géis para a eletroforese de isoenzimas.

<b>Solução tampão</b>	<b>Componentes*</b>	
I- Tris Borato pH 8,0	Tris	121,20 g
	Ácido bórico	80,00 g
	Na <sub>2</sub> EDTA	12,00 g
	Água Milli-RO	2000 ml
II- Tris Cítrico pH 6,3	Tris	54,00 g
	Ácido cítrico	36,14 g
	Água Milli-RO	2000 ml
III- Tris Cítrico pH 8,1	Tris	62,70 g
	Ácido cítrico	33,00 g
	Água Milli-RO	2000 ml
IV- Fosfato pH 6,7	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	36,28 g
	NaOH	4,78 g
	Água Milli-RO	2000 ml
V- Fosfato pH 7,0	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,12 g
	Ácido cítrico	0,50 g
	Água Milli-RO	2000 ml
VI- Fosfato pH 7,5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,12 g
	Ácido cítrico	0,50 g
	Água Milli-RO	2000 ml
VII- Fosfato pH 8,0	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,21 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	54,50 g
	Água Milli-RO	2000 ml
VIII- Tris Maléico pH 7,4	Tris	24,22 g
	Ácido málico	10,00 g
	Na <sub>2</sub> EDTA	0,74 g
	MgCl <sub>2</sub>	0,19 g
	Água Milli-RO	2000 ml
IX- Tris Maléico pH 8,2	Tris	24,22 g
	Ácido málico	23,20 g
	Na <sub>2</sub> EDTA	7,44 g
	MgCl <sub>2</sub>	4,06 g
	Água Milli-RO	2000 ml

\* Produtos Sigma, com exceção da água milli-RO.  
Quando necessário o pH da solução era ajustado com NaOH.

(ACP – E.C. 3.1.3.2), Fosfatase alcalina (AKP – E.C. 3.1.3.1), Fosfofrutoquinase (FK – E.C. 2.7.1.4), Fosfoglucomutase (PGM – E.C. 2.7.5.1), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGD – E.C. 1.1.1.43), Fosfogluose isomerase (GPI – E.C. 5.3.1.9), Fumarase (FUM – E.C. 4.2.1.2), Glicerato-2-desidrogenase (G2D – E.C. 1.1.1.29), Glicose desidrogenase (GDH – E.C. 1.1.1.47), Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD – E.C. 1.1.1.49), Glutamato desidrogenase (GLD – E.C. 1.4.1.2), Hexoquinase (HK – E.C. 2.7.1.1), Isocitrato desidrogenase (IDH – E.C. 1.1.1.42), Lactato desidrogenase (LDH – E.C. 1.1.1.27), Lipase (E.C. 3.1.1.3), Malato desidrogenase (MDH – E.C. 1.1.1.37), Piruvatoquinase (PK – E.C. 2.7.1.40), Quitinase (E.C. 3.2.1.14) e Superóxido dismutase (SOD – E.C. 1.15.1.1).

A solução tampão adequada para revelação de cada uma das enzimas foi definida após tentativas com os nove tampões listados na Tabela 2 até que uma melhor definição de bandas fosse revelada. As enzimas que apresentaram sistemas de revelação satisfatórios estão listadas na Tabela 3 juntamente com o sistema utilizado.

Neste sentido, foi feita a análise de similaridade dos perfis de isoenzimas através do cálculo do Coeficiente de Concordância Simples (Simple Match Coefficient). Dessa forma, foi estabelecida uma matriz de similaridade entre os isolados e essas matrizes transformadas em dendrogramas pelo método não ponderado de agrupamento aos pares (UPGMA - unweighted pair-group method with arithmetic mean) (SNEATH; SOKAL, 1973) pelo programa NTSYS-pc versão 2.1 (Exeter Software, Setauket, New York). A análise de “Bootstrap” foi realizada através do programa Free Tree para confirmar a fidelidade dos agrupamentos. Em seguida, utilizando-se o programa NTSYS-pc versão 2.1 foi feita a análise da Distância Genética de Nei (NEI, 1972) usando o método UPGMA com finalidade de formar grupos geneticamente relacionados.

Além disso, foi calculada a distância Euclidiana entre os isolados. A matriz foi transformada de forma que os elementos extraídos pudessem ser interpelados como coordenadas das Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs – Operational Taxonomic Units) em um dado espaço através da Análise de Coordenadas Principais (PCA – Principal Components Analysis) desenvolvida por Gower (1966), ou seja, trata-se de um método ponderado de agrupamento com visão espacial. As matrizes e gráficos foram também realizados pelo programa NTSYS-pc versão 2.1.

## **2.4 Análise de AFLP.**

Todos os isolados foram cultivados em frascos contendo 50 ml de meio líquido CDB (Czapek-Dox Broth, Difco). As culturas foram agitadas a 130 oscilações por minuto a 25 °C durante 4 dias. O micélio foi coletado por filtração a vácuo e armazenado em tubos “eppendorf” a –20 °C. Posteriormente, o micélio foi macerado em nitrogênio líquido com gral e pistilo, suspenso em 1 ml de tampão TE (Tris-EDTA: 10 mM Tris; 0,1 mM EDTA, pH 8,0) e estocado a –20 °C até o uso.

Após descongelamento, aproximadamente 70 mg de micélio de cada isolado foi colocado em tubo “eppendorf” com capacidade para 2 ml e o DNA genômico foi extraído usando DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (Qiagen), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. O DNA extraído foi submetido à eletroforese submarina em gel de agarose a 0,7% em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA: 4,84 g Tris base; 1,14 ml Ácido acético glacial; 2,0 ml EDTA 0,5 M, pH 8,0; 1000 ml Água destilada), a 120 V, para estimar a qualidade e quantidade de DNA. Como marcador de peso molecular utilizou-se o 100 bp DNA ladder (Amersham Pharmacia). Os géis foram corados com brometo de etídio (Sigma) e visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

**Tabela 3** Sistemas de revelação das 16 enzimas que demonstraram bandas bem definidas e constantes, e tiveram os perfis de isoenzimas analisados (Continua).

<b>Enzima</b>	<b>Tampão da reação*</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Substratos*</b>	<b>Coenzimas* (4 mg ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ativadores* (400 mg ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Enzima de ligação*</b>	<b>Método de visualização*</b>	<b>Tampão dos eletrodos e gel</b>
<b>ADK</b>	25 ml Tris HCl pH 8,0	-	100 mg Glicose	1 ml NADP	1 ml MgCl <sub>2</sub> 25 mg ADP	10 µl G6PDH 10 µl HK	1 ml PMS 2 ml MTT 10 ml agarose	Fosfato pH 8,0
<b>EST</b>	10 ml Tris HCl pH 7,4	40 ml	25 mg α-naftil-acetato	-	-	-	25 mg Fast Blue RR	Fosfato pH 8,0
<b>ACP</b>	50 ml Tris Cítrico pH 4,5	-	50 mg α-naftil-acetato	-	-	-	50 mg Fast Blue BB Salt	Tris Maléico pH 7,4
<b>AKP</b>	20 ml Tris HCl pH 8,6	-	10 mg β-naftil ácido fosfórico	-	100 µl MgCl <sub>2</sub> 20 mg MnCl <sub>2</sub>	-	8 mg Fast Blue BB Salt	Tris Cítrico pH 6,3
<b>FK</b>	4 ml Tris HCl pH 8,0	-	100 mg Frutose 1,6- difosfato	2 ml NADP	200 µl MgCl <sub>2</sub> 20 mg ATP	20 µl GPI	2 ml PMS 2 ml MTT 10 ml agarose	Fosfato pH 8,0
<b>PGM</b>	4 ml Tris HCl pH 7,4	-	2 ml Glicose-1-fosfato	1 ml NADP	200 µl MgCl <sub>2</sub>	10 µl G6PDH	1 ml PMS 2 ml MTT 10 ml agarose	Fosfato pH 8,0
<b>6PGD</b>	4 ml Tris HCl pH 8,0	-	2 ml 6-fosfocluconato	1 ml NADP	500 µl MgCl <sub>2</sub>	-	1 ml PMS 2 ml MTT 10 ml agarose	Fosfato pH 8,0
<b>GPI</b>	4 ml Tris HCl pH 8,0	1 ml	1ml Frutose-6-fosfato	1 ml NADP	200 µl MgCl <sub>2</sub>	10 µl G6PDH	1 ml PMS 2 ml MTT 10 ml agarose	Fosfato pH 8,0
<b>FUM</b>	4 ml Tris HCl pH 7,4	-	250 mg Ácido fumárico (Sol. tampão + substrato e pH corrigido para 7,0)	2 ml NAD	-	8 µl MDH	2,5 ml PMS 2,5 ml MTT 10 ml agarose	Fosfato pH 8,0

**Tabela 3.** Continuação.

Enzima	Tampão da reação*	H <sub>2</sub> O	Substratos*	Coenzimas* (4 mg ml <sup>-1</sup> )	Ativadores* (400 mg ml <sup>-1</sup> )	Enzima de ligação*	Método de visualização*	Tampão dos eletrodos e gel
<b>G2D</b>	4 ml Tris HCl pH 7,4	-	200 mg Ácido L- glutâmico	2 ml NADP	300 µl MgCl <sub>2</sub>	-	1 ml PMS 2 ml MTT 10 ml agarose	Fosfato pH 8,0
<b>G6PD</b>	4 ml Tris HCl pH 7,4	-	1 ml Glicose-6-fosfato	2ml NADP	300 µl MgCl <sub>2</sub>	-	1 ml PMS 2 ml MTT 10 ml agarose	Fosfato pH 8,0
<b>HK</b>	6 ml Tris HCl pH 7,4	-	100 mg Glicose	1 ml NADP	200 µl MgCl <sub>2</sub> 40 mg ATP	10 µl G6PDH	1 ml PMS 2 ml MTT 10 ml agarose	Fosfato pH 8,0
<b>IDH</b>	4 ml Tris HCl pH 8,0	-	2 ml Isocitrato (20mg/ml)	1 ml NADP	200 µl MgCl <sub>2</sub>	-	1 ml PMS 2 ml MTT 10 ml agarose	Fosfato pH 8,0
<b>MDH</b>	4 ml Tris HCl pH 8,0	-	1 ml Malato de sódio	2 ml NAD	-	-	1 ml PMS 2 ml MTT 10 ml agarose	Fosfato pH 8,0
<b>PK</b>	4 ml Tris HCl pH 8,0	-	30 mg Fosfoenolpiruvato 30 mg Frutose 1,6- difosfato 400 mg L-D Glicose	1 ml NAD 1 ml NADP	60 mg ADP 80 mg MgSO <sub>4</sub> 80 mg KCl	1,7 U HK 1,7 U G6PDH	1 ml PMS 2 ml MTT 10 ml agarose	Tris Maléico pH 7,4
<b>SOD</b>	(**)							Fosfato pH 8,0

\* Reagentes Sigma.

\*\* Revelação da SOD segundo Alfenas *et al.* (1998): Incubar o gel em solução A (50 ml de Tampão Fosfato a 50 mM pH 7,5; 10 mg de MTT) por 20 minutos a 30 °C no escuro. Descartar a solução A e incubar o gel com a solução B (50 ml de Tampão Fosfato a 50 mM pH 7,5; 0,2 ml de TEMED; 0,5 mg de Riboflavina) sob iluminação até as bandas aparecerem.

O DNA (50 a 100 ng) foi digerido durante 1 hora a 37 °C pela ação de 5 unidades das enzimas EcoRI (GAATTC) e MseI (TTAA), acrescido de 5 µl do tampão RL 10 × (Restriction/Ligation: 100 mM Tris-Hac; 100 mM MgAc; 500 mM KAc; 50 mM DTT, pH 7,5; estocado a -20 °C), e água bidestilada estéril até completar o volume de 50 µl. Após a digestão, foi adicionado 10 µl de uma solução contendo 0,5 µl de cada adaptador-EcoRI (10 mM) e 0,5 µl de cada adaptador-MseI (100 mM) (Tabela 4), 1 unidade de T4 DNA-ligase, 1,2 mM de ATP, 1 µl de tampão RL 10 ×, e água bidestilada estéril até completar os 10 µl de volume. A incubação foi continuada por mais 3 horas a 37 °C. Após ligação, a reação foi estocada a -20 °C.

**Tabela 4.** Informações dos oligonucleotídeos utilizados na AFLP.

<b>Oligonucleotídeos AFLP</b>	
<i>Adaptadores</i>	
Eco-F	5`-CCT GTA GAC TGC GTA CC-3`
Eco-R	5`-AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3`
Mse-F	5`-GAC GAT GAG TCC TGA G-3`
Mse-R	5`-TAC TCA GCA CTC AT-3`
<i>Iniciadores</i>	
Eco-ANN*	5`-GAC TGC GTA CCA ATT CAN N-3`
Mse-A	5`-GAT GAG TCC TGA GTA AA-3`

\* N representa ausência ou presença de uma base nitrogenada: C, G, A ou T na terminação do iniciador. Os iniciadores Eco diferiram em terminação de acordo com o tipo de reação.

A reação PCR de pré amplificação foi executada em 6 µl do DNA ligado, 0,5 µl de EcoA (10 mM), 0,5 µl de MseA (10 mM) (Tabela 4), 2 µl de dNTP (5 mM), 3 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 unidade de *Taq* polimerase, 5 µl de tampão PCR 10 ×, e água bidestilada estéril até completar o volume de 50 µl. A reação de PCR pré amplificação incluiu um ciclo inicial de 72 °C por 2 minutos, seguido por 29 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto em termociclador GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700. Então, 10 µl dos produtos da pré amplificação com 2 µl de corante marcador de corrida foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,4% a 120 V em tampão TAE, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Perfis AFLP multilocus foram obtidos através de 3 diferentes amplificações por PCR. Os iniciadores utilizados foram: A para MseI e AGC para EcoRI extensão do iniciador; A para MseI e AGG para EcoRI extensão do iniciador; e A para MseI e ACC para EcoRI extensão do iniciador (Tabela 4). Para cada combinação de iniciadores uma amplificação de PCR foi realizada em 2,5 µl dos produtos da pré amplificação de PCR diluído a 1:10 em água, 0,05 µl do iniciador Eco (10 mM), 0,2 µl do iniciador Mse (10 mM), 0,4 µl de dNTP (5 mM), 0,6 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 unidades de *Taq* polimerase, 1 µl de tampão PCR 10 ×, e água bidestilada estéril até completar o volume de 10 µl. A amplificação de PCR foi realizada sob

os seguintes parâmetros termocicladores: 94 °C por 2 minutos, então iniciado um processo de “touchdown” usando uma etapa de desnaturação por 30 segundos a 94 °C, uma etapa de anelamento de 30 segundos a 65 °C, e uma etapa de extensão de 1 minuto a 72 °C. Este procedimento foi repetido por 9 vezes, e a cada vez a temperatura de anelamento era reduzida em 1 °C. A temperatura de anelamento na etapa final do “touchdown” foi 57 °C, seguida por 30 ciclos do programa convencional do termociclador: 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos.

Uma quantidade apropriada de ABIs ROX 400 tamanho padrão foi adicionada e carregada no ABI 3100. Marcadores AFLP entre 50-400 pb foram analisados no Genographer software (adquirido gratuitamente em <http://hordeum.oscs.montana.edu/genographer/>). “Cluster analysis” foi feita utilizando-se NTSYS-pc versão 2.1 (Exeter Software, Setauket, New York) e um dendrograma combinado dos três pares de iniciadores foram obtidos a partir da matriz de similaridade calculada usando o Coeficiente de Concordância Simples (Simple Match Coefficient). “Cluster analysis” foi realizada usando o método não ponderado de agrupamento aos pares (UPGMA). As análises foram realizadas em todos os 53 isolados de *B. bassiana* e também em 13 réplicas para análise do erro. Outra análise foi realizada com o “out-group” e um isolado de *B. bassiana* para comparação. Além disso, testes de Mantel foram usados para detecção da estrutura populacional dos isolados brasileiros de *B. bassiana* utilizando o programa Mantel-Struct, versão 1.0.

## 2.5 Sequenciamento de rDNA.

As regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossomal (rDNA) foram amplificadas por PCR com os seguintes pares de iniciadores: ITS1F (5'- CCTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGC TTATTGATATGC-3') (DE MURO *et al.*, 2005). Os iniciadores foram sintetizados por “Integrated DNA Technologies, Inc.”. A reação de PCR consistiu de 50 ng de DNA, uma concentração final de 50 pmol de cada iniciador, 0,6 mM de dNTP, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 unidade de *Taq* polimerase, 1 × tampão PCR, e água bidestilada estéril até completar 50 µl. O programa dos ciclos de amplificação da PCR foi constituído por um ciclo inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido por uma etapa de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, etapa de anelamento a 50 °C por 45 segundos, e etapa de extensão a 72 °C por 2 minutos, e uma etapa adicional de extensão a 72 °C por 10 minutos.

Então, 5 µl dos produtos da PCR acrescidos de 2 µl do corante marcador da corrida foram submetidos a eletroforese a 120 V em gel de agarose a 1%, usando tampão Tris-acetato EDTA. Utilizou-se o 100 bp DNA ladder (Amersham Pharmacia) como marcador de peso molecular. Após eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

Os fragmentos ITS amplificados por PCR dos 23 isolados de *B. bassiana* e 1 isolado de *B. brongniartii* foram escolhidos baseados no dendrograma gerado pelo AFLP, e purificados usando Montage<sup>®</sup> PCR Centrifugal Filter Device (Millipore Corporation). Todos os 24 fragmentos ITS purificados foram sequenciados diretamente em ABI 3100. Toda a sequência foi alinhada utilizando-se o programa Segman (DNA Star, Inc.) e um dendrograma “neighbour-joining” foi gerado usando MEGA versão 3.1 (KUMAR *et al.*, 2004).



## 3 RESULTADOS

### 3.1 Análise isoenzimática.

Inicialmente foram testadas 26 enzimas para a análise de isoenzimas por eletroforese, porém somente 16 apresentaram sistemas de revelação satisfatórios traduzidos por bandas bem definidas e constantes nas revelações, e foram utilizadas para a análise final dos resultados.

Dos 53 isolados de *B. bassiana* estudados, CG 66 e CG 227 foram excluídos da análise final por não apresentarem bandas nítidas na revelação das enzimas. Esses isolados não apresentaram desenvolvimento satisfatório no meio líquido de Pontecorvo e sendo assim, não foi possível obter quantidade de micélio necessária para uma boa revelação das enzimas.

Foram obtidos 53 tipos eletroforéticos (ETs), sendo 46 tipos distribuídos entre os 51 isolados de *B. bassiana*. Cada um dos sete isolados das demais espécies analisadas apresentou um tipo eletroforético diferente (Tabela 5).

Dentre os eletromorfos encontrados pode-se observar que o “locus” SOD é monomórfico para os isolados de todas as espécies analisadas, inclusive *E. albus*. Dentre os isolados de *B. bassiana*, 96% apresentaram o alelo 3 no “locus” PGM, 92% apresentaram o alelo 3 no “locus” 6PGD, 90% apresentaram o alelo 2 para os “loci” FUM e G2D, e 86% apresentaram os alelos 1 e 3 para os “loci” IDH e PK, respectivamente.

O “locus” EST foi altamente polimórfico, inclusive entre os isolados de *B. bassiana*, no entanto este “locus” não foi detectado em *B. velata* (ARSEF 2998) e no isolado ARSEF 656 de *B. amorpha*. O alelo 8 esteve presente em 88% dos isolados de *B. bassiana* e também no isolado de *B. brongniartii* e *B. vermiconia*. Em *B. vermiconia*, EST foi o único “locus” detectado, e apenas através do alelo 8.

O “locus” MDH apresentou os alelos 2 e 5 entre os isolados de *B. bassiana*, com exceção dos isolados CG 138 e CG 479 que apresentaram os alelos 1 e 5, e 3 e 5, respectivamente. Os isolados ATCC 58798 de *B. brongniartii* e o ARSEF 656 de *B. amorpha* também apresentaram os alelos 2 e 5.

Aos isolados cuja visualização da enzima no gel não era satisfatória com bandas apresentando-se muito fracas e difusas e inconstantes nas revelações, o “locus” foi tabulado como zero.

A confecção de dendrograma baseado no Coeficiente de Concordância Simples demonstrou 38 isolados brasileiros de *B. bassiana* agrupados em um grupo principal com coeficiente de similaridade em torno de 0,87. Este grupo se relacionou com o isolado norte americano de *B. bassiana*, GHA, exibindo 84% de caracteres em comum. Além disso, este grupo principal se relacionou exibindo coeficiente de similaridade inferior a 0,84 com os demais isolados de *B. bassiana* originários dos Estados Unidos e alguns do norte e nordeste do Brasil (CG 480, CG 228, CG 483, CG 479, CG 251 e CG 138), e também com os isolados das demais espécies estudadas de *B. brongniartii*, *B. amorpha*, *B. velata*, *B. vermiconia* e *E. albus* (Figura 1).

Os isolados não se agruparam no dendrograma em relação ao hospedeiro ou região geográfica de origem, no entanto os isolados norte americanos de *B. bassiana* apresentaram-se destacados da maioria dos isolados brasileiros desta espécie. A análise de “Bootstrap” comprova a fidelidade desses agrupamentos (Figura 2).

O cálculo da distância genética entre os isolados estudados permitiu a construção de um dendrograma formado por 6 grupos (Figura 3). Novamente os isolados ARSEF 252, CG 138 e UFPE 496 foram os isolados de *B. bassiana* mais divergentes. Interessante observar que os isolados de *B. brongniartii* (ATCC 58798) e *B. velata* (ARSEF 2998) agruparam-se

**Tabela 5.** Eletromorfos encontrados em *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) através de análise isoenzimática (continua).

N°	Isolados*	ADK	SOD	ACP	AKP	FK	PGM	6PGD	GPI	FUM	G2D	G6PD	HK	IDH	MDH	PK	EST
01	Bb 02★	1/4	1	3	3	3	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	2/5/8
02	Bb 09	1/4	1	3	3	3	3	3	1	2	2	3	3	1	2/5	3	2/8
03	Bb 13	1/4	1	3	3	3	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	5/8
04	Bb 15	1/4	1	3	3	3	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	2/8
05	Bb 19☆	1/4	1	3	3	4	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	5/8
06	Bb 21	1/4	1	3	3	4	3	3	1	2	2	3	2	1	2/5	3	2/5/8
07	Bb 23	1/4	1	3	2/3	3	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	5/8
08	Bb 27	1/4	1	1/3	2/3	3	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	2/5/8
09	Bb 31	1/4	1	3	3	3	3	3	1/3	2	2	1	2	1	2/5	3	5
10	Bb 35	1	1	3	3	3	3	3	1	2	4	3	2	1	2/5	4	3/8
11	Bb 38☆	1/4	1	3	3	4	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	5/8
12	Bb 44	2/4	1	3	3	4	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	1/5/8
13	Bb 46	1/4	1	3	2/3	4	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	5/8
14	LCM 01	1	1	3	3	0	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	5/8
15	ESALQ 986★	1/4	1	3	3	3	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	2/5/8
16	CG 66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	CG 222	2/4	1	1/3	2/3	3	3	3	1	2	2	2	2	1	2/5	3	2/5/8
18	CG 227	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	CG 228	4	1	3	2/3	0	3	3	1	0	2	2	3	1	2/5	4	3/8
20	CG 319	1/4	1	3	3	4	3	3	1	2	2	1	3	1	2/5	3	8
21	CG 464	1/4	1	3	3	4	3	3	1	2	2	2	3	1	2/5	3	8
22	CG 481	1	1	3	3	3	3	3	2	2	2	1	2	1	2/5	3	8

**Tabela 5.** Continuação.

N°	Isolados*	ADK	SOD	ACP	AKP	FK	PGM	6PGD	GPI	FUM	G2D	G6PD	HK	IDH	MDH	PK	EST
23	CG 484	1/4	1	3	3	3	3	3	1	2	2	1	3	1	2/5	3	2/8
24	CG 495★	1/4	1	3	3	3	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	2/5/8
25	CG 500	1/4	1	3	3	0	3	3	1	2	2	1	3	1	2/5	3	3/5/8
26	ARSEF 252	1	1	1/2	1/2	2	3	3	1	1	2	1	2	2	2/5	3	4/9
27	GHA	1/4	1	3	3	2	3	1/3	1	2	2	1	1/2	2	2/5	3	4/8
28	CG 02	1/4	1	1/3	3	3	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	1/5/8
29	CG 138	1/3	1	4	4	1	4	1	1	2	2	2	2	1	1/5	4	2/5/8
30	CG 367	1/4	1	3	3	3	3	3	1	2	3	2	3	1	2/5	3	2
31	CG 471	1/4	1	1/3	2/4	3	3	3	1	2	2	2	2	1	2/5	3	5/8
32	CG 478★	1/4	1	3	3	3	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	2/5/8
33	CG 483	2/4	1	3	2	0	3	3	1	0	1	2	3	1	2/5	3	8
34	EP 01★	1/4	1	3	3	3	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	2/5/8
35	CG 17	1	1	3	3	3	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	3/5/8
36	UFPE 496	4	1	4	4	0	2	3	1	3	2	2	2	3	2/5	4	6
37	CG 01	1/4	1	3	3	3	3	3	1	2	2	1	3	1	2/5	3	8
38	CG 149	1/4	1	1/3	2/3	3	3	3	1	2	2	1	3	1	2/5	3	2/8
39	CG 154	2	1	1/3	2/3	3	3	3	1	2	2	2	3	1	2/5	3	8
40	CG 234	0	1	3	3	3	3	3	1	2	3	0	3	1	2/5	3/4	2/5
41	CG 206	1/4	1	3	3	0	3	3	1	2	2	1	3	1	2/5	3	3/8
42	CG 235	1/4	1	3	3	3	3	3	1	2	2	1	3	1	2/5	3	3/8
43	CG 479	2/4	1	1/3	2/3	3	3	3	1	0	2	1	3	1	3/5	3	3/8
44	ESALQ 747	1/4	1	3	3	3	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	1/5/8

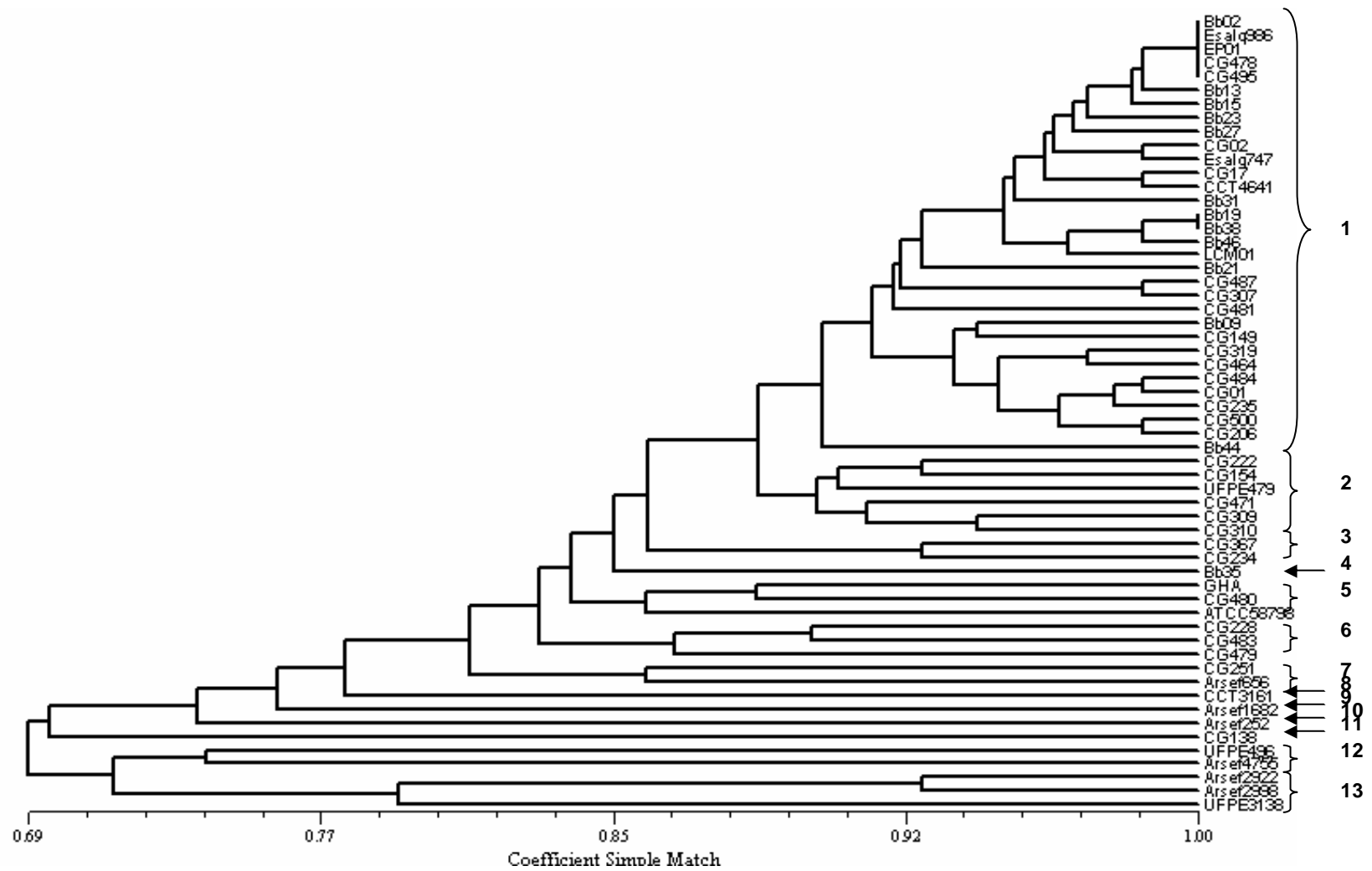
**Tabela 5.** Continuação.

N°	Isolados*	ADK	SOD	ACP	AKP	FK	PGM	6PGD	GPI	FUM	G2D	G6PD	HK	IDH	MDH	PK	EST
45	CCT 4641	1/4	1	3	3	3	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	3/5/8
46	CG 251	1	1	3	3	2	3	2	1	2	2	1	4	3	2/5	3	4
47	CG 480	3/4	1	3	3	0	3	1/3	1	2	2	1	2	2	2/5	4	1/8
48	CG 487	1/4	1	1/3	2/3	3	3	3	1	2	2	1	1/2	1	2/5	3	3/8
49	UFPE 479	2/4	1	3	3	3	3	3	1	2	2	2	2	2	2/5	3	8
50	CG 307	1/4	1	1/3	2/3	3	3	3	1	2	2	1	2	1	2/5	3	3/8
51	CG 309	1/4	1	3	3	3	3	3	1	0	2	2	2	1	2/5	3	8
52	CG 310	1/3/4	1	1/3	3	3	3	3	1	2	2	2	2	1	2/5	3	2/8
53	CCT 3161	1/4	1	3	4	2	3	3	1	2	4	2	2	2	2/5	4	2/8/9
<b>OUTGROUP</b>																	
54	ARSEF 656	0	1	3	3	0	3	3	1	0	0	0	0	3	2/5	0	0
55	ARSEF 1682	1/4	1	3	3	1	1	1	1	4	4	1	2	3	2/5	3	2/5
56	ARSEF 4755	1/4	1	4	4	3	2	3	1	2	3	1	0	4	1/6	3	3/6
57	ATCC 58798	1/4	1	3	3	2	1/3	3	1/2	2	2/5	1	2	2	2/5	1/3	2/8
58	ARSEF 2998	0	0	0	1	0	0	0	0	0	6	0	0	5	0	4	0
59	ARSEF 2922	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
60	UFPE 3138	1/4	1	0	4	3	0	0	3	1	6	4	0	0	4	3	7/9

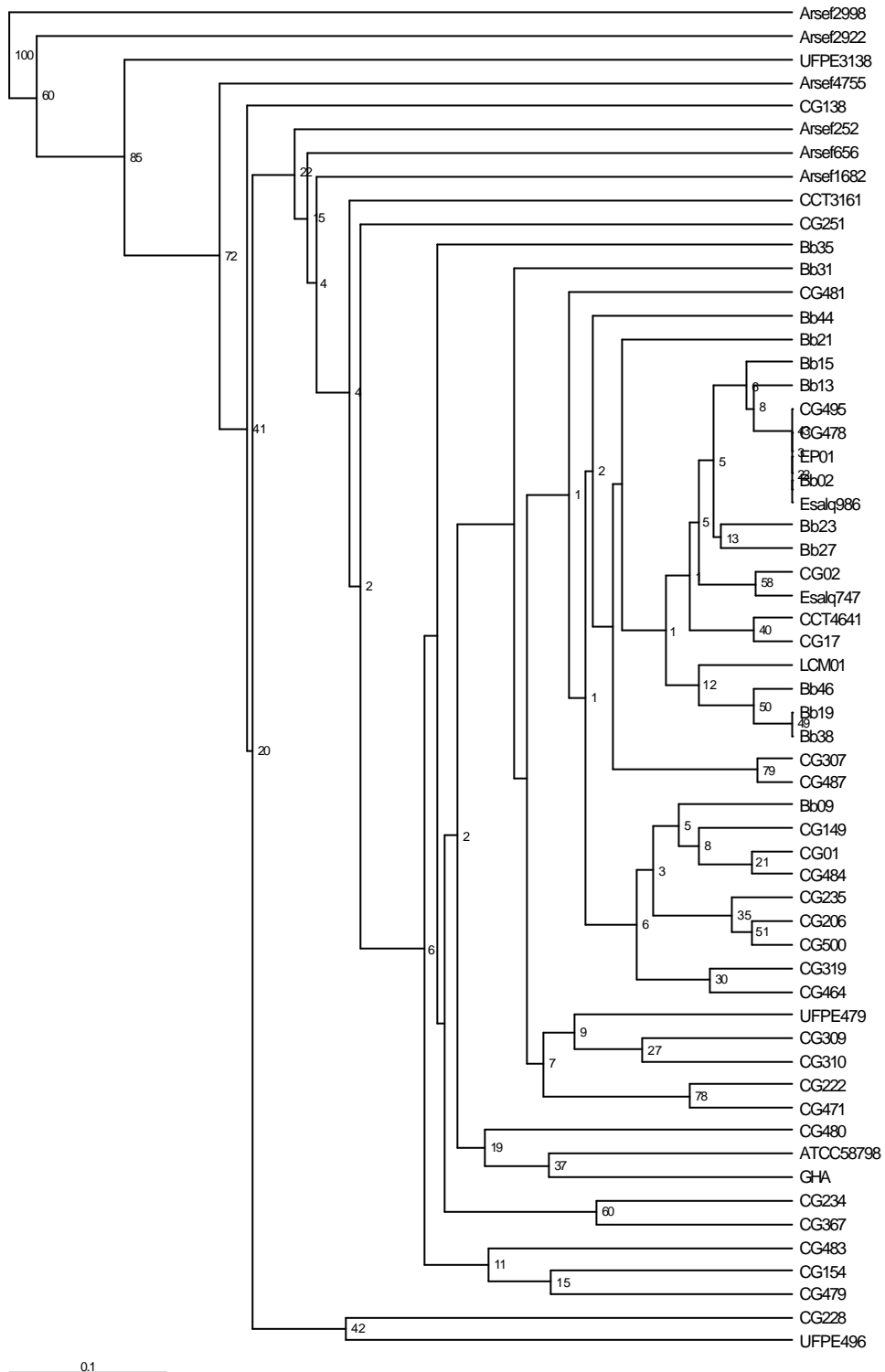
\* Isolados de 01 a 53: *Beauveria bassiana*; Isolados de 54 a 56: *Beauveria amorpha*; Isolado 57: *Beauveria brongniartii*; Isolado 58: *Beauveria velata*; Isolado 59: *Beauveria vermiconia*; Isolado 60: *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*).

★ Os isolados Bb 02, ESALQ 986, CG 495, CG 478 e EP 01 apresentam o mesmo eletromorfo.

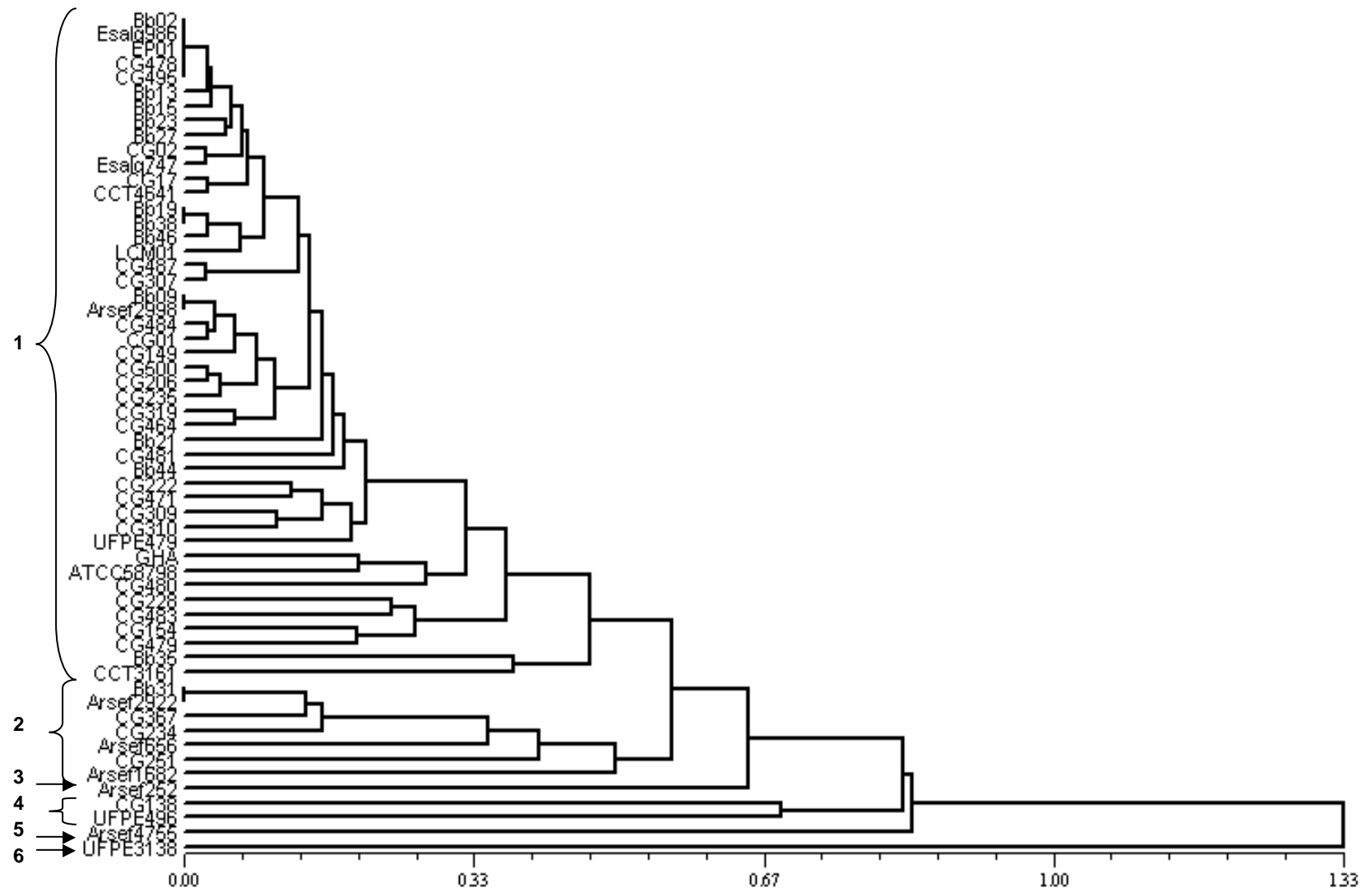
☆ Os isolados Bb 19 e Bb 38 apresentam o mesmo eletromorfo.



**Figura 1.** Dendrograma baseado nos perfis isoenzimáticos dos isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* utilizando-se o Coeficiente de Concordância Simples (Simple Match Coefficient) e algoritmo de agrupamento UPGMA.



**Figura 2.** Dendrograma gerado pela análise de “Bootstrap” com 1000 repetições e baseado nos perfis isoenzimáticos dos 60 isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus*.



**Figura 3.** Dendrograma baseado na Distância Genética de Nei entre os isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus*.

juntamente com os isolados de *B. bassiana* no primeiro grupo, e no segundo grupo agruparam-se os isolados de *B. amorpha*, *B. bassiana* e *B. vermiconia*. Entre os isolados de *B. amorpha*, ARSEF 4755 foi o que apresentou maior distância em relação aos demais isolados desta espécie, em torno de 0,86. O isolado UFPE 3138 de *E. albus* foi o mais divergente com 1,33 de distância em relação aos isolados das diferentes espécies de *Beauveria*.

Através da análise pelo método não ponderado de agrupamento com visão espacial foi possível observar a posição dos isolados analisados e comprovar que os isolados brasileiros de *B. bassiana* formaram um grande grupo. Em uma posição periférica ou afastada deste grupo estão os isolados norte americanos e os isolados das demais espécies de *Beauveria* e *Engyodontium*. Nesta visão espacial, o isolado CG 138 originário do nordeste brasileiro foi o único que se apresentou destacado dos demais isolados brasileiros de *B. bassiana* (Figura 4).

### 3.2 Análise de AFLP.

Foram encontradas 82 bandas polimórficas reveladas pelos três pares de iniciadores utilizados. Um dendrograma combinando os perfis amplificados e baseado no Coeficiente de Concordância Simples revelou que existe considerável variabilidade genética entre os isolados brasileiros de *Beauveria bassiana* (Figura 5).

Neste dendrograma observa-se um grupo de 15 isolados brasileiros de *B. bassiana* exibindo coeficiente de similaridade 1,0. Dentre esses isolados, 13 são originários do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) coletados nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Esse grupo ainda se relaciona com outros três isolados originados também de *B. microplus* coletados no Estado do Rio de Janeiro exibindo mais de 98% de caracteres em comum.

Três isolados obtidos nos Estados Unidos e um isolado do nordeste brasileiro foram agrupados apresentando baixa similaridade comparada aos demais isolados. Um isolado também originário dos Estados Unidos (ARSEF 252) que tem sido usado como isolado padrão da espécie *B. bassiana* em diversos estudos não se agrupou a nenhum outro isolado e apresentou similaridade em torno dos 70% com os isolados brasileiros.

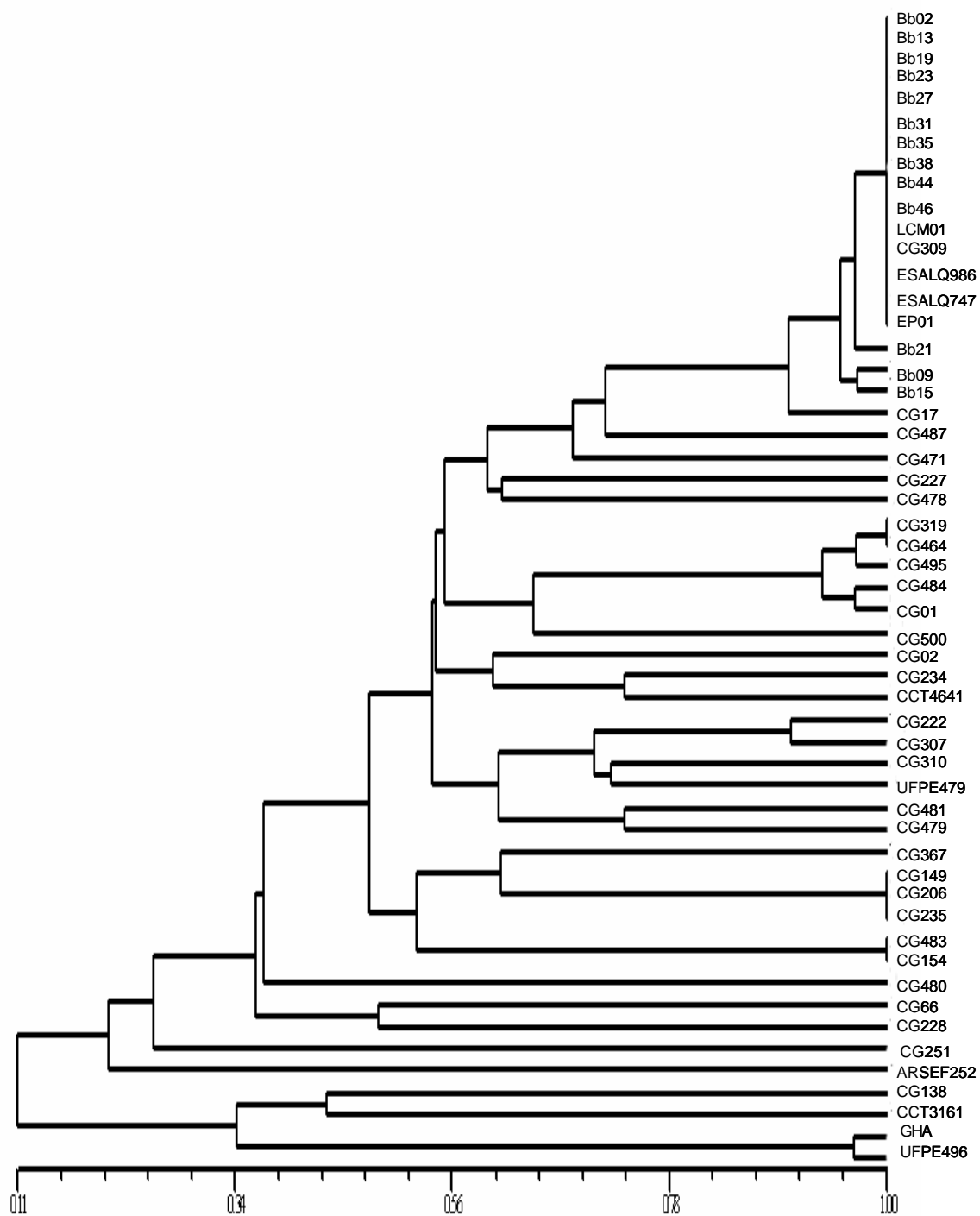
O teste de Mantel baseado nos dados da análise de AFLP revelou uma associação das distâncias genéticas dos isolados brasileiros de *B. bassiana* com as distâncias geográficas dos locais de origem desses isolados. Neste sentido, observou-se que quanto maior a distância geográfica entre os locais de origem dos isolados brasileiros, maior também era a distância genética entre os isolados (Figura 6).

Comparando as populações de *B. bassiana* das diferentes regiões brasileiras em separado foi revelado que a população da região Sul difere das populações do Sudeste, Norte e Nordeste. A população presente na região Sudeste difere das populações das demais regiões do país, possivelmente devido a grande homogeneidade genética observada nas amostras provenientes desta região. No entanto, observou-se que a população da região Sul não demonstrou diferença genética em relação à população do Centro-Oeste, da mesma forma que as populações das regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste não manifestaram diferenças genéticas significativas entre si. As populações de todas as regiões brasileiras mostraram diferenças em relação à população norte americana.

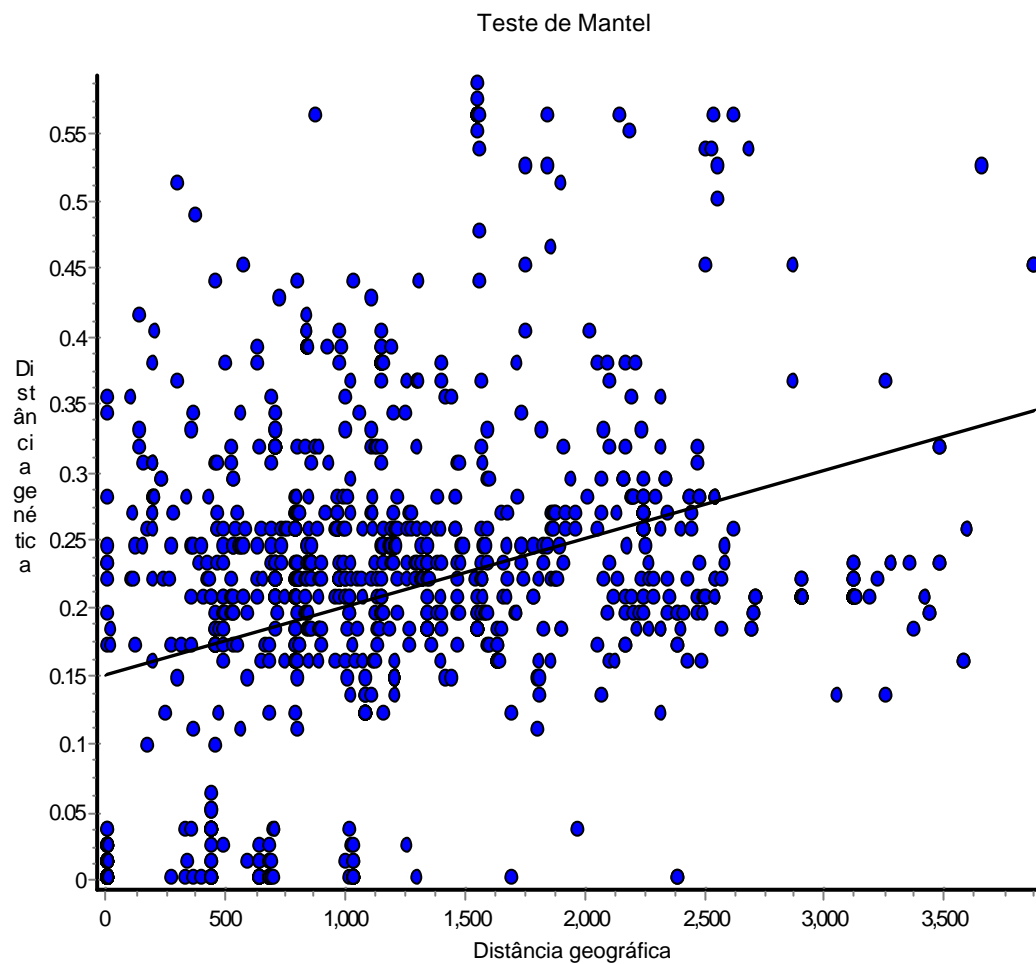
Os perfis amplificados pela análise de AFLP dos isolados das diferentes espécies de *Beauveria* e *Engyodontium* combinados também permitiram gerar um dendrograma que é exibido na Figura 7. É possível observar que o isolado padrão de *B. bassiana* se agrupou com o isolado de ARSEF 656 de *B. amorpha* apresentando coeficiente de similaridade de 0,35. O isolado de *E. albus* apresentou apenas 10% de caracteres em comum com as demais espécies de *Beauveria*, exceto *B. velata*. Esta última espécie foi a mais divergente apresentando coeficiente de similaridade de 0,07 em relação aos demais isolados.



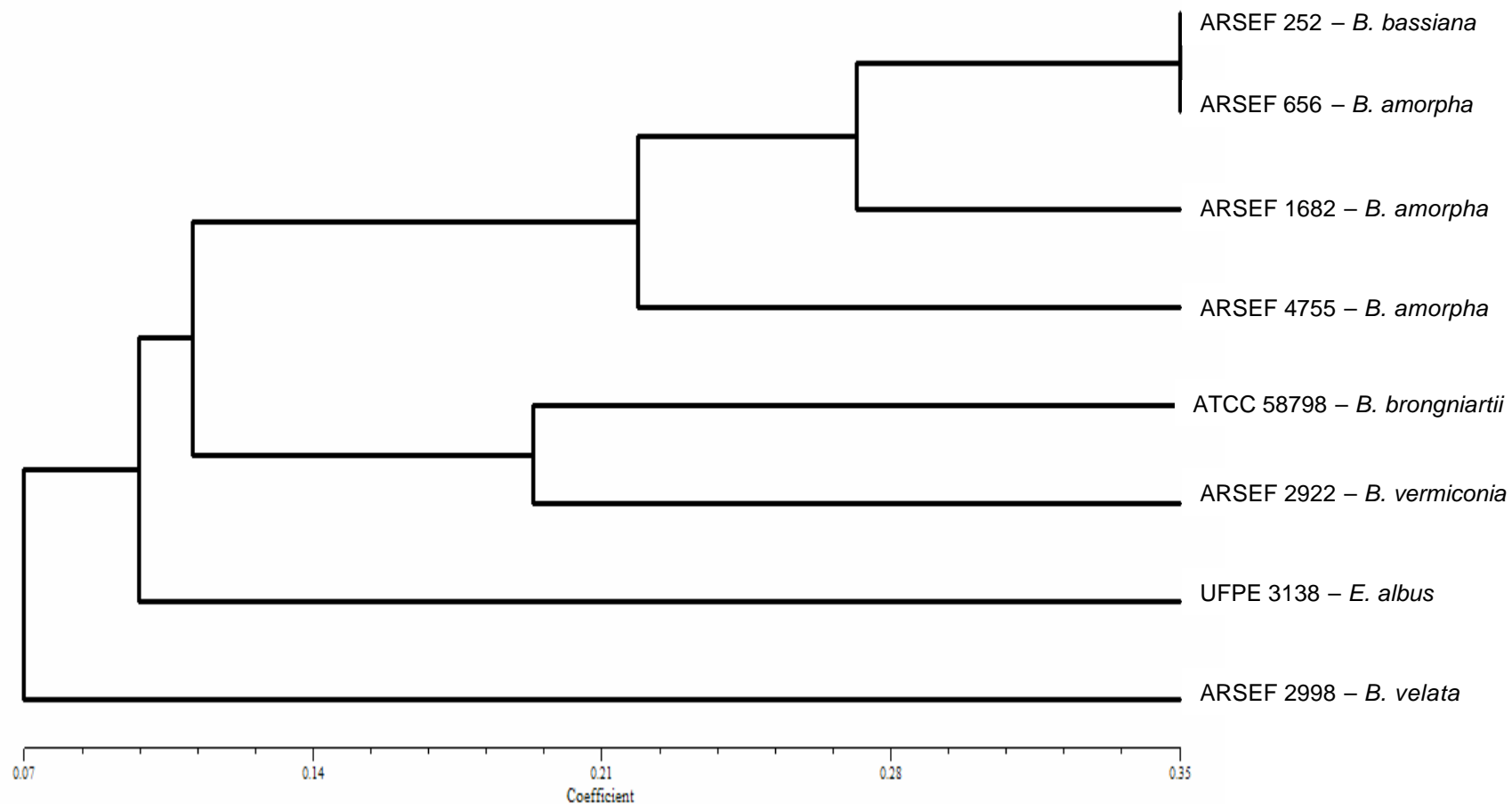




**Figura 5.** Dendrograma baseado nos perfis de amplificação dos 53 isolados de *Beauveria bassiana* por análise de AFLP utilizando-se o Coeficiente de Concordância Simples e algoritmo de agrupamento UPGMA.



**Figura 6.** Estrutura populacional dos isolados brasileiros de *Beauveria bassiana* revelado pelo teste de Mantel.



**Figura 7.** Dendrograma baseado nos perfis de amplificação dos sete isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) pertencentes ao “outgroup” e mais o isolado ARSEF 252 de *Beauveria bassiana* por análise de AFLP utilizando-se o Coeficiente de Jaccard e algoritmo de agrupamento UPGMA.

### 3.3 Seqüenciamento de rDNA.

O tamanho dos fragmentos de rDNA amplificados foi bastante uniforme, variando em torno dos 580 pb. O seqüenciamento desses fragmentos permitiu uma análise comparativa entre os isolados de *B. bassiana*. O dendrograma gerado mostrou resultados similares ao obtido através da análise de AFLP. Os três isolados originados dos Estados Unidos e o isolado CG 138 do nordeste do Brasil permaneceram agrupados juntos, e da mesma forma o isolado ARSEF 252 originado também dos Estados Unidos permaneceu não agrupado a nenhum outro isolado. Os demais isolados de *B. bassiana* originários de diferentes hospedeiros e regiões geográficas brasileiras agruparam-se exibindo elevado percentual de caracteres em comum. O isolado de *B. brongniartii* não se agrupou a nenhum outro isolado e mostrou seqüenciamento consideravelmente divergente (Figura 8).

## 4 DISCUSSÃO

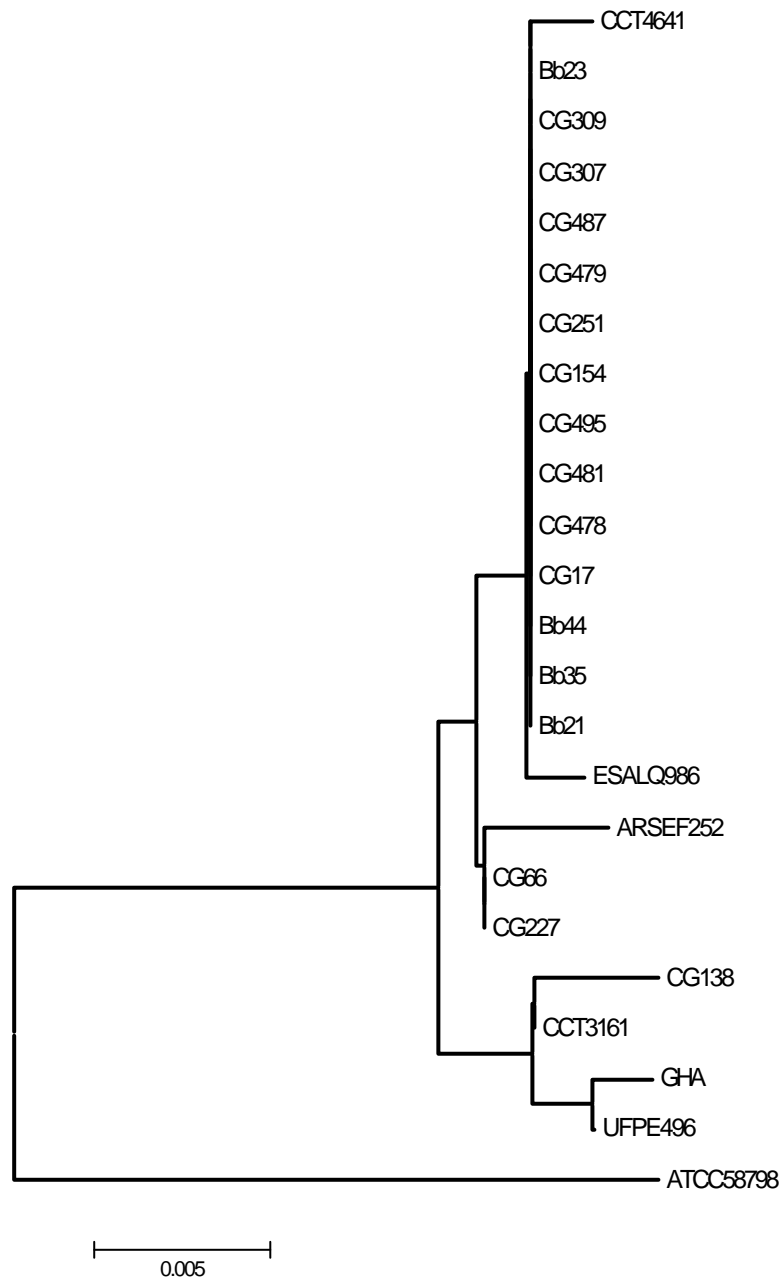
A relação entre as diferentes espécies de *Beauveria* e *Engyodontium*, foi detectada pela análise de eletroforese de isoenzimas e permitiu revelar que o isolado de *E. albus* difere geneticamente de *B. bassiana*. No entanto, isolados de *B. amorpha*, *B. brongniartii*, *B. velata* e *B. vermiconia* não apresentaram nítida heterogeneidade genética em relação aos isolados de *B. bassiana*, demonstrando que essas espécies são altamente relacionadas entre si. Esses resultados concordam em geral com os estudos de St Leger *et al.* (1992a). Além disso, outros autores também não conseguiram diferenciar isolados de *B. bassiana* e *B. brongniartii*, mesmo utilizando técnicas moleculares mais modernas como RAPD e ITS-RFLP (GLARE; INWOOD, 1998; DE MURO *et al.*, 2005). Em contrapartida, a análise de AFLP e o seqüenciamento de ITS de rDNA demonstraram notável variação genética entre os isolados de *B. bassiana* e os demais isolados das diferentes espécies de *Beauveria*. Previamente, a distinção entre isolados de *B. bassiana* e *B. brongniartii* também foi demonstrada através da análise de regiões ITS de rDNA por Neuvéglise *et al.* (1994), Gaitan *et al.* (2002) e De Muro *et al.* (2003).

A eletroforese de isoenzimas é conhecida como uma técnica eficaz na identificação de diversas espécies de fungos. Neste sentido, Riba *et al.* (1986b) confirmaram diferenças consideráveis entre as duas espécies *Tolypocladium cylindrosporum* e *T. extinguens*, cujas diferenças morfológicas são muito superficiais. St Leger *et al.* (1992b) também verificaram clara distinção de *M. anisopliae* entre as demais espécies de *Metarhizium* analisadas e Tigano-Milani *et al.* (1995c) diferenciaram isolados de *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) e *Paecilomyces lilacinus*.

Tanto a análise de eletroforese de isoenzimas quanto a análise de AFLP revelaram que os isolados brasileiros de *B. bassiana* apresentam considerável variação genética, no entanto uma variação em maior escala foi observada quando isolados brasileiros foram comparados aos isolados norte americanos. Neste sentido, foi demonstrado que a distância genética entre os isolados de *B. bassiana* está fortemente relacionada à distância geográfica.

Os isolados de *B. bassiana* que se apresentaram mais polimórficos nas análises de Isoenzimas e AFLP foram também agrupados separadamente pela análise de regiões mais conservadas do DNA, as regiões do rDNA. Dessa forma, o nível de variação genética obtido entre os isolados reforça os resultados obtidos por St Leger *et al.* (1992a) e indicam que *B. bassiana* representa um agregado de espécies.

Grande variação genética entre isolados de *B. bassiana* foi detectada também através de RFLP e RAPD por Mauer *et al.* (1997), e através de RAPD por Berreta *et al.* (1998) e Castrillo e Brooks (1998). Considerável variabilidade intra-específica também já foi relatada



**Figura 8.** Dendrograma de “Neighbour-joining” gerado através dos dados do seqüenciamento de DNA dos 23 isolados de *Beauveria bassiana* e um isolado de *Beauveria brongniartii* (ATCC 58798).

em outras espécies de fungo como *Basidiobolus* spp. (COCHRANE *et al.*, 1989) e *Hirsutella thompsonii* (BOUCIAS *et al.*, 1982).

A diversidade genética em fungos é afetada pela presença ou ausência de recombinação (ST LEGER *et al.*, 1992b), embora a migração de isolados seja também um forte fator que interfere na manutenção da homogeneidade genética entre as populações (LEWONTIN, 1974).

Um mecanismo de recombinação mitótica, o ciclo parassexual (PONTECORVO *et al.*, 1953; PONTECORVO, 1956), foi demonstrado em *B. bassiana* apenas em condições laboratoriais (PACCOLA-MEIRELLES; AZEVEDO, 1991). A atividade parassexual pode ser uma fonte de variação de cariótipo através da transferência de novas informações genéticas entre alguns isolados para criar novos cariótipos (VIAUD *et al.*, 1996). Segundo Couteaudier *et al.* (1996) a parassexualidade em *Beauveria* pode gerar inclusive híbridos aneuplóides. Contudo, a parassexualidade não foi ainda demonstrada em condições naturais nos fungos entomopatogênicos (MUGNAI *et al.*, 1989), embora existam evidências em *I. fumosorosea* de que o ciclo parassexual ocorra no inseto hospedeiro (RIBA; RAVELOJOANA, 1984). Mais recentemente, foi demonstrada uma estreita relação entre *Beauveria* e o gênero sexuado *Cordyceps*, revelando resultados consistentes de que pelo menos uma linhagem de *Beauveria* se mantém sexuada.

Em uma análise filogenética de *Beauveria* através de análise das seqüências EF1- $\alpha$  (Elongation Factor 1-alfa) e das regiões ITS1-5.8S-ITS2, árvores filogenéticas foram construídas e *Beauveria* foi dividida em seis clades (A-F). *Beauveria bassiana* foi definida como polifilética, constituída por duas linhagens A e C filogeneticamente distintas e morfologicamente indistinguíveis. A clade A foi formada por isolados mundialmente distribuídos incluindo o teleomorfo asiático *Cordyceps staphylinidaecola* e sua provável sinonímia *C. bassiana*. Todos os isolados presentes ao clade C são anamórficos e originados da Europa e América do Norte, embora o isolado norte americano GHA, também estudado no presente estudo, tenha sido agrupado na clade A (REHNER; BUCKLEY, 2005). É importante a observação de que neste mesmo clade A estavam relacionados todos os isolados brasileiros de *B. bassiana* estudados por Rehner e Buckley (2005).

Rehner *et al.* (2006) estudaram a origem filogenética de isolados africanos e neotropicais de *B. bassiana*, identificados pelos autores como *B. bassiana s.l.*, referindo-se aos isolados pertencentes às clades A e C descrito anteriormente por Rehner e Buckler (2005). Neste estudo, os resultados complementaram as evidências de Rehner *et al.* (2005) de que *B. bassiana s.l.* é um complexo de linhagens crípticas. Além disso, esses autores sugerem que a diversidade genética detectada nos países neotropicais é endêmica e bem estabelecida.

Em contrapartida a diversidade genética observada entre os isolados brasileiros de *B. bassiana*, um fenômeno diferente foi observado em *M. anisopliae*. Isolados obtidos de diversas localidades do Brasil e da Colômbia exibiram determinadas classes genotípicas em comum, e mantiveram uma uniformidade genética em uma extensa área geográfica, no entanto, não demonstraram distribuição intercontinental (ST LEGER *et al.*, 1992b). Riba *et al.* (1986a) também observaram uniformidade genética entre os isolados brasileiros de *M. anisopliae*. No entanto, em *Metarhizium* spp. nenhum estágio sexuado foi ainda revelado, indicando que a propagação desta espécie acontece assexuadamente através de conídios uninucleados. A variabilidade intra-específica detectada nesta espécie provavelmente é resultante de recombinação mitótica, o ciclo parassexual, mutação ou elementos extranucleares, enquanto isso, outras linhagens permanecem inalteradas (ST LEGER *et al.*, 1992b).

Em alguns casos foram observados determinados isolados brasileiros de *B. bassiana* apresentando elevado coeficiente de similaridade e até mesmo total similaridade entre si evidenciando uma estrutura clonal. Evidências dessa estrutura em populações de *B. bassiana*

foram verificadas previamente por St Leger *et al.* (1992a) e Bidochka *et al.* (2002) através de eletroforese de isoenzimas em estudo envolvendo uma grande diversidade de isolados. St Leger *et al.* (1992a) observaram inclusive isolados de mesmo perfil eletroforético distribuídos em espaço intercontinental.

Nos estudos realizados por St Leger *et al.* (1992a) e Bidochka *et al.* (2002) foram exibidos diversos isolados apresentando 100% de caracteres em comum. No presente estudo, entretanto, a análise de eletroforese de isoenzimas promoveu a subdivisão de grupos clonais em grupos de classes genotípicas semelhantes com elevado coeficiente de similaridade, provavelmente devido ao número de “loci” gênicos analisados ter sido quatro vezes maior do que nos estudos anteriores.

Bridge *et al.* (1990) detectaram uniformidade entre isolados de *B. bassiana* originados de uma única espécie de Coleoptera provenientes de diversos países. Outros estudos também têm demonstrado variação genética em *B. bassiana* relacionada com o inseto hospedeiro, permitindo a interpretação de que o hospedeiro parece ser fator predominante na estruturação de algumas populações de *B. bassiana* (MAUER *et al.*, 1997; NEUVÉGLISE *et al.*, 1997). Em contrapartida, o presente estudo não detectou características genéticas afins entre isolados originados de hospedeiros pertencentes a uma mesma Ordem, embora tenha sido observado que diversos isolados oriundos de Acari se agruparam pela análise de AFLP compartilhando 100% de caracteres em comum. Acredita-se que essa semelhança de caracteres esteja relacionada ao local de origem dos isolados, uma vez que a maioria dos isolados foram obtidos de uma mesma localidade e todos obtidos da região Sudeste do Brasil. Neste sentido, estudos anteriores também têm indicado certa homogeneidade entre isolados de *B. bassiana* originados de mesma área geográfica (POPRAWSKI *et al.*, 1988; SOSA-GÓMEZ *et al.*, 1994; GLARE; INWOOD, 1998; DE MURO *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2006; DE MURO *et al.*, 2005).

Bidochka *et al.* (2002) também não observaram clara associação entre grupos de isolados com semelhança genética e aptidão para infectar larvas de insetos coleópteros e lepidópteros. Porém, observaram que os grupos de isolados com semelhança genética foram fortemente associados com preferências por habitat. Um primeiro grupo foi associado com habitat de agricultura, dois grupos foram associados com habitat de floresta, e um terceiro grupo foi associado com isolados oriundos de região ártica. Dessa forma, seus estudos revelaram que existem grandes evidências para acreditar que a seleção por habitat e não a seleção por hospedeiros é quem direciona a estrutura da população dos fungos entomopatogênicos. Neste sentido, a população de *B. bassiana* relacionada ao inseto hospedeiro deveria ser encarada como ocorrência coincidente do patógeno com a espécie de inseto suscetível em um determinado habitat.

No entanto, além das variações relacionadas ao habitat demonstradas por Bidochka *et al.* (2002), o presente estudo demonstrou que a variação genética entre os isolados de *B. bassiana* está fortemente relacionada à distância geográfica. Essa relação entre distância genética e distância geográfica foi verificada previamente nos estudos de Wang *et al.* (2003). Posteriormente, também Rehner *et al.* (2006) relatam que as linhagens de *B. bassiana* são endêmicas em cada continente e que a estrutura das linhagens de *B. bassiana* sugere que o isolamento através da distância, alopatria, tem desempenhado importante papel na diversificação filogenética de *B. bassiana*.

Em território brasileiro, as populações de *B. bassiana* originárias das regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste não manifestaram variação genética significativa entre si. Porém, as populações originárias da região Sul demonstraram variação genética significativamente diferente em relação às das regiões Norte e Nordeste. Esses resultados confirmam um achado de De Muro *et al.* (2003) quando observaram dois isolados originários de Mato Grosso e Amazonas exibindo 82% de similaridade. Esses dados revelam uma idéia da distância



geográfica necessária para permitir a detecção de variação genética significativa entre os isolados de *B. bassiana* no Brasil.

Além disso, De Muro *et al.* (2003) estudaram diversos isolados de *B. bassiana* originários do Quênia, na África, e revelaram elevada similaridade entre eles, indicando inclusive, que a população presente neste país apresenta estrutura clonal. Neste sentido, considerando que o território do Quênia apresenta extensão territorial equivalente ao Estado da Bahia, os resultados obtidos no presente estudo indicam que os isolados quenianos de *B. bassiana* estudados por De Muro *et al.* (2003) não apresentavam distância geográfica suficiente entre eles para que fosse detectada variação genética significativa. De Muro *et al.* (2005), entretanto, analisaram isolados de *B. bassiana* originários de diferentes países e detectaram variação intra-específica entre os isolados fortemente associada à região geográfica de origem.

Esses dados concordam com os dados demonstrados no presente estudo e revelam que a distância geográfica é fator importante para detecção de variação genética entre isolados de *B. bassiana*, sendo portanto, fator relevante de influência na estrutura populacional em *B. bassiana*.

## **CAPÍTULO III**

### **SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Beauveria* spp. TERMOTOLERANTES E COM ATIVIDADE AO FRIO**

## RESUMO

Calor e frio são dois fatores abióticos ambientais que restringem o uso de fungos entomopatogênicos como agentes de controle biológico de insetos. Para auxiliar a seleção de isolados de *Beauveria* spp. com maior potencial para o controle de artrópodes em condições de campo, o presente estudo avaliou a termotolerância e a atividade ao frio de 60 isolados, incluindo cinco espécies de *Beauveria* e uma espécie de *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*), de várias regiões geográficas, artrópodes hospedeiros ou substratos de origem. Grande variabilidade em termotolerância foi observada entre os isolados após duas horas de exposição a 45 °C, variando entre baixa (0 - 20%), média (20 - 60%), e alta viabilidade (60 - 80%). Menos de 40% dos conídios termotolerantes de *B. bassiana* (CG 138, GHA e ARSEF 252) permaneceram viáveis após exposição a 47 °C por 2 horas. O limite de tolerância dos conídios desses isolados variou entre 44 °C e 45 °C por 6 horas de exposição. Em contrapartida, a maioria dos conídios germinou quando mantidos a 5 °C, porém os isolados UFPE 3138 e CG 66 foram algumas exceções. Um teste comparativo revelou que isolados de *Metarhizium anisopliae* não germinaram no frio, com exceção do isolado ARSEF 4343 que é originário da Austrália, próximo ao Círculo Polar Antártico. Portanto, os isolados de *B. bassiana* foram mais psicrófilos do que os de *M. anisopliae*. Interessante que o isolado de *E. albus* (UFPE 3138) foi o mais sensível a ambos os estresses avaliados. Os isolados ARSEF 252 e GHA, por outro lado, foram os mais termotolerantes e também os que apresentaram maior atividade ao frio. Alguns isolados com alta atividade ao frio, no entanto, foram termosensíveis (ex. ARSEF 1682). Uma tentativa de correlacionar a latitude de origem dos isolados com termotolerância ou atividade ao frio, indicou que os isolados originários de latitudes mais elevadas foram mais ativos ao frio do que os isolados originários próximos ao equador. Não existiu correlação similar, entretanto, para o calor.

**Palavras-chave:** *Beauveria bassiana*; *Beauveria* spp.; *Engyodontium albus*; *Metarhizium anisopliae*; termotolerância; atividade ao frio; germinação atrasada.

## ABSTRACT

Heat and cold are two abiotic factors of the environment that restrict the use of entomopathogenic fungi as agents for biological control of insects. To aid in selecting isolates of *Beauveria* spp. with promise for field use, we studied the thermotolerance and cold activity of 60 isolates, including five species of *Beauveria* and one species of *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*), from various geographic regions, arthropods hosts or substrates. High variability in conidial thermotolerance was observed among the isolates after 2 h heat exposure at 45 °C, ranging from low (0 - 20%), to medium (20 - 60%), to high germination (60 - 80%). Less than 40% of conidia from the three most thermotolerant isolates of *B. bassiana* (CG 138, GHA and ARSEF 252) remained viable after exposure to 47 °C for 2 hours. The thermal death point of conidia of these isolates was between 44 °C and 45 °C after 6 hours of heat exposure. At cold temperatures, with few exceptions (viz. UFPE3138 and CG 66) most of the isolates grew at 5 °C. A comparative test reveal that *Metarhizium anisopliae* isolates were not cold active, with exception of ARSEF 4343 originated from Australia, close to the Antarctic Circle. Therefore, *B. bassiana* was more psychrophilic than *M. anisopliae* isolates. Interestingly, the one isolate of *E. albus* (UFPE3138) was the most susceptible isolate to both heat and cold stress. Isolates ARSEF 252 and GHA, on the other hand, were the most thermotolerant and had the highest cold activity. Some isolates with high cold activity, however, were thermosensitive (e.g. ARSEF 1682). An attempt to correlate the latitude of origin with thermotolerance or cold activity indicated that isolates from higher latitudes were more cold-active than isolates from nearer the equator. There was not a similar correlation, however, for heat.

**Key words:** *Beauveria bassiana*; *Beauveria* spp.; *Engyodontium albus*; *Metarhizium anisopliae*; thermotolerance; cold activity; delayed germination.

## 1 INTRODUÇÃO

Calor e frio são dois fatores abióticos ambientais que restringem o uso de fungos entomopatogênicos como agentes de controle biológico de artrópodes. A fim de avaliar a habilidade de um isolado de fungo para o controle de uma população de artrópodes, não somente a sua virulência deve ser considerada, mas também sua capacidade de adequação ao habitat do hospedeiro alvo (SMITS *et al.*, 2003).

A maioria dos fungos entomopatogênicos é considerada mesofílica por desenvolverem-se entre as temperaturas de 10 e 40 °C, e considerarem como ótima as temperaturas entre 25 e 35 °C (COONEY; EMERSON, 1964). *Beauveria bassiana* desenvolve-se em uma amplitude considerável de temperaturas que varia de 8 a 35 °C, e seu limite térmico máximo ocorre aos 37 °C (FARGUES *et al.*, 1997a). Para *Metarhizium anisopliae* a temperatura limite mais alta para crescimento micelial varia entre 37 e 40 °C (FARGUES *et al.*, 1992; FARGUES *et al.*, 1996; HALLSWORTH; MAGAN, 1999), e é de 30 °C para *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (FARGUES *et al.*, 1992). Embora essas temperaturas sejam frequentemente excedidas em habitat tropicais, a temperatura noturna normalmente aproxima-se dos 20 °C proporcionando condições apropriadas para que a infecção fúngica ocorra (ROBERTS; HAJEK, 1992). No entanto, elevadas temperaturas são prejudiciais ao desenvolvimento fúngico e podem afetar as células em diferentes aspectos. O calor e a alta umidade provocam desnaturação de proteínas (SETLOW; SETLOW, 1998) e desorganização de membrana (CRISAN, 1973). Em contrapartida, os processos celulares tornam-se significativamente menos ativos quando a temperatura é reduzida, e isso é manifestado pela interrupção do crescimento e diminuição da atividade de enzimas, e possivelmente por afetar o transporte ou a integridade da membrana celular (MAGAN, 1997).

O aumento pelo interesse da utilização de patógenos de insetos em programas de manejo de pragas necessita da seleção de patógenos tolerantes a variação de temperaturas encontrada no ecossistema envolvido. Neste sentido, isolados de fungos ativos em temperaturas abaixo de 15 °C foram selecionados para o controle de curculionídeos em países de clima temperado (DOBERSKI, 1981; SOARES *et al.*, 1983). Por outro lado, têm-se pesquisado isolados adaptados a temperaturas superiores a 25 °C para o controle de noctuídeos na região sudeste dos Estados Unidos (IGNOFFO *et al.*, 1976; MOHAMED *et al.*, 1977).

Baseado nisso, o presente estudo avaliou a termotolerância e a atividade ao frio de 60 isolados, incluindo cinco espécies de *Beauveria* e uma espécie de *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*), originários de diversas regiões geográficas, artrópodes hospedeiros ou substratos, e buscou a seleção de isolados com maior potencial para atuarem no controle biológico de artrópodes em condições a campo. Além disso, foram feitas comparações entre a latitude de origem dos isolados e a tolerância ao calor e ao frio.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local e período de execução dos experimentos.

Os experimentos de avaliação da termotolerância e da atividade ao frio dos isolados das diferentes espécies foram realizados entre os meses de agosto e outubro de 2005 no Departamento de Biologia da Universidade do Estado de Utah – USU, nos Estados Unidos.

## 2.2 Isolados estudados.

Cinquenta e três isolados de *B. bassiana*, seis de outras espécies de *Beauveria* e um isolado de *E. albus* foram estudadas. Eles foram obtidos de coleções de culturas de diferentes instituições e suas origens geográficas e hospedeiros ou substratos estão disponíveis na Tabela 1.

## 2.3 Efeito do calor sobre a germinação relativa.

Os isolados de *Beauveria* spp. e *E. albus* foram cultivados em 23 ml de meio batata dextrose ágar (Difco Laboratories, Detroit, MI) suplementados com  $1\text{g } \Gamma^{-1}$  de extrato de levedura (Technical, Difco) (PDAY) em placas de Petri ( $100 \times 15$  mm, Fisherbrand) mantidas em ausência de luz a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  por 20 dias. Os conídios foram colhidos com auxílio de uma espátula e suspensos em uma solução de Tween 80 (0,01% v/v). A suspensão preparada com aproximadamente  $10^5$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  foi vigorosamente agitada e filtrada através de uma membrana de policarbonato com poros de  $8\text{ }\mu\text{m}$  de tamanho (Nucleopore<sup>®</sup>, Acton, MA, USA). Uma alíquota de 2 ml dessa suspensão foi transferida para um tubo de ensaio (Pirex<sup>®</sup>, Corning<sup>®</sup>, NY) medindo  $16 \times 125$  mm, e imediatamente colocados em banho-maria a  $45\text{ }^\circ\text{C}$ . Após uma e duas horas de exposição ao calor, uma alíquota de  $20\text{ }\mu\text{l}$  foi inoculada em 4 ml de PDAY acrescido de 0,002% (w/v) de Benomyl com 25% de ingrediente ativo (Hi-Yield Chemical Company, Bonham, TX) (MILNER et al., 1991; BRAGA et al., 2001c) em placas de Petri ( $35 \times 10$  mm, Fisher, Pittsburgh, PA, USA). A baixa concentração de Benomyl no meio de cultura inibe o crescimento do tubo germinativo sem afetar desfavoravelmente o processo de germinação. Este procedimento permite que a germinação seja monitorada durante maior período de tempo (MILNER et al., 1991). As placas foram incubadas por 48 horas a  $25 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  em ausência total de luz, e a germinação dos conídios foi observada utilizando microscópio com magnitude de  $400\times$ . Um número mínimo de 300 conídios por placa foi avaliado e a germinação média relativa foi calculada através de comparação com a germinação dos conídios não expostos ao calor, utilizando-se a seguinte equação: Germinação Relativa (%) =  $(Wt/Wc) \times 100$ , onde *Wt* é o número de conídios em germinação em cada placa que recebeu a suspensão exposta ao calor por um período *t* de tempo, e *Wc* é o número médio de conídios germinados nas placas pertencentes ao grupo controle, conforme descrito por Braga et al. (2001c). Os experimentos foram repetidos quatro vezes em dias diferentes e com um novo lote de conídios para cada.

Um teste preliminar com quatro isolados de *B. bassiana* (Bb 19, CG 310, CG 481 e ESALQ 747) expostos a  $43$  ou  $45\text{ }^\circ\text{C}$  por uma, duas, três e quatro horas sugeriu que o período de uma e duas horas a  $45\text{ }^\circ\text{C}$  seria um tratamento apropriado. Sendo assim, todos os 60 isolados foram expostos a  $45\text{ }^\circ\text{C}$  por uma e duas horas. Além disso, os três isolados de *B. bassiana* mais tolerantes a  $45\text{ }^\circ\text{C}$  por duas horas foram também expostos a  $43, 44, 45, 46$  e  $47\text{ }^\circ\text{C}$  por uma, duas, quatro e seis horas utilizando a mesma metodologia descrita acima.

## 2.4 Efeito da baixa temperatura sobre a germinação.

Todos os isolados de *Beauveria* spp. e *E. albus* foram estudados. Isolados de *Metarhizium anisopliae* (Tabela 2) foram também investigados para uma análise comparativa com os isolados de *Beauveria*. Uma alíquota de  $20\text{ }\mu\text{l}$  de suspensão conidial de cada isolado foi inoculado em meio PDAY acrescido de 0,002% de Benomyl. Após inoculação, as placas foram imediatamente colocadas em caixas de metal cobertas com papel alumínio e mantidas a

**Tabela 1.** Isolados de *Beauveria bassiana* e “outgroup” com isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium album* (= *Beauveria alba*), seus hospedeiros ou substratos, regiões geográficas e latitudes de origem, ano de isolamento e coleção de cultura procedente (continua).

<b>Isolados de <i>Beauveria</i> agrupados de acordo com hospedeiro / substrato de origem</b>					
<b>#</b>	<b>Isolado*</b>	<b>Hospedeiro, Substrato</b>	<b>Origem</b>	<b>Latitude</b>	<b>Ano</b>
<i>Beauveria bassiana</i>					
01	Bb 02	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
02	Bb 09	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
03	Bb 13	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
04	Bb 15	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
05	Bb 19	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
06	Bb 21	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
07	Bb 23	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
08	Bb 27	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
09	Bb 31	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
10	Bb 35	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
11	Bb 38	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
12	Bb 44	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
13	Bb 46	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
14	LCM 01	(Acari: Ixodidae)	Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil	22°45' S	2002
15	ESALQ 986	(Acari: Ixodidae)	Piracicaba, São Paulo, Brasil	22°43' S	1990
16	CG 66	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Brasília, Distrito Federal, Brasil	15°47' S	1988
17	CG 222	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Costa do Surubim, Amazonas, Brasil	2°33' S	1981
18	CG 227	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Pacajus, Ceará, Brasil	4°10' S	1982
19	CG 228	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Manaus, Amazonas, Brasil	3°07' S	1991
20	CG 319	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil	31°46' S	1990
21	CG 464	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Francisco Beltrão, Paraná, Brasil	26°50' S	1984
22	CG 481	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Ribeira do Pombal, Bahia, Brasil	10°50' S	1985
23	CG 484	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Ponta Porã, MS, Brasil	22°32' S	1983
24	CG 495	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Londrina, Paraná, Brasil	23°18' S	1987
25	CG 500	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Goiânia, Goiás, Brasil	16°44' S	1985
26	ARSEF 252	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Orono, Maine, Estados Unidos	44°53' N	1978
27	GHA	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Montana, Estados Unidos	44°53' N	1980
28	CG 02	(Coleoptera: Curculionidae)	Manaus, Amazonas, Brasil	3°07' S	1988
29	CG 138	(Coleoptera: Curculionidae)	Recife, Pernambuco, Brasil	8°05' S	1989
30	CG 367	(Coleoptera: Curculionidae)	Aracaju, Sergipe, Brasil	1°054' S	1991
31	CG 471	(Coleoptera: Curculionidae)	Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil	28°23' S	1984
32	CG 478	(Coleoptera: Curculionidae)	Campinas, São Paulo, Brasil	22°55' S	1983
33	CG 483	(Coleoptera: Curculionidae)	Goiânia, Goiás, Brasil	16°44' S	1982
34	EP 01	(Coleoptera: Curculionidae)	Itajaí, Santa Catarina, Brasil	26°54' S	1989
35	CG 17	(Coleoptera: Scolytidae)	Piracicaba, São Paulo, Brasil	22°43' S	1988
36	UFPE 496	(Coleoptera: Scolytidae)	Estados Unidos	38°54' N	1955
37	CG 01	(Homoptera: Cercopidae)	Brasília, Distrito Federal, Brasil	15°47' S	1984
38	CG 149	(Homoptera: Cercopidae)	Goiânia, Goiás, Brasil	16°44' S	1982
39	CG 154	(Homoptera: Cercopidae)	Jataí, Goiás, Brasil	17°53' S	1983
40	CG 234	(Homoptera: Cicadellidae)	Ponta Porã, MS, Brasil	22°32' S	1983
41	CG 206	(Hymenoptera: Vespidae)	Costa do Arapapa, Amazonas, Brasil	0°33' S	1981
42	CG 235	(Hymenoptera: Vespidae)	Costa do Arapapa, Amazonas, Brasil	0°33' S	1981
43	CG 479	(Hymenoptera: Vespidae)	Santana do Ipanema, Alagoas, Brasil	9°22' S	1985
44	ESALQ 747	(Hymenoptera: Formicidae)	Belém Novo, RS, Brasil	30°13' S	1988
45	CCT 4641	(Hymenoptera: Formicidae)	Cuiabá, Mato Grosso, Brasil	15°37' S	1988
46	CG 251	(Hymenoptera: Formicidae)	Colinas do Sul, Goiás, Brasil	14°12' S	1991
47	CG 480	(Hymenoptera: Formicidae)	Ribeira do Pombal, Bahia, Brasil	10°50' S	1985

**Tabela 1.** Continuação.

#	Isolado*	Hospedeiro, Substrato	Origem	Latitude	Ano
48	CG 487	(Hymenoptera: Apoidae)	São Carlos, Santa Catarina, Brasil	27°04' S	1984
49	UFPE 479	(Lepidoptera: Bombycidae)	Brasil	15°47' S	1955
50	CG 307	Solo	Goiás, Brasil	15°56' S	1990
51	CG 309	Solo	Salto da Divisa, Minas Gerais, Brasil	16°00' S	1990
52	CG 310	Solo	Jequié, Bahia, Brasil	13°52' S	1990
53	CCT 3161	Contaminante de Laboratório	Estados Unidos	38°54' N	1970
OUT GROUP					
#	Isolado*	Hospedeiro, Substrato	Origem	Latitude	Ano
<i>Beauveria amorpha</i>					
54	ARSEF 656	(Homoptera: Cicadellidae)	Hunan, China	28°43' N	1981
55	ARSEF 1682	(Coleoptera: Scarabaeidae)	Nagano Prefecture, Japão	36°39' N	1980
56	ARSEF 4755	Solo	Bruny Island, Tasmânia, Austrália	43°25' S	1988
<i>Beauveria brongiartii</i>					
57	ATCC 58798	(Diptera: Tipulidae)	Czechoslovakia	50°50' N	?
<i>Beauveria velata</i>					
58	ARSEF 2998	(Lepidoptera)	Equador	0°11' S	1990
<i>Beauveria vermiconia</i>					
59	ARSEF 2922	Cinza vulânica	Valdivia, Los Lagos, Chile	39°49' S	1974
<i>Engyodontium albus</i> (= <i>Beauveria alba</i> )					
60	UFPE 3138	Solo marinho	Pernambuco, Brasil	8°05' S	1989

\* Coleção de Culturas: **Bb** = Laboratório de Coleção de Cultura de Fungos – Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Brasil; **LCM** = Laboratório de Controle Microbiano - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Brasil; **ESALQ** = Departamento de Entomologia - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ / USP, Brasil; **CG** = Centro Nacional de Recursos Genéticos - CENARGEN / EMBRAPA, Brasil; **ARSEF** = ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures - ARSEF / USDA, Estados Unidos; **EP** = Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A. – EPAGRI, Brasil; **UFPE** = Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Brasil; **CCT** = Coleção de Culturas Tropicais André Tosello, Brasil; **GHA** = Isolado comercializado por Emerald Bioagriculture Corporation, MYCOTROL ES®, EPA 070810-00006, Estados Unidos; **ATCC** = American Type Culture Collection, Estados Unidos, USA.

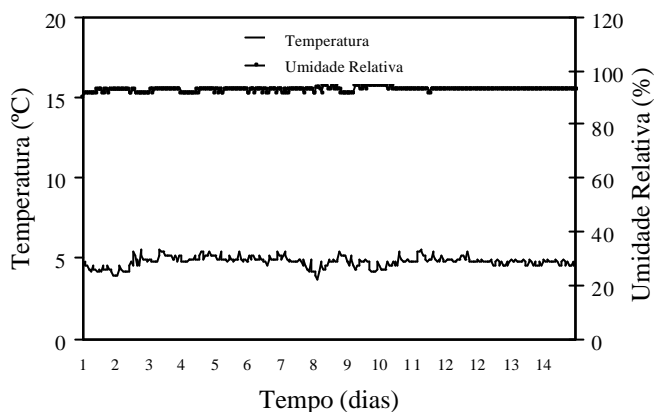
**Tabela 2.** Isolados de *Metarhizium anisopliae*, seus hospedeiros ou substratos, regiões geográficas e latitudes de origem, ano de isolamento e coleção de cultura procedente.

<b>Isolados de <i>Metarhizium</i> agrupados de acordo com hospedeiro / substrato de origem</b>					
#	Isolado*	Hospedeiro / Substrato	Origem	Latitude	Ano
01	ARSEF 23	(Coleoptera: Elateridae)	Carolina do Norte, Estados Unidos	35°47' N	1961
02	ARSEF 2575	(Coleoptera: Curculionidae)	Carolina do Sul, Estados Unidos	34°00' N	1988
03	ARSEF 5626	(Coleoptera: Tenebrionidae)	Päikäne, Finlândia	61°20' N	1986
04	ARSEF 324	(Orthoptera: Acrididae)	Queensland, Austrália	19°00' S	1979
05	ARSEF 3341	(Orthoptera: Acrididae)	Niamey, Nigéria	13°31' N	1991
06	ARSEF 3609	(Orthoptera: Acrididae)	Tailândia	15°00' N	1992
07	ARSEF 5749	(Orthoptera: Acrididae)	Cerro de Ortega, México	18°45' N	1992
08	ARSEF 4343	Solo	Macquarie Island, Austrália	54°30' S	1994

\* Coleção de Culturas: **ARSEF** = ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures - ARSEF / USDA, Estados Unidos, USA.



$5 \pm 1$  °C por 15 dias, quando então foi realizada a contagem dos conídios germinados e não germinados. O controle foi estabelecido pela inoculação das suspensões conidiais em meio PDAY acrescido de Benomyl, e a germinação avaliada após 24 horas de incubação a 25 °C. A germinação relativa foi calculada aplicando-se a mesma equação utilizada nos experimentos de exposição ao calor. Os experimentos foram repetidos três vezes em dias diferentes e com novo lote de conídios para cada. A temperatura e a umidade relativa foram monitoradas por HOBO H8 logger (Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA) (Figura 1).



**Figura 1.** Temperatura e umidade relativa monitorada com HOBO H8 logger nas caixas de metal mantidas a 5 °C.

## 2.5 Análise estatística.

As diferenças entre os quatro isolados de *B. bassiana* expostos a 43 e 45 °C e os efeitos dos cinco tempos de exposição (zero, uma, duas, três e quatro horas) sobre a viabilidade dos conídios foram verificados através da análise de variância fatorial  $4 \times 5$  em um delineamento em blocos ao acaso. Os dados sofreram transformação radicial prévia para melhor conjectura da normalidade e homogeneidade da variância. Múltiplos teste *t* foram usados para comparações entre os tempos médios de exposição de cada isolado, e os valores de *P* foram relatados como sendo (1) não adaptados para experimentos assumindo erro tipo I a  $\alpha=0,05$  e (2) adaptados para experimentos assumindo erro tipo I a  $\alpha=0,10$  usando o método Tukey-Kramer.

Diferenças em viabilidade dos conídios entre os 60 isolados expostos ao calor por uma e duas horas, e a exposição a baixa temperatura foram avaliadas usando análise de variância em um delineamento em blocos ao acaso. Os dados sofreram transformação radicial prévia para melhor conjectura da normalidade e homogeneidade da variância. A transformação sozinha não estabilizou adequadamente as variâncias dos isolados, e por esse motivo os isolados foram partilhados em até três grupos baseado na viabilidade média observada. Os isolados com médias menores que 5% ou maiores que 95% compreenderam o grupo de baixa variância; isolados com médias entre 5% e 20% ou entre 80% e 95% compreenderam o grupo de variância média; e os isolados com médias entre 20% e 80% compreenderam o grupo de alta variância. O erro residual foi dividido em seções para estimar uma variância separada para cada grupo. Múltiplos teste *t* foram usados para comparações entre os tempos médios de exposição de cada isolado, e os valores de *P* foram relatados como sendo (1) não adaptados

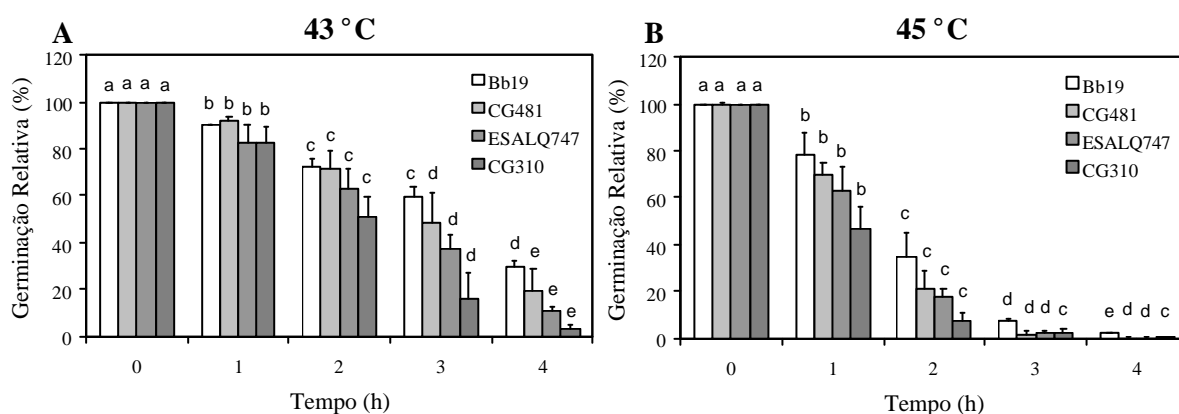
para experimentos assumindo erro tipo I a  $\alpha=0,05$ ; (2) adaptados para experimentos assumindo erro tipo I a  $\alpha=0,10$  usando o método Tukey-Kramer; e (3) adaptados para manter as relações falsas a  $\alpha=0,05$ . As diferenças em viabilidade entre os oito isolados de *M. anisopliae* e um isolado de *B. bassiana* (controle) expostos à baixa temperatura foram avaliadas usando a mesma análise. Modelos ANOVA foram adaptados usando Proc MIXED em SAS Versão 9.1.2 e o cálculo de relações falsas foi feito usando o Proc MULTTEST em SAS Versão 9.1.2.

Um modelo cumulativo generalizado foi usado para caracterizar a relação entre germinação dos conídios expostos à baixa temperatura e a latitude de origem dos isolados de *B. bassiana*. Uma figura descrevendo esta relação será exibida posteriormente.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Seleção de temperatura e tempo de exposição.

O teste preliminar com quatro isolados de *B. bassiana* (Bb 19, CG 310, CG 481 e ESALQ 747) indicou que a germinação média relativa decresceu de acordo com o aumento do tempo de exposição ao calor e revelou que a germinação relativa dos conídios de *B. bassiana* parece ser significativamente reduzida a cada uma hora de exposição a 43 °C ( $P < 0,05$ ) (Figura 2A). A exposição a 45 °C durante uma hora permitiu a separação de isolados com alta e média tolerância ao calor, e duas horas de exposição permitiu a separação de isolados com média e baixa tolerância, portanto, uma e duas horas foram os tempos escolhidos para identificar os isolados com baixa e alta tolerância ao calor entre todos os isolados de *Beauveria* spp. e *E. albus*, respectivamente. Além disso, este teste preliminar mostrou que os conídios de *B. bassiana* foram quase totalmente inativados após 3 horas de exposição a 45 °C ( $P < 0,05$ ) (Figura 2B).



**Figura 2.** Germinação relativa de quatro isolados de *Beauveria bassiana* expostos a 43 °C (A) e 45 °C (B) por zero, uma, duas, três ou quatro horas. Colunas com a mesma letra em um mesmo isolado não diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ).

### 3.2 Variação em termotolerância entre os isolados.

Poucos isolados de *Beauveria* spp. foram inibidos pela exposição a 45 °C por uma hora, no entanto, grande variabilidade em termotolerância dos conídios foi observada entre os isolados após duas horas de exposição a 45 °C, variando entre baixa (0-20%), média (20-60%), e alta germinação (60-88%) ( $P < 0,0001$ ) (Figura 3). Os isolados de *B. bassiana*, em particular, apresentaram termotolerância variando de 1,8% (Bb 09) a quase 90% (ARSEF 252). Isolados de outras espécies de *Beauveria* foram notadamente sensíveis ao calor, com germinação média relativa variando de praticamente 0%, como no isolado ARSEF 2998 de *B. velata*, a 13,6% no isolado ARSEF 4755 de *B. amorpha*. Em contrapartida, o isolado ARSEF 656 de *B. amorpha* foi uma exceção apresentando 70,9% de germinação média relativa.

### 3.3 Efeito do calor sobre o desenvolvimento do tubo germinativo.

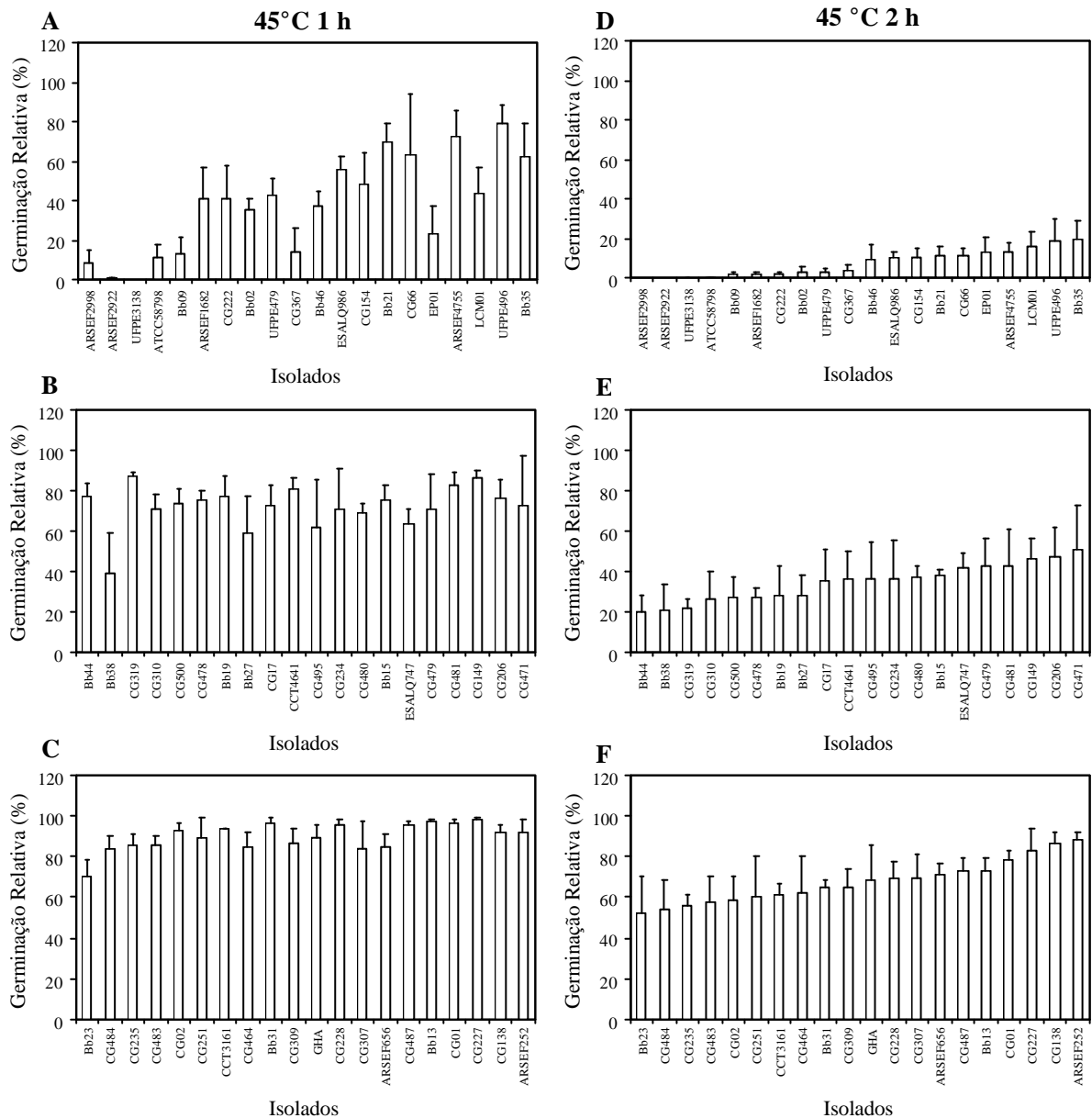
A germinação dos conídios de *B. bassiana* expostos ao calor ocorreu posteriormente a germinação dos conídios não submetidos a este estresse (controle). A germinação foi verificada a cada 12 horas após exposição ao calor, e os conídios do isolado Bb 19 apresentaram 0,5% de germinação depois de 12 horas de incubação e somente 2,3% depois de 24 horas. Em contrapartida, os conídios que não foram submetidos ao calor já haviam apresentado 100% de germinação após 24 horas de incubação. A germinação dos conídios expostos ao calor aumentou para 20,3% após 36 horas de incubação e para 74,1% após 48 horas (Figura 4).

### 3.4 Limites de tolerância ao calor em *B. bassiana*

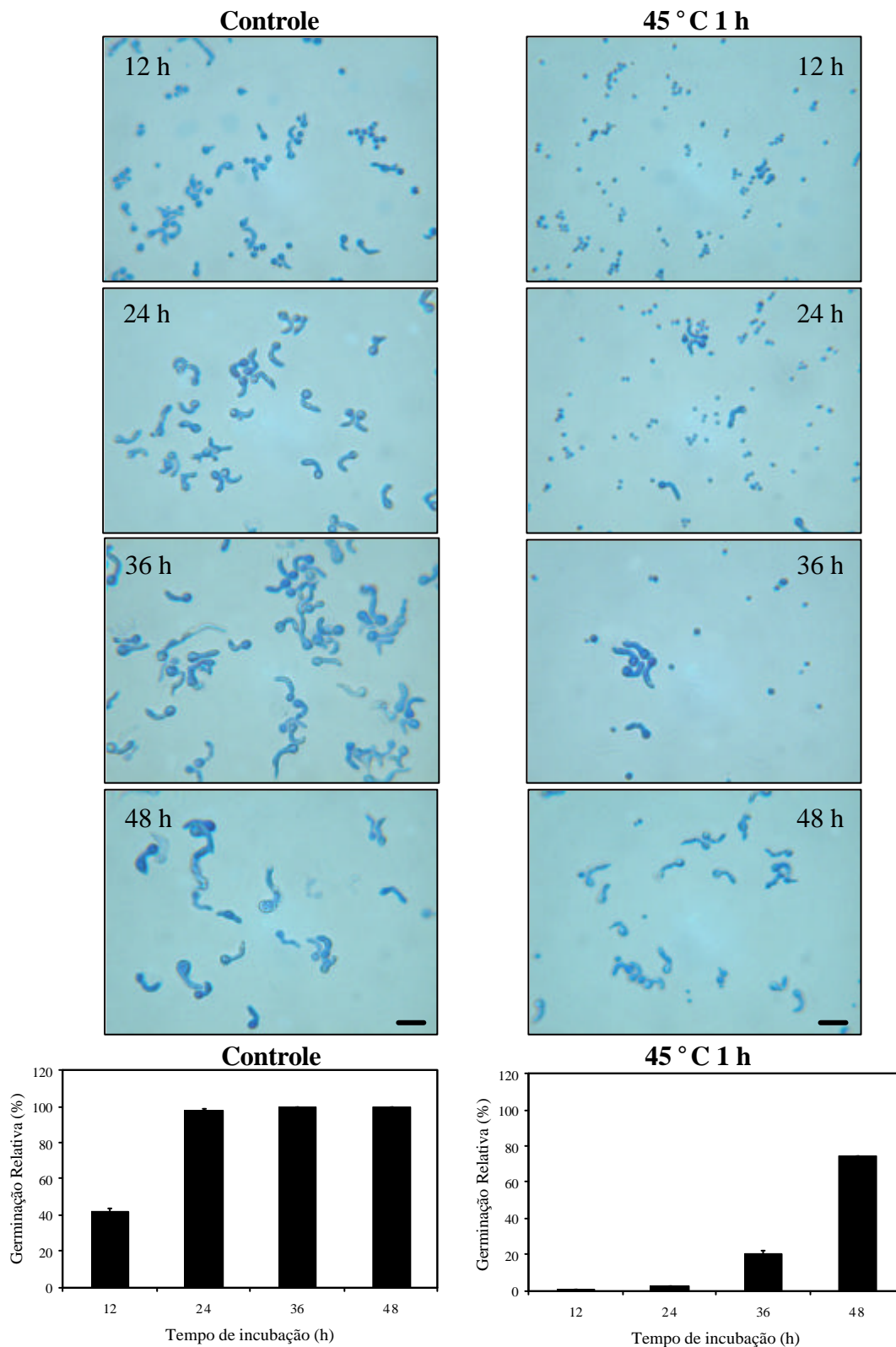
As temperaturas entre 44 °C e 45 °C por um período de seis horas de exposição, ou entre 46 °C e 47 °C por quatro horas foram limitantes à germinação dos conídios dos isolados mais termotolerantes de *B. bassiana* (CG 138, GHA e ARSEF 252). Além disso, menos de 40% dos conídios desses isolados permaneceram viáveis após exposição a 47 °C por duas horas (Figura 5).

### 3.5 Correlações entre termotolerância e atividade ao frio.

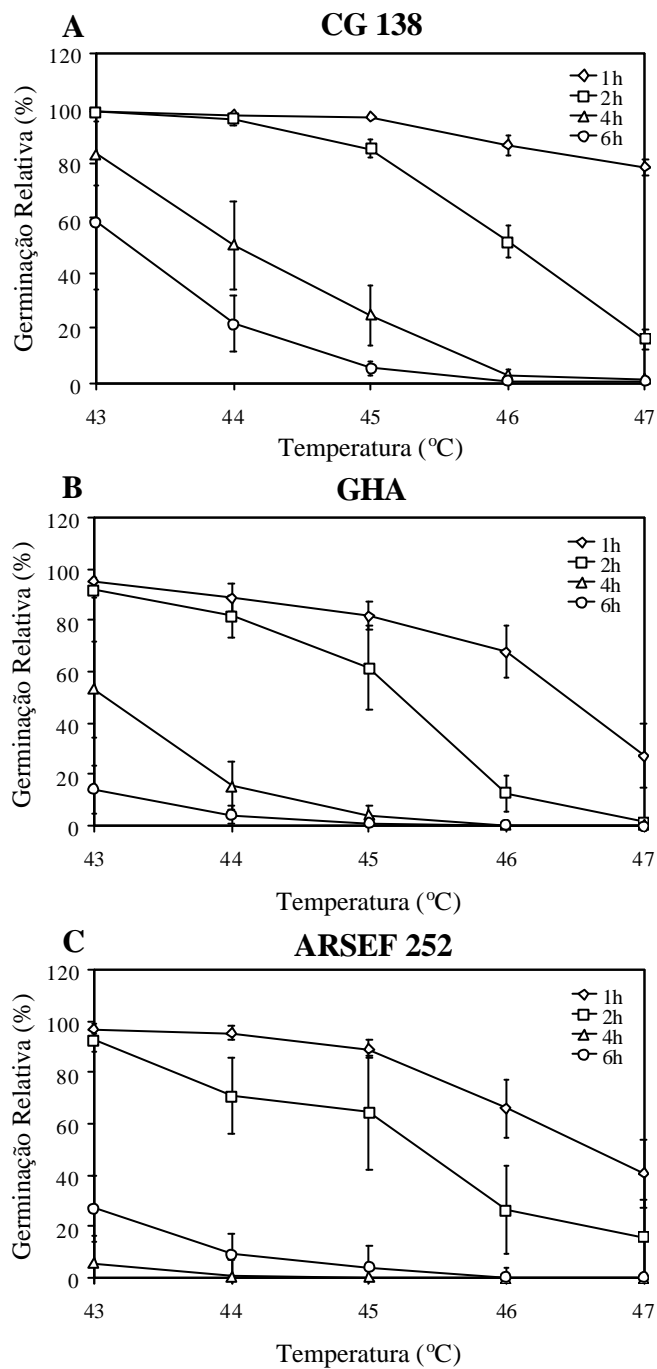
Os conídios de *Beauveria* permaneceram ativos quando mantidos a temperatura de 5 °C e apresentaram a maioria dos conídios em processo de germinação, com exceção dos isolados UFPE 3138, CG 66, UFPE 479, CG 227 e CG 02 ( $P > 0,0001$ ) (Figura 6). Interessante que o isolado UFPE 3138 de *E. albus* foi o mais sensível a ambos os estresses avaliados, calor e frio. Os conídios desse isolado não apresentaram germinação alguma sob baixa temperatura, mas apresentaram 100% de germinação depois de incubado a 25 °C por 24 horas. Os isolados de *B. bassiana*, ARSEF 252 e GHA, por outro lado, foram os isolados mais termotolerantes e também os mais ativos ao frio. Alguns isolados com alta atividade ao frio, entretanto, foram termosensíveis como por exemplo o isolado ARSEF 1682 de *B. amorpha*. Em comparação com *M. anisopliae*, os isolados de *Beauveria* foram mais ativos ao frio ( $P < 0,05$ ) (Figura 7). Os isolados de *M. anisopliae* não apresentaram atividade no frio, com exceção do isolado ARSEF 4343 que é originário da Austrália, próximo ao Círculo Polar Antártico. Todos os outros isolados apresentaram 100% de germinação depois de incubados a 28 °C por 24 horas.



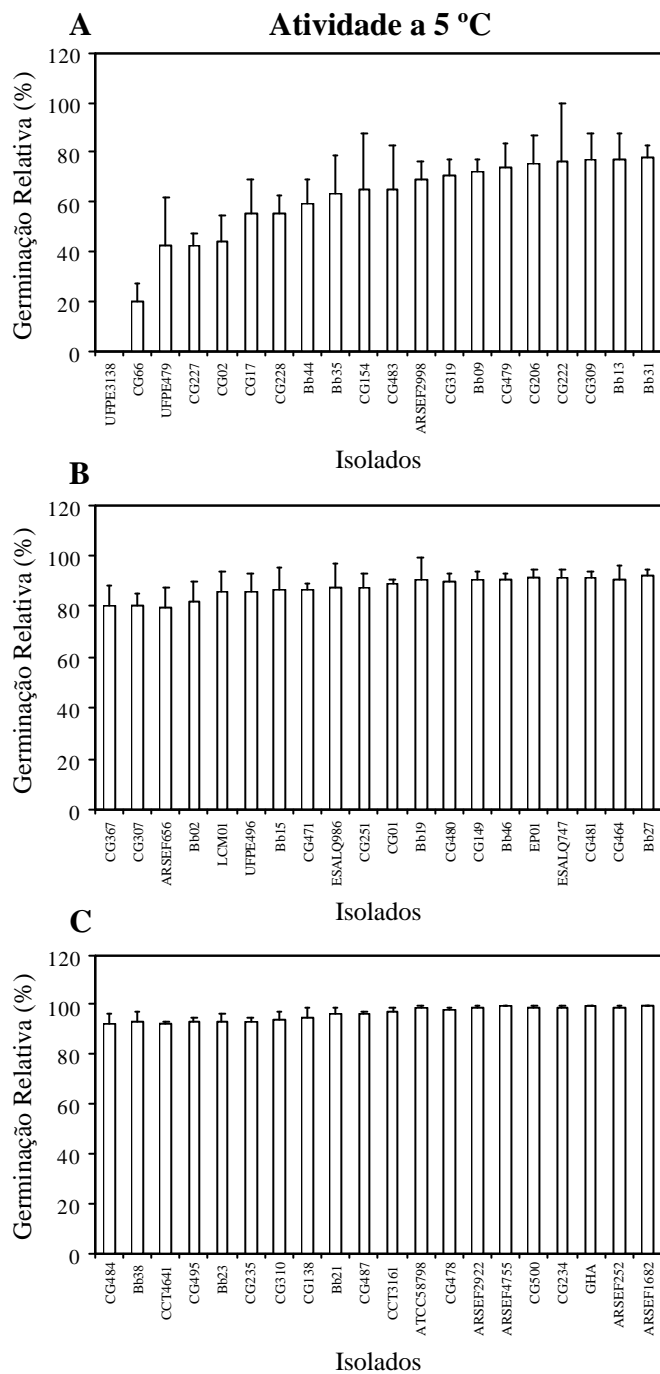
**Figura 3.** Germinação relativa dos isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) expostos a 45 °C por uma ou duas horas. Os isolados foram organizados a partir daqueles de menor tolerância para os de maior tolerância média a 45 °C por duas horas. Os isolados expostos por uma hora foram organizados seguindo a mesma ordem dos isolados expostos por duas horas. Notar variabilidade em termotolerância entre os isolados.



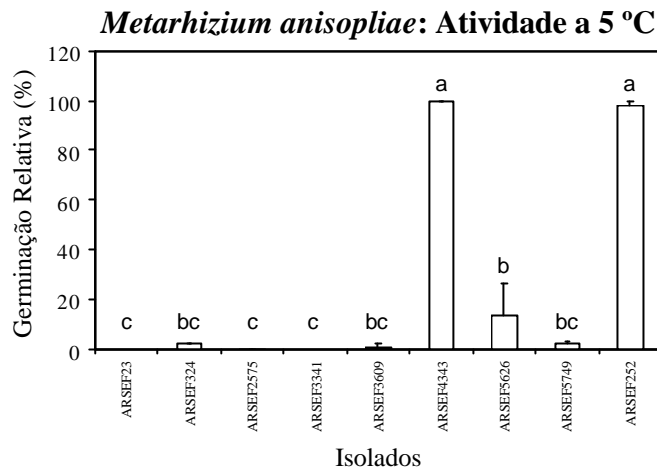
**Figura 4.** Velocidade de germinação dos conídios de *Beauveria bassiana* (Bb19) expostos a 45 °C por uma hora e dos conídios não submetidos ao calor (controle). A germinação foi avaliada a cada 12 horas após a exposição. Notar atraso na germinação dos conídios induzido pelo calor.



**Figura 5.** Curva de sobrevivência de três isolados termotolerantes de *Beauveria bassiana* expostos a 43, 44, 45, 46 e 47 °C por uma, duas, quatro e seis horas.



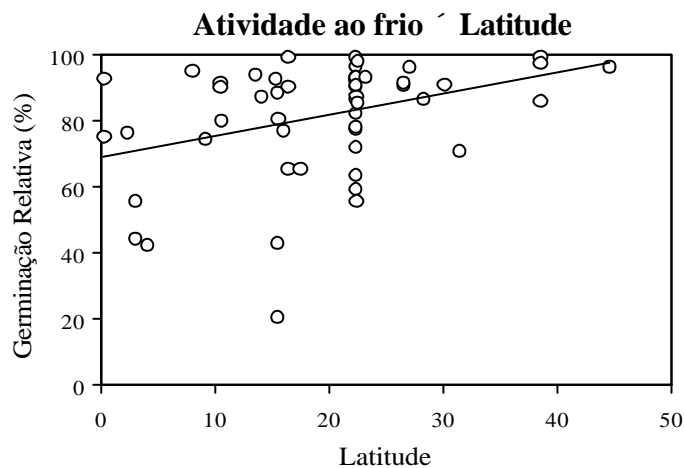
**Figura 6.** Germinação relativa dos isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) após incubação a 5 °C por 15 dias. Os isolados foram organizados a partir daqueles de menor atividade para os de maior atividade ao frio.



**Figura 7.** Germinação relativa dos isolados de *Metarhizium anisopliae* comparada a do isolado padrão de *B. bassiana* (ARSEF 252) após 15 dias de incubação a 5 °C. Colunas com a mesma letra em um mesmo isolado não diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ).

### 3.6 Correlação entre latitude de origem e termotolerância.

Nenhuma correlação foi observada entre a latitude de origem dos isolados de *B. bassiana* e tolerância ao calor. No entanto, os isolados originários de localidades distantes do equador apresentaram maior germinação relativa quando mantidos sob baixa temperatura do que os isolados originários próximos ao equador ( $P < 0,0001$ ) (Figura 8).



**Figura 8.** Relação entre latitude de origem de todos os 53 isolados de *Beauveria bassiana* e a germinação média relativa após 15 dias de incubação a 5 °C, caracterizado por um modelo cumulativo generalizado. A não germinação foi potencialmente maior nos isolados obtidos das latitudes mais baixas ( $P < 0,0001$ ).



## 4 DISCUSSÃO

Existe variabilidade significativa entre os isolados de *B. bassiana* difundidos pelo mundo inteiro em relação ao crescimento sob diferentes temperaturas. A ampla variação na tolerância ao calor proporciona a esta espécie notável adaptação a condições de grande flutuação térmica (FARGUES *et al.*, 1997a). Interessante o fato de que uma considerável variabilidade em termotolerância foi observada entre conídios de diferentes isolados de *B. bassiana* originados de regiões tropicais mesmo quando coletados em uma mesma localidade. Isto é uma evidência de que esta espécie de fungo pode ser adaptada a diversos microambientes. Estudos prévios a este revelaram que isolados de *M. anisopliae* estavam distribuídos de acordo com suas condições abióticas locais, onde os isolados obtidos de regiões agrícolas foram mais tolerantes à exposição ao calor e à radiação ultravioleta, do que os isolados obtidos de regiões de floresta com latitudes semelhantes (BIDOCHKA *et al.*, 2001).

Uma tentativa de correlacionar a latitude de origem dos isolados de *B. bassiana* com termotolerância ou atividade ao frio não indicou correlação alguma com o calor. No entanto, os isolados originários de latitudes mais altas apresentaram-se mais ativos ao frio do que os isolados originários de latitudes próximas à linha do equador. Nenhuma correlação entre crescimento relativo e origem climática de isolados de *B. bassiana* foi previamente estabelecida (FARGUES *et al.*, 1997a; DEVI *et al.*, 2005). Em contrapartida, isolados de *M. anisopliae* obtidos de latitudes mais altas demonstraram maior sensibilidade ao calor do que isolados obtidos próximos ao equador (RANGEL *et al.*, 2005). Da mesma forma, populações do hemisfério sul ou norte exibem maior tolerância ao frio do que populações equatoriais (McCAMMON; RATH, 1994).

Varela e Morales (1996) mostraram que nenhuma germinação ocorreu quando conídios de diversos isolados de *B. bassiana* foram mantidos em banho-maria a 55 °C por dez minutos. A viabilidade dos conídios submetidos a 50 e 45 °C decresceu para 82 - 90% e 10 - 20%, respectivamente quando submetidos pelo mesmo período. Apesar do curto tempo de exposição, a germinação foi avaliada após 24 horas de incubação. Altas temperaturas retardam o processo de germinação conidial em *B. bassiana* (DEVI *et al.*, 2005) e também em *M. anisopliae* (RANGEL *et al.*, 2005; ZIMMERMANN, 1982). Da mesma forma, os isolados avaliados neste estudo apresentaram notável atraso na germinação. Este atraso está associado com a necessidade de reparação dos danos provocados pelo calor antes de iniciar o processo de germinação (NICHOLSON *et al.*, 2000). Entre os danos causados pela alta temperatura, o principal deles é a desnaturação de proteínas (SETLOW; SETLOW, 1998).

Os isolados ARSEF 252, CG 138, CG 227 e CG 01 foram os isolados mais termotolerantes, no entanto, outros isolados como Bb 13, CG 307, GHA e CCT 3161, também apresentaram tolerância satisfatória com germinação média relativa superior a 60% quando expostos por duas horas a 45 °C. É importante a observação de que dentre vários isolados de *B. bassiana* originários de regiões tropicais, os isolados GHA, CCT 3161 e ARSEF 252 originários de regiões temperadas dos Estados Unidos foram uns dos mais termotolerantes. Previamente, o isolado GHA foi relatado como mais eficiente em provocar mortalidade sob a temperatura de 30 °C do que sob temperaturas mais baixas (EKESI *et al.*, 1999). Sabe-se que os isolados de fungos entomopatogênicos são expostos ao estresse térmico não somente pelas condições ambientais, mas também por aquelas estabelecidas através da termorregulação do hospedeiro. Alguns insetos, como os gafanhotos, podem elevar sua temperatura corporal através da seleção de habitat ou expondo-se ao sol (CHAPPEL; WHITMAN, 1990; HEINRICH, 1993), e possivelmente, cenários como este foram capazes de selecionar isolados de *B. bassiana* mais adaptados a altas temperaturas em regiões

temperadas (FARGUES *et al.*, 1997a).

A termotolerância e a atividade ao frio não demonstraram nenhuma correlação em *B. bassiana*. Todos os isolados foram ativos ao frio, incluindo os isolados mais tolerantes ao calor. *Beauveria bassiana* foi sugerida para o controle de insetos em locais de clima frio ou durante as estações de clima mais ameno, devido sua habilidade em desenvolver-se sob temperaturas mais baixas (EKESI *et al.*, 1999). Interessantemente, os isolados de diferentes espécies de *Beauveria* foram também ativos ao frio, com exceção do isolado de *E. albus* (UFPE 3138). Em teste comparativo, *B. bassiana* demonstrou ser mais ativa ao frio do que isolados de *M. anisopliae*, com exceção do isolado ARSEF 4343 que é originário de Macquarie Island, Austrália. Estudos prévios indicaram que este isolado de *M. anisopliae* obtido na latitude de 54,3 °S possui atividade ao frio (RATH *et al.*, 1995; RODDAM; RATH, 1997). Concluindo portanto que *B. bassiana* é mais psicrófila do que os isolados de *M. anisopliae*. Resultados similares foram previamente encontrados por Bidochka *et al.* (1998) quando verificaram que *B. bassiana* foi mais frequentemente isolada de solo de regiões localizadas mais ao norte, em comparação com *M. anisopliae*. Além disso, a atividade ao frio esteve consideravelmente mais relacionada a origem dos isolados em *M. anisopliae* do que em *B. bassiana*. Da mesma forma, todos os isolados de *M. anisopliae* com atividade ao frio foram obtidos de locais mais ao norte ou sul, e nenhum deles obtidos de latitudes abaixo de 43,5° demonstraram atividade ao frio (DE CROSS; BIDOCHKA, 1999).

A temperatura é um dos principais fatores limitantes para fungos entomopatogênicos (ROBERTS; CAMPBELL, 1997). Neste sentido, os isolados de *B. bassiana* com maior tolerância ao calor, CG 01, CG 227, CG 138 e ARSEF 252, possuem maior potencial para atuarem em programas de controle biológico em países tropicais. No entanto, a radiação ultravioleta parece ser a variável mais eficiente para expressar o efeito prejudicial da luz solar sobre a persistência dos conídios de fungos entomopatogênicos em ambientes expostos ao sol (FARGUES *et al.*, 1997b). Portanto, não apenas os isolados tolerantes a variações de temperatura, mas também os tolerantes à radiação UV-B devem ser usados no processo de seleção de isolados candidatos para o controle microbiano de artrópodes em países de clima tropical.

## **CAPÍTULO IV**

### **SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Beauveria* spp. TOLERANTES À RADIÇÃO UV-B**

## RESUMO

*Beauveria bassiana* é um importante fungo entomopatogênico usado em todo o mundo como agente de controle biológico de artrópodes. Um eficiente controle biológico de artrópodes utilizando fungos requer a manutenção da viabilidade e virulência do inóculo fúngico após a aplicação no ambiente. A radiação solar, e particularmente os raios UV-B, são o maior fator ambiental que pode afetar negativamente os fungos entomopatogênicos. Um teste preliminar com três isolados de *B. bassiana* (Bb 19, CG 310 e CG 481) indicou que 2 h de irradiação UV-B à 978 mW m<sup>2</sup> proporcionando uma dose total de 7,04 kJ m<sup>2</sup> permitiu a separação de isolados com baixa, média ou alta tolerância à UV-B. Esta dose, portanto, foi selecionada como dose única para comparar a tolerância à UV-B entre os 60 isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*). Neste sentido, foi observada uma elevada variabilidade em tolerância à radiação UV-B entre os isolados de *B. bassiana* estudados, variando de praticamente 0% (Bb 03) a quase 80% de tolerância (CG 228). Além disso, conídios de *B. bassiana* expostos à radiação UV-B demonstraram atraso na germinação. Isolados das demais espécies foram extremamente sensíveis ao UV-B, com o percentual médio de germinação variando de 1,6% (*E. albus* – UFPE 3138) a 29,1% (*B. amorpha* – ARSEF 656). Isolados de *B. bassiana* originários de localidades com latitudes mais baixas tenderam a apresentar menor tolerância à radiação UV-B do que isolados originários de latitudes mais altas. Uma análise similar baseado no hospedeiro de origem não indicou correlação alguma. Foi possível selecionar isolados de *B. bassiana* tolerantes à radiação UV-B com maior potencial de eficácia para atuarem em estudos de controle de artrópodes em condições de campo.

**Palavras-chave:** *Beauveria bassiana*; *Beauveria* spp.; *Engyodontium albus*; irradiação; radiação UV-B; tolerância conidial; germinação atrasada.

## ABSTRACT

*Beauveria bassiana* is an important entomopathogenic fungus that is used worldwide as a biological control agent of arthropods. Efficient biocontrol of arthropods with fungi requires maintenance of viability and virulence of the fungal inoculum after field application. Solar radiation, particularly in the UV-B wavelength, is a major environmental factor that can negatively affect these traits in entomopathogenic fungi. A preliminary trial with three isolates of *B. bassiana* (Bb 19, CG 310 and CG 481) indicated that 2 hours of weighted UV-B at irradiance of 978 mW m<sup>-2</sup> providing a total dose of 7.04 kJ m<sup>-2</sup> allowed separation of isolates into low, medium or high UV-B tolerance. This dose, therefore, was selected as a single dose to compare UV-B tolerance among all 60 *Beauveria* spp. and *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) isolates. There was a high variability in tolerance to UV-B radiation among *B. bassiana* isolates; ranging from virtually zero tolerance (e.g. Bb 03) to almost 80% tolerance (e.g. CG 228). In addition, conidia of *B. bassiana* demonstrated delayed germination after UV-B radiation. Isolates of other species were markedly sensitive to UV-B, with relative mean percentage of germination ranging from 1.6% (*E. albus* – UFPE 3138) to 29.1% (*B. amorpha* – ARSEF 656). Isolates of *B. bassiana* originating from lower latitudes tended to have lower UV-B tolerances than isolates from higher latitudes. A similar analysis based on host type did not indicate a correlation. It was possible to select UV-B tolerant *B. bassiana* isolates with major effective potential for studies on arthropods' control under field conditions.

**Key words:** *Beauveria bassiana*; *Beauveria* spp.; *Engyodontium albus*; irradiation; UV-B radiation; UV-B conidial tolerance; delayed germination.

## 1 INTRODUÇÃO

A radiação solar conduz essencialmente todo processo vital sobre a superfície da Terra, mas paradoxalmente é a maior fonte de danos para componentes de esporos celulares e causadores de danos letais e mutagênicos ao DNA (NICHOLSON *et al.*, 2000). A porção UV-B da luz solar induz a formação de dímeros de pirimidina no DNA (SLIEMAN; NICHOLSON, 2000), e esses dímeros promovem distorção da hélice e causam mutação ou falhas na transcrição (AYRES *et al.*, 1996). A radiação UV-A, em contrapartida, causa espécies de oxigênio reativo, ou *reactive oxygen species* (ROS) em inglês, e provoca ruptura das pontes fosfodiéster no DNA (SLIEMAN; NICHOLSON, 2000). Além desses efeitos solares diretos causados pela radiação ultravioleta, os esporos no meio ambiente são também expostos aos efeitos indiretos como o calor e a dessecação simultaneamente (NICHOLSON *et al.*, 2000).

A dose de radiação solar UV-B parece ser a variável mais eficiente para expressar o efeito prejudicial da luz solar na persistência dos conídios de entomopatógenos expostos ao sol em condições naturais (FARGUES *et al.*, 1997b). Alguns estudos têm demonstrado os efeitos que a radiação UV-B pode exercer sobre os fungos entomopatogênicos, e neste sentido, estudos têm sido conduzidos em *Hirsutella thompsonii* (TUVESON; McCOY, 1982), *Metarhizium anisopliae* (ZIMMERMANN, 1982; ALVES *et al.*, 1998; BRAGA *et al.*, 2001a, b, c) *M. anisopliae* var. *acridum* (= *M. flavoviridae*) (MOORE *et al.*, 1993) *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (FARGUES *et al.*, 1997b), *Simplicillium lanosoniveum* (= *Verticillium lecanii*) e *Lecanicillium aphanocladii* (= *Aphanocladium album*) (BRAGA *et al.*, 2002) e *Beauveria bassiana* (INGLIS *et al.*, 1995; MORLEY-DAVIES *et al.*, 1996; FARGUES *et al.*, 1996). É notável a extensa diferença interespecífica de suscetibilidade à radiação e as variações intra-específicas revelando que a seleção de isolados tolerantes à radiação pode ser importante no desenvolvimento de agentes de controle microbiano onde é desejável a sua persistência em ambientes expostos ao sol (FARGUES *et al.*, 1996).

Em geral, poucas horas de exposição direta à radiação de intensidade encontrada freqüentemente no meio ambiente são suficientes para inativar completamente os conídios de todas as espécies de fungos já estudadas. Além disso, a radiação ultravioleta provoca o atraso na germinação dos conídios que persistem após exposição (ZIMMERMANN, 1982; MOORE *et al.*, 1993; BRAGA *et al.*, 2001a, b, c). Neste sentido, a inativação e o atraso na germinação dos conídios são eventos esperados que podem reduzir a eficiência de organismos como bioinseticidas em situações com forte exposição à radiação solar (BRAGA *et al.*, 2002). No entanto, através da seleção dos isolados mais tolerantes à radiação UV-B e da incorporação de substâncias protetoras aos raios ultravioletas nas formulações, pode ser possível prolongar significativamente a persistência desses fungos em habitat expostos a luz solar e, por meio disso, aumentar significativamente também a eficácia para controlar o artrópode alvo (FARGUES *et al.*, 1996).

No presente estudo, o efeito da radiação ultravioleta, UV-B, foi examinado sobre a germinação de conídios de 53 isolados de *B. bassiana*, seis isolados de outras espécies de *Beauveria* e um isolado de *Engyodontium album* (= *Beauveria alba*) originados de diferentes hospedeiros e regiões geográficas. A maioria dos isolados estudados são originados de diferentes regiões do Brasil. Foram feitas comparações entre a origem dos isolados e a tolerância dos conídios à radiação, mas o principal objetivo deste estudo foi selecionar isolados de *B. bassiana* naturalmente tolerantes à UV-B, com maior potencial para atuarem em programas de controle microbiano de artrópodes sob as condições naturais dos países tropicais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local e período de execução dos experimentos.

Os experimentos de avaliação da tolerância dos diferentes isolados à radiação ultravioleta foram realizados entre os meses de setembro e novembro de 2005 no Departamento de Biologia da Universidade do Estado de Utah – USU, nos Estados Unidos.

### 2.2 Isolados estudados.

Cinquenta e três isolados de *B. bassiana*, seis isolados de outras espécies de *Beauveria* e um isolado de *E. albus* foram estudados. Eles foram obtidos de coleções de culturas de diferentes instituições e suas origens geográficas e hospedeiros ou substratos estão disponíveis na Tabela 1.

### 2.3 Germinação relativa de conídios expostos à radiação UV-B.

Os isolados de *Beauveria* spp. e *E. albus* foram cultivados em 23 ml de meio batata dextrose ágar (Difco Laboratories, Detroit, MI) suplementado com  $1\text{g } \Gamma^{-1}$  de extrato de levedura (Technical, Difco) (PDAY) em placas de Petri ( $100 \times 15\text{ mm}$ , Fisherbrand) mantidas em ausência de luz a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  por 15 dias. Os conídios foram colhidos com auxílio de uma espátula e suspensos em uma solução de Tween 80 (0.01% v/v). A suspensão preparada com aproximadamente  $10^5$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  foi vigorosamente agitada e filtrada através de uma membrana de policarbonato com poros de  $8\text{ }\mu\text{m}$  de tamanho (Nucleopore<sup>®</sup>, Acton, MA, USA). Uma alíquota de  $20\text{ }\mu\text{l}$  da suspensão foi inoculada em 4 ml de meio PDAY acrescido de 0,002% (w/v) de Benomyl com 25% de ingrediente ativo (Hi-Yield Chemical Company, Bonham, TX) (MILNER *et al.*, 1991; BRAGA *et al.*, 2001a, b) em placas de Petri ( $35 \times 10\text{ mm}$ , Fisher, Pittsburgh, PA, USA). A baixa concentração de Benomyl no meio de cultura inibe o crescimento do tubo germinativo sem afetar desfavoravelmente o processo de germinação. Este procedimento permite que a germinação seja monitorada durante maior período de tempo (MILNER *et al.*, 1991).

As placas foram imediatamente expostas à  $978\text{ mW m}^{-2}$  de irradiação ultravioleta por duas lâmpadas fluorescentes TL 20W/12 RS (Philips, Eindhoven, Holland) produzindo principalmente radiação UV-B, com comprimento de onda atingindo o máximo de 313 nm, e produção mínima de radiação UV-A em câmara Percival para crescimento (Boone, IA, USA) mantida a  $25 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  (BRAGA *et al.*, 2001c). As placas irradiadas foram cobertas com um filme de diacetato de celulose com 0,13 mm de espessura (JCS Industries, Le Mirada, CA) o qual permite o bloqueio de radiação com comprimento de onda inferior a 290 nm. Este procedimento permitiu a passagem da maioria da radiação UV-B (290-320 nm) e UV-A (320-400 nm), mas impediu a exposição das amostras à radiação UV-C (200-280 nm) e UV-B com menores comprimento de onda. Placas do grupo controle foram cobertas com folha de papel alumínio para bloquear toda radiação ultravioleta. O espectro de distribuição da irradiação na câmara é exibido na Figura 1. O espectro da irradiação foi mensurado com utilização do espectroradiômetro Ocean Optics USB 2000 (Dunedin, FL).

Após irradiação, as placas foram incubadas por 48 horas a  $25 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  em ausência total de luz. A germinação dos conídios foi observada utilizando microscópio com magnitude de  $400\times$ . Um número mínimo de 300 conídios por placa foi avaliado e o percentual relativo de germinação foi calculado através de comparação com a germinação dos conídios não expostos à radiação UV-B, utilizando-se a seguinte equação: Germinação Relativa (%) =  $(Wt/Wc) \times$

**Tabela 1.** Isolados de *Beauveria bassiana* e “outgroup” com isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium album* (= *Beauveria alba*), seus hospedeiros ou substratos, regiões geográficas e latitudes de origem, ano de isolamento e coleção de cultura procedente (continua).

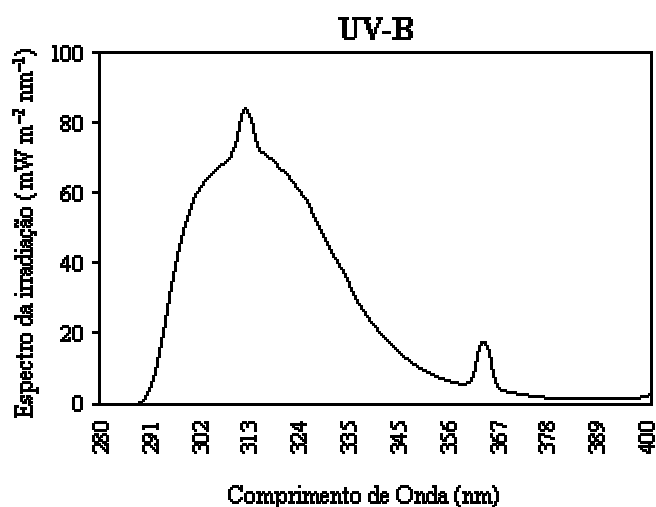
<b>Isolados de <i>Beauveria</i> agrupados de acordo com hospedeiro / substrato de origem</b>					
<b>#</b>	<b>Isolado*</b>	<b>Hospedeiro, Substrato</b>	<b>Origem</b>	<b>Latitude</b>	<b>Ano</b>
<i>Beauveria bassiana</i>					
01	Bb 02	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
02	Bb 09	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
03	Bb 13	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
04	Bb 15	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
05	Bb 19	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
06	Bb 21	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
07	Bb 23	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
08	Bb 27	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
09	Bb 31	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
10	Bb 35	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
11	Bb 38	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
12	Bb 44	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
13	Bb 46	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	22°37' S	1999
14	LCM 01	(Acari: Ixodidae)	Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil	22°45' S	2002
15	ESALQ 986	(Acari: Ixodidae)	Piracicaba, São Paulo, Brasil	22°43' S	1990
16	CG 66	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Brasília, Distrito Federal, Brasil	15°47' S	1988
17	CG 222	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Costa do Surubim, Amazonas, Brasil	2°33' S	1981
18	CG 227	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Pacajus, Ceará, Brasil	4°10' S	1982
19	CG 228	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Manaus, Amazonas, Brasil	3°07' S	1991
20	CG 319	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil	31°46' S	1990
21	CG 464	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Francisco Beltrão, Paraná, Brasil	26°50' S	1984
22	CG 481	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Ribeira do Pombal, Bahia, Brasil	10°50' S	1985
23	CG 484	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Ponta Porã, MS, Brasil	22°32' S	1983
24	CG 495	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Londrina, Paraná, Brasil	23°18' S	1987
25	CG 500	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Goiânia, Goiás, Brasil	16°44' S	1985
26	ARSEF 252	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Orono, Maine, Estados Unidos	44°53' N	1978
27	GHA	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Montana, Estados Unidos	44°53' N	1980
28	CG 02	(Coleoptera: Curculionidae)	Manaus, Amazonas, Brasil	3°07' S	1988
29	CG 138	(Coleoptera: Curculionidae)	Recife, Pernambuco, Brasil	8°05' S	1989
30	CG 367	(Coleoptera: Curculionidae)	Aracaju, Sergipe, Brasil	1°054' S	1991
31	CG 471	(Coleoptera: Curculionidae)	Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil	28°23' S	1984
32	CG 478	(Coleoptera: Curculionidae)	Campinas, São Paulo, Brasil	22°55' S	1983
33	CG 483	(Coleoptera: Curculionidae)	Goiânia, Goiás, Brasil	16°44' S	1982
34	EP 01	(Coleoptera: Curculionidae)	Itajaí, Santa Catarina, Brasil	26°54' S	1989
35	CG 17	(Coleoptera: Scolytidae)	Piracicaba, São Paulo, Brasil	22°43' S	1988
36	UFPE 496	(Coleoptera: Scolytidae)	Estados Unidos	38°54' N	1955
37	CG 01	(Homoptera: Cercopidae)	Brasília, Distrito Federal, Brasil	15°47' S	1984
38	CG 149	(Homoptera: Cercopidae)	Goiânia, Goiás, Brasil	16°44' S	1982
39	CG 154	(Homoptera: Cercopidae)	Jataí, Goiás, Brasil	17°53' S	1983
40	CG 234	(Homoptera: Cicadellidae)	Ponta Porã, MS, Brasil	22°32' S	1983
41	CG 206	(Hymenoptera: Vespidae)	Costa do Arapapa, Amazonas, Brasil	0°33' S	1981
42	CG 235	(Hymenoptera: Vespidae)	Costa do Arapapa, Amazonas, Brasil	0°33' S	1981
43	CG 479	(Hymenoptera: Vespidae)	Santana do Ipanema, Alagoas, Brasil	9°22' S	1985
44	ESALQ 747	(Hymenoptera: Formicidae)	Belém Novo, RS, Brasil	30°13' S	1988
45	CCT 4641	(Hymenoptera: Formicidae)	Cuiabá, Mato Grosso, Brasil	15°37' S	1988
46	CG 251	(Hymenoptera: Formicidae)	Colinas do Sul, Goiás, Brasil	14°12' S	1991
47	CG 480	(Hymenoptera: Formicidae)	Ribeira do Pombal, Bahia, Brasil	10°50' S	1985



**Tabela 1.** Continuação.

#	Isolado*	Hospedeiro, Substrato	Origem	Latitude	Ano
48	CG 487	(Hymenoptera: Apoidea)	São Carlos, Santa Catarina, Brasil	27°04' S	1984
49	UFPE 479	(Lepidoptera: Bombycidae)	Brasil	15°47' S	1955
50	CG 307	Solo	Goiás, Brasil	15°56' S	1990
51	CG 309	Solo	Salto da Divisa, Minas Gerais, Brasil	16°00' S	1990
52	CG 310	Solo	Jequié, Bahia, Brasil	13°52' S	1990
53	CCT 3161	Contaminante de Laboratório	Estados Unidos	38°54' N	1970
OUT GROUP					
#	Isolado*	Hospedeiro, Substrato	Origem	Latitude	Ano
<i>Beauveria amorpha</i>					
54	ARSEF 656	(Homoptera: Cicadellidae)	Hunan, China	28°43' N	1981
55	ARSEF 1682	(Coleoptera: Scarabaeidae)	Nagano Prefecture, Japão	36°39' N	1980
56	ARSEF 4755	Solo	Bruny Island, Tasmânia, Austrália	43°25' S	1988
<i>Beauveria brongiartii</i>					
57	ATCC 58798	(Diptera: Tipulidae)	Czechoslovakia	50°50' N	?
<i>Beauveria velata</i>					
58	ARSEF 2998	(Lepidoptera)	Equador	0°11' S	1990
<i>Beauveria vermiconia</i>					
59	ARSEF 2922	Cinza vulânica	Valdivia, Los Lagos, Chile	39°49' S	1974
<i>Engyodontium albus</i> (= <i>Beauveria alba</i> )					
60	UFPE 3138	Solo marinho	Pernambuco, Brasil	8°05' S	1989

\* Coleção de Culturas: **Bb** = Laboratório de Coleção de Cultura de Fungos – Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Brasil; **LCM** = Laboratório de Controle Microbiano - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Brasil; **ESALQ** = Departamento de Entomologia - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ / USP, Brasil; **CG** = Centro Nacional de Recursos Genéticos - CENARGEN / EMBRAPA, Brasil; **ARSEF** = ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures - ARSEF / USDA, Estados Unidos; **EP** = Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A. – EPAGRI, Brasil; **UFPE** = Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Brasil; **CCT** = Coleção de Culturas Tropicais André Tosello, Brasil; **GHA** = Isolado comercializado por Emerald Bioagriculture Corporation, MYCOTROL ES<sup>®</sup>, EPA 070810-00006, Estados Unidos; **ATCC** = American Type Culture Collection, Estados Unidos, USA.



**Figura 1.** Espectro da irradiação após passagem em filme de diacetato de celulose na câmara de tratamentos com UV-B. Lâmpadas produzindo radiação UV-B à 978 mW m<sup>-2</sup>.

100, onde  $Wt$  é o número de conídios em germinação em cada placa exposta por um período  $t$  de tempo, e  $Wc$  é o número médio de conídios germinados nas placas pertencentes ao grupo controle, conforme descrito por Braga *et al.* (2001a).

Um teste preliminar com três isolados de *B. bassiana* (Bb 19, CG 310 e CG 481) expostos por 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos, com doses totais de 1,76; 3,52; 5,28; 7,04; 8,80 e 10,56  $\text{kJ m}^{-2}$  respectivamente, indicou que o período de 120 minutos foi um tempo apropriado de exposição. Sendo assim, todos os 60 isolados foram expostos à radiação UV-B por este período de tempo. Todos os experimentos tiveram três repetições, e cada experimento foi repetido em dias diferentes com utilização de novo lote de conídios para cada.

## 2.4 Análise estatística.

As diferenças entre os três isolados de *B. bassiana* e os efeitos de sete tempos de exposição sobre a viabilidade de conídios foram avaliados através da análise de variância fatorial  $3 \times 7$  em um delineamento em blocos ao acaso. Os dados sofreram transformação radical prévia para melhor conjectura da normalidade e homogeneidade da variância. Múltiplos teste  $t$  foram usados para comparações entre os tempos médios de exposição de cada isolado, e os valores de  $P$  foram calculados assumindo erro do tipo I a  $\alpha=0,05$ .

Os experimentos com todos os 60 isolados usaram um Delineamento de Blocos Incompletos Balanceados (DBIB) com 60 tratamentos (isolados) em seis blocos de 22. Este delineamento produziu duas ou três réplicas de cada isolado. Contudo, o DBIB foi repetido três vezes, produzindo de seis (ou menos, quando houve falha do controle) a nove réplicas de cada isolado. A análise calculou uma média com mais de três réplicas e usou a média como dado em uma análise de variância do DBIB original. Os dados sofreram transformação radical prévia à análise e múltiplos testes  $t$  foram usados para comparações do tempo médio de exposição de cada isolado. Valores de  $P$  calculados foram ajustados assumindo erro do tipo I a  $\alpha = 0,10$  usando o método Tukey-Kramer. Modelos ANOVA foram adaptados usando Proc MIXED em SAS Versão 9.1.2 e o cálculo de relações falsas foi feito usando o Proc MULTTEST em SAS Versão 9.1.2.

Um modelo cumulativo generalizado foi usado para caracterizar a relação entre germinação dos conídios expostos à radiação UV-B e latitude de origem dos isolados de *B. bassiana*.

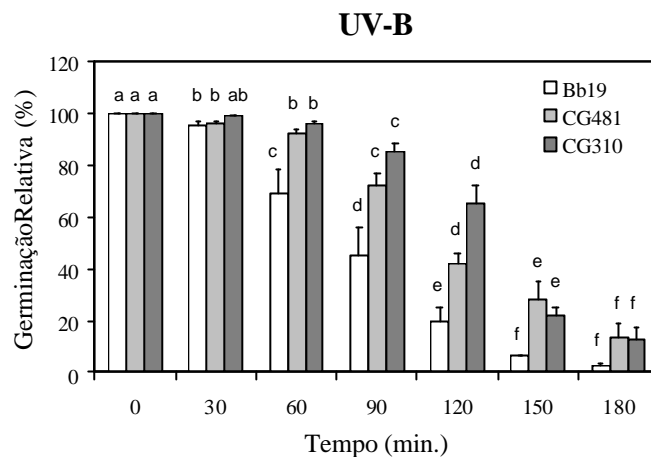
## 3 RESULTADOS

### 3.1 Seleção da dose.

O teste preliminar com os três isolados de *B. bassiana* (Bb 19, CG 310 e CG 481) indicou que duas horas ( $7,04 \text{ kJ m}^{-2}$ ) de exposição à radiação UV-B permitiu a separação dos isolados com baixa, média e elevada tolerância, portanto, este período de tempo foi selecionado como dose única para comparação da tolerância entre todos os 60 isolados estudados. Além disso, foi observado que a germinação relativa decresceu com o aumento do tempo de exposição à radiação, e mostrou que a germinação relativa dos conídios de *B. bassiana* parece ser significativamente reduzida a cada 30 minutos ( $P < 0,05$ ) de exposição à  $978 \text{ mW m}^{-2}$  de irradiação UV-B (Figura 2).

### 3.2 Velocidade de germinação dos conídios.

Os conídios de *Beauveria* spp. expostos à radiação UV-B por duas horas



**Figura 2.** Germinação relativa dos isolados de *Beauveria bassiana* após exposição por 0, 30, 60 90, 120, 150 ou 180 minutos à radiação de 978 mW m<sup>-2</sup>. Colunas com a mesma letra em um mesmo isolado não diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ).

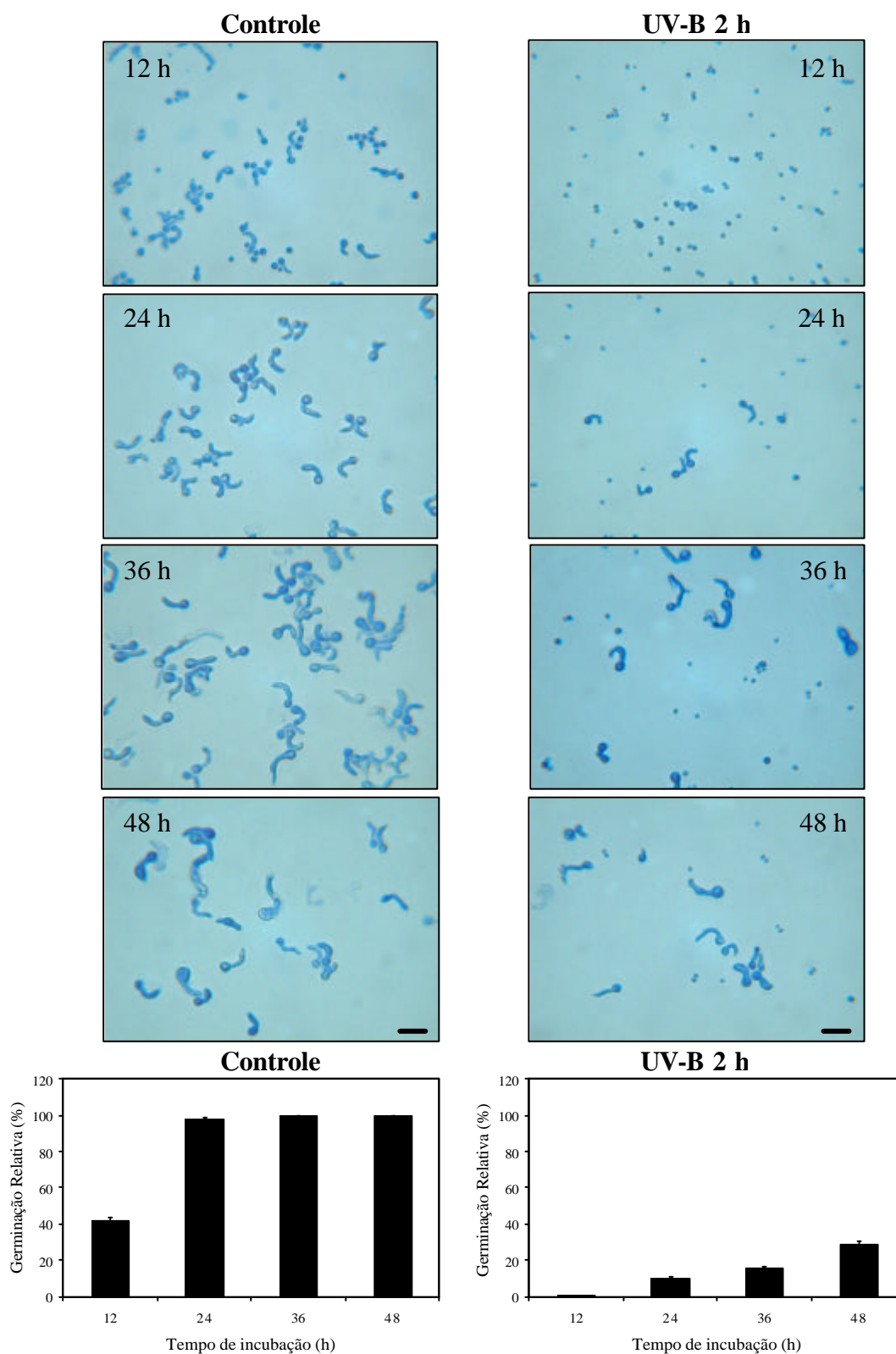
demonstraram atraso no processo de germinação. Após irradiação, a germinação dos conídios do isolado Bb 19 de *B. bassiana* foi verificada a cada 12 horas até completar 48 horas. Os conídios não apresentaram germinação após 12 horas de incubação e apresentaram apenas 9,5% de germinação comparado aos conídios não irradiados do grupo controle após 24 horas de incubação. Este valor aumentou para 15,9% após 36 horas e para 30% após 48 horas de incubação (Figura 3).

### 3.3 Tolerância dos isolados de *Beauveria* spp. e *E. albus* à UV-B.

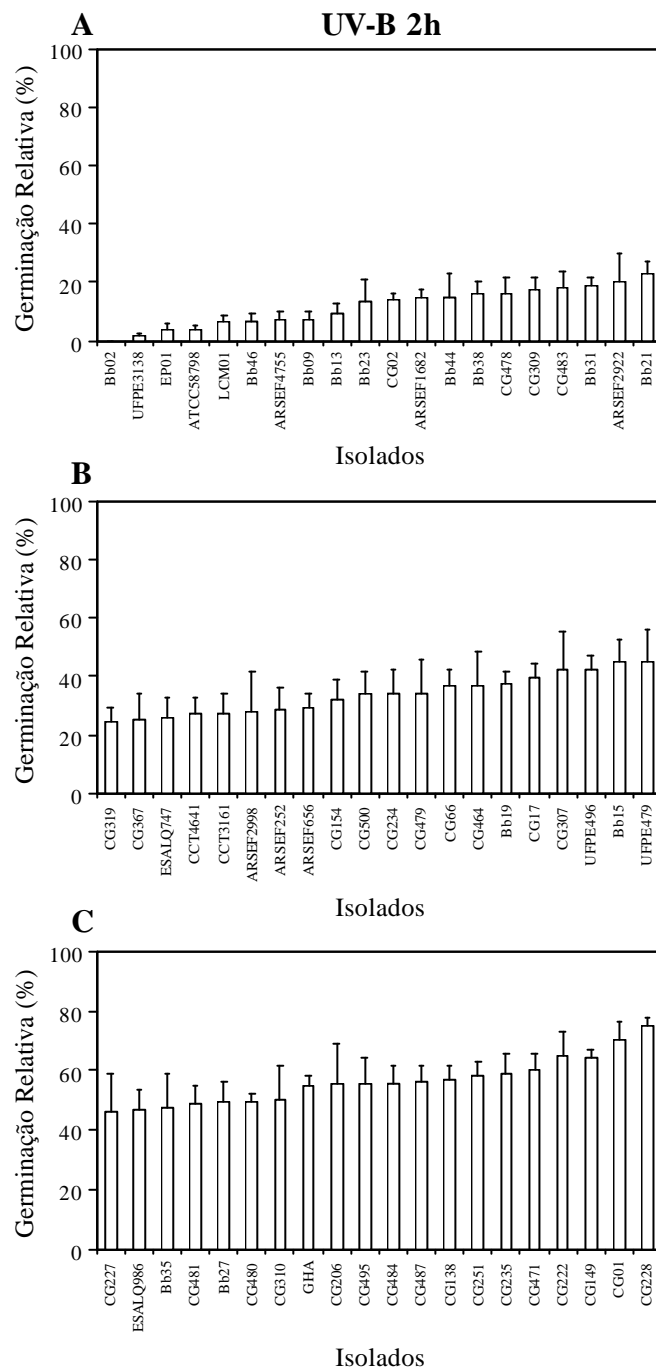
Uma alta variabilidade em tolerância à radiação ultravioleta foi notada entre os isolados de *B. bassiana*, variando de praticamente 0% de tolerância, como no isolado Bb 03, a quase 80% de tolerância como no CG 228. Isolados das demais espécies foram notadamente sensíveis ao UV-B, com o percentual médio de germinação variando de 1,6% (*E. albus* – UFPE 3138) a 29,1% (*B. amorpha* – ARSEF 656). A análise estatística computou 1770 pares de comparações à  $P < 0,0001$  e gerou grupos de muitos isolados com percentuais de germinação não diferindo significativamente entre si. Uma vez que o objetivo principal deste estudo baseia-se em selecionar isolados UV-B tolerantes, os resultados serão melhor apresentados se baseados somente na média e desvio padrão do percentual de germinação de cada isolado. Neste sentido, os isolados foram organizados lado a lado a partir daqueles de menor tolerância para os de maior tolerância média à radiação UV-B na Figura 4.

### 3.4 Correlação entre tolerância à radiação UV-B e a latitude de origem dos isolados de *B. bassiana*.

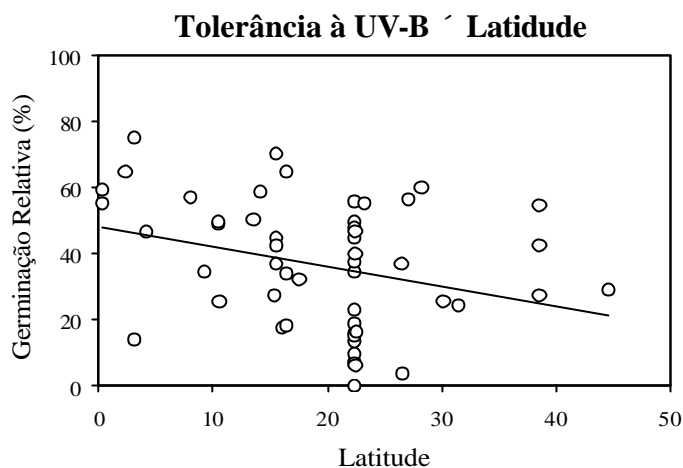
Isolados de *B. bassiana* originários de locais de latitude mais baixa tenderam a apresentar menor tolerância à radiação UV-B do que os isolados originários de latitudes mais elevadas ( $P < 0,0001$ ). O percentual médio de germinação relativa apresentou declínio proporcional a latitude desde a linha do equador até próximo aos 22° (Figura 5), no entanto, a mesma correlação não foi observada com os isolados originários de latitudes mais elevadas, possivelmente devido ao pequeno número de isolados obtidos dessas localidades. Uma análise similar baseada no hospedeiro de origem não indicou correlação alguma.



**Figura 3.** Germinação dos conídios do isolado Bb 19 de *Beauveria bassiana* após duas horas de exposição à radiação de  $978 \text{ mW m}^{-2}$  e dos conídios não expostos à radiação (Controle) e sua velocidade de germinação.



**Figura 4.** Tolerância dos isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) à radiação UV-B após duas horas de exposição à radiação de 978 mW m<sup>-2</sup>. Os isolados foram organizados a partir daqueles de menor tolerância para os de maior tolerância média à radiação UV-B.



**Figura 5.** Relação entre latitude de origem e a germinação média relativa dos 53 isolados de *Beauveria bassiana* após duas horas de exposição à radiação ultravioleta caracterizado por um modelo cumulativo generalizado ( $P < 0,0001$ ).

#### 4 DISCUSSÃO

O presente estudo revela uma considerável redução da germinação relativa e, em alguns casos, total inativação dos conídios de *Beauveria* após poucas horas de exposição à radiação ultravioleta em laboratório. Outra séria consequência da exposição à radiação ultravioleta foi um notável atraso na germinação dos conídios que permaneceram viáveis após a irradiação. O atraso na germinação já foi relatado em *M. anisopliae* (ZIMMERMANN, 1982; ALVES *et al.*, 1998; BRAGA *et al.*, 2001b, c), *M. anisopliae* var. *acridum* (MOORE *et al.*, 1993), *S. lanosoniveum* e *L. aphanocladii* (BRAGA *et al.*, 2002). Isto indica que os conídios viáveis necessitam de um longo período de tempo para se restabelecerem dos efeitos provocados pela radiação antes de prosseguirem o processo de germinação (BRAGA *et al.*, 2001c). O atraso na germinação pode ser atribuído à existência de diferentes instantes de pausa capazes de interromperem o ciclo celular logo assim que danos ao material genético e outras estruturas celulares são detectados (PETROCELLI; SLINGERLAND, 2000), e conforme revisado por Braga *et al.* (2001c), a duplicação de material genético defeituoso e a segregação de cromossomos fendidos são evitadas pela interrupção do ciclo celular e indução de sistema de reparação.

Uma grande variabilidade em tolerância à radiação UV-B foi observada entre os isolados de *B. bassiana*. Esses resultados estão de acordo com os observados por Fargues *et al.* (1996) por concluírem que após duas horas de exposição à simulação da luz solar, a sobrevivência dos conídios de *B. bassiana* variou de 0% a 100%. A exposição foi altamente prejudicial à sobrevivência dos conídios de *B. bassiana* e o tempo de exposição altamente significativo. Esses autores, no entanto, não observaram relação aparente entre origem geográfica dos isolados e tolerância à radiação UV-B. Por outro lado, os resultados do presente estudo indicam correlação inversa significativa entre o percentual de germinação relativa dos conídios expostos à radiação UV-B e a latitude de origem dos isolados. Esses achados sugerem que isolados de *B. bassiana*, assim como de *M. anisopliae* (BRAGA *et al.* (2001c), foram expostos à radiação UV-B em condições naturais e que uma seleção natural para adaptação à UV-B resultou na relação evidenciada entre a latitude de origem e resposta à irradiação. No entanto, variabilidade em tolerância à UV-B foi observada também em alguns

isolados de *B. bassiana* originários de latitudes muito próximas. Isto sugere que, além da latitude, outras variações interferem na exposição natural de isolados à radiação ultravioleta como, por exemplo, a altitude, variações diárias e sazonais na inclinação do sol, umidade e turbacão atmosférica (MADRONICH, 1993), habitat (BIDICHKA *et al.*, 2001) e nicho ecológico do inseto hospedeiro, podendo assim, constituir diferenças importantes em um microambiente favorecendo a seleção natural de isolados de *B. bassiana* tolerantes à radiação ultravioleta. Isto também sugere que isolados de *B. bassiana* podem adaptar-se à condições ambientais locais.

Diversos estudos têm relatado que conídios de coloração verde-escura de cepa tipo de *M. anisopliae* e *Aspergillus nidulans* são geralmente mais tolerantes à radiação ultravioleta do que os conídios mutantes de coloração branca (RANGEL *et al.*, 2006; AL-RUBEAI; EL-HASSI, 1986). Portanto, diferenças quanto à sensibilidade à radiação ultravioleta entre fungos têm sido atribuídas à pigmentação dos esporos, conforme revisto por Ayres *et al.* (1996). A pigmentação conidial é muito eficiente para proteção contra radiação ultravioleta por limitar a penetração e promover inativação de substâncias tóxicas induzidas pela radiação solar, especialmente os radicais livres induzidos por radiação UV-A (GEIS; SZANISZLO, 1984; WILL III *et al.*, 1987; KAWAMURA *et al.*, 1999). No entanto, conídios de alguns isolados de *B. bassiana* parecem ser tão tolerantes quanto os conídios de *M. anisopliae* estudados por Braga *et al.* (2001b, c). Outros estudos também têm revelado que conídios hialinos de *L. lanosoniveum* foram mais tolerantes ao UV-B do que conídios verdes de *Trichoderma* sp. (BRAGA *et al.*, 2002), além disso, conídios brancos de alguns isolados de *B. bassiana* foram mais tolerantes à radiação do que os conídios fortemente pigmentados de determinados isolados de *M. anisopliae* (FARGUES *et al.*, 1996). Isto pode ser indicativo de que certas espécies de fungo portadoras de pigmentos não visíveis 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 trehalose (RANGEL *et al.*, 2006).

Uma importante questão é que não só a virulência do patógeno, mas também a sobrevivência fora do hospedeiro e a capacidade de dispersão no ambiente são fatores cruciais para execução do biocontrole (BIDICHKA *et al.*, 2001). No entanto, após aplicação no campo o fungo estará exposto a condições ambientais que muito diferem daquelas encontradas por populações naturais (BRAGA *et al.*, 2001c) e isto provavelmente permitirá uma baixa persistência dos conídios no ambiente se expostos diretamente à radiação solar durante horas. Baseado nisso, alguns estudos têm buscado a seleção de isolados mais tolerantes (MORLEY-DAVIES *et al.*, 1996; FARGUES *et al.*, 1996) e formulações capazes de intensificar a tolerância dos conídios à radiação ultravioleta (MOORE *et al.*, 1993; INGLIS *et al.*, 1995; LELAND; BEHLE, 2005).

Baseado nos resultados deste estudo, CG 471, CG 222, CG 149, CG 01 e CG 229 foram os cinco isolados mais tolerantes ao UV-B. São todos isolados de *B. bassiana* com grande potencial de eficácia para estudos do controle biológico de artrópodes sob condições a campo. Por outro lado, estudos devem também selecionar dentre os isolados com maior tolerância aos fatores abióticos naturais, aqueles com maior patogenicidade sobre o artrópode alvo. Portanto, os isolados testados neste estudo serão também avaliados quanto ao potencial patogênico sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Acari, Ixodidae).

## **CAPÍTULO V**

### **AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Beauveria* spp. SOBRE LARVAS DE *Boophilus microplus***



## RESUMO

O controle do carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) representa grande importância para a pecuária brasileira. Baseado nisso, o presente estudo avaliou a virulência de 60 isolados, incluindo cinco espécies de *Beauveria* e um isolado de *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*), originários de diversas regiões geográficas, artrópodes hospedeiros ou substratos. Em um primeiro bioensaio todos os 60 isolados de *Beauveria* spp. e *E. albus* foram testados quanto o potencial virulento sobre larvas de *B. microplus*. Em seguida, cinco isolados de *B. bassiana* foram escolhidos baseados nos resultados obtidos no primeiro bioensaio, e foram testados novamente em um segundo bioensaio com larvas de *B. microplus* provenientes de uma outra população. No primeiro bioensaio, os isolados estudados apresentaram grande variabilidade quanto a virulência. Os isolados mais virulentos foram os de *B. bassiana*, CG206 e CG464, os quais promoveram percentual médio de mortalidade das larvas superior a 90%. Em contrapartida, os isolados UFPE 479, UFPE 496 e CG 234 também de *B. bassiana* não promoveram mortalidade das larvas de *B. microplus*. O isolado de *E. albus* e os isolados das demais espécies de *Beauveria* apresentaram baixo potencial virulento sobre as larvas, no entanto, o isolado ARSEF 4755 de *B. amorpha* foi uma exceção promovendo um percentual médio de mortalidade de 60%. No segundo bioensaio, os cinco isolados de *B. bassiana* (Bb 23, Bb 44, ESALQ 986, ESALQ 747 e CG 480) promoveram elevados percentuais de mortalidade e em menor tempo que o observado no primeiro bioensaio. Dessa forma, o presente estudo permitiu selecionar isolados de *B. bassiana* com maior potencial virulento sobre larvas de *B. microplus*. Além disso, os resultados indicam que diferentes populações desta espécie de carrapato podem manifestar diferentes níveis de suscetibilidade à infecção por *B. bassiana*. Neste caso, não só as condições genéticas e fisiológicas de determinado isolado fúngico, mas também a suscetibilidade dos indivíduos de uma população podem interferir na eficácia do biocontrole de determinada população do carrapato *B. microplus*.

**Palavras-chave:** *Beauveria bassiana*; *Beauveria* spp.; *Engyodontium albus*; virulência; *Boophilus microplus*; controle biológico.

## ABSTRACT

The control of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) is cause for concern to Brazilian cattle-raising industry. Therefore, the present study has aimed at evaluating the virulence of 60 isolates, including five species of *Beauveria* and one species of *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*), originated from various geographic regions, arthropods hosts or substrates. In the first bioassay all 60 isolates of *Beauveria* spp. and *E. albus* were evaluated toward *B. microplus* larvae. Afterwards, five isolates of *B. bassiana* were chosen to be re-tested in a second bioassay with *B. microplus* larvae originated from another population. In the first bioassay, the isolates presented great variability in virulence. The most virulent isolates were those of *B. bassiana*, CG206 and CG464, which increased the mean mortality of larvae by more than 90%. On the other hand, the isolates UFPE 479, UFPE 496 and CG 234 of *B. bassiana* did not cause any mortality of *B. microplus* larvae. The isolate *E. albus* and those isolates of other *Beauveria* species presented low virulence potential toward *B. microplus* larvae; however the isolate ARSEF 4755 of *B. amorpha* was an exception and caused mean mortality around 60%. In the second bioassay, all five isolates of *B. bassiana* (Bb 23, Bb 44, ESALQ 986, ESALQ 747 and CG 480) increased mean mortality faster than it was observed in the first bioassay. Therefore, the present study has selected isolates of *B. bassiana* with major virulent potential toward *B. microplus* larvae. Furthermore, the results indicate that different populations of this tick species may present different levels of susceptibility to *B. bassiana* infection. Thus, not only the genetic and physiologic conditions of an entomopathogenic isolate, but also the susceptibility of *B. microplus* population may represent a variable to the biological control efficacy.

**Key words :** *Beauveria bassiana*; *Beauveria* spp.; *Engyodontium albus*; virulence; *Boophilus microplus*; biological control.

## 1 INTRODUÇÃO

O controle do carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) representa grande importância para a pecuária brasileira. Neste contexto o controle microbiano vem se destacando e demonstrando ser um método promissor de combate a *B. microplus* e a diversas outras espécies de carrapatos em todo o mundo.

Neste sentido, a utilização de fungos entomopatogênicos tem demonstrado resultados satisfatórios para o controle dos diferentes estádios de *B. microplus* (BITTENCOURT *et al.*, 1994, 1996, 1997; PAIÃO *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2003, 2004, 2006), *B. annulatus* (GINDIN *et al.*, 2001), *Rhipicephalus appendiculatus* e *Amblyomma variegatum* (KAAYA *et al.*, 1996; KAAYA; HASSAN, 2000), *Amblyomma cajennense* (SOUZA *et al.*, 1999; REIS *et al.*, 2001), *Anocentor nitens* (CARNEIRO *et al.*, 1999; MONTEIRO *et al.*, 2003), *R. sanguineus*, *Dermacentor variabilis* e *Ixodes scapularis* (KIRKLAND *et al.*, 2004).

Os fungos entomopatogênicos constituem um grupo de patógenos de insetos em que a ingestão pelo hospedeiro não é um pré-requisito para que a infecção ocorra já que esta é resultante da penetração direta através da cutícula (BITTENCOURT *et al.*, 1995; KAAYA *et al.* 1996). É esta habilidade que torna os fungos entomopatogênicos vantajosos agentes de biocontrole de carrapatos.

*Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são as espécies de fungo entomopatogênico mais utilizadas no controle biológico de diversos artrópodes praga na agricultura em várias partes do mundo (ROBERTS; CAMPBELL, 1977). Essas espécies são também as mais estudadas para o controle de carrapatos, no entanto poucos programas de biocontrole têm sido desenvolvidos para estes artrópodes e assim, seu controle tem sido realizado quase que exclusivamente através da aplicação de acaricidas químicos.

Existem numerosos patógenos e predadores naturais de carrapatos permitindo que o controle biológico ocorra naturalmente no meio ambiente. No entanto, os inimigos naturais dos carrapatos não são eficientes no biocontrole porque seus parasitas e predadores são notadamente menos abundantes do que o necessário para responder ao aumento expansivo das populações de carrapatos (SAMISH; REHACEK, 1999).

Neste sentido, o início e o desenvolvimento de uma epizootia estão na dependência de diversos fatores primários, como a população do patógeno (virulência, infectividade e potencial de inóculo), vias de disseminação e suscetibilidade da população de um organismo a esse entomopatógeno. Assim, a ocorrência das doenças é um processo bastante dinâmico e complexo, pois estes fatores estão ainda na dependência de outros, bióticos e abióticos que estão presentes no ambiente (OMOTO; ALVES, 1998).

Baseado nisso, o presente estudo avaliou a virulência de 60 isolados, incluindo cinco espécies de *Beauveria* e um isolado de *Engyodontium album* (= *Beauveria alba*), originários de diversas regiões geográficas, artrópodes hospedeiros ou substratos. A execução de bioensaios buscou selecionar isolados de entomopatógenos com maior potencial virulento sobre larvas de *B. microplus*, selecionando neste sentido isolados com maior potencial de atuação em programas de controle microbiano desta espécie de carrapato. Além disso, o presente estudo buscou investigar a suscetibilidade à infecção por *B. bassiana* em *B. microplus* provenientes de diferentes populações.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local e período de execução dos experimentos.

Os bioensaios foram desenvolvidos no período de abril a agosto de 2006 no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária, localizado na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

### 2.2 Isolados estudados.

Cinquenta e três isolados de *B. bassiana* e sete isolados de outras espécies foram estudadas. Os isolados são originários de diversas regiões geográficas brasileiras e estrangeiras e de diferentes hospedeiros ou substratos. Essas informações estão disponíveis na Tabela 1.

### 2.3 Obtenção das larvas de *B. microplus*.

Fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* foram coletadas diretamente de bovinos naturalmente infestados. Os animais eram provenientes da Bovinocultura de Leite da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro ou de uma propriedade particular localizada também em Seropédica às margens da Rodovia Presidente Dutra, Km 201.

Após a coleta, as fêmeas ingurgitadas eram levadas para o laboratório, lavadas em água corrente e em seguida imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1% durante cinco minutos. Posteriormente, eram enxaguadas em água destilada estéril e secas em papel toalha estéril. Este procedimento proporcionava a antissepsia da cutícula.

Os espécimes de *B. microplus* eram selecionados e identificados segundo Aragão e Fonseca (1961), acondicionadas em placas de Petri (100 × 15 mm, Fisherbrand) em número não superior a 20 por placa e devidamente identificadas com espécie, data de coleta e procedência. As placas eram então incubadas a  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa superior a 80% permitindo condições favoráveis para a postura.

Dez dias após o início da postura os ovos foram pesados, divididos em alíquotas de 50mg e colocados em seringas de 20 ml cortadas transversalmente na extremidade oposta a entrada do êmbolo, e vedadas com algodão hidrófilo. Os ovos foram então mantidos incubados sob as mesmas condições de temperatura e umidade relativa.

Após ser observada a eclosão total das larvas, os tubos foram ainda mantidos incubados por mais 15 dias para permitir o endurecimento da cutícula das larvas tornando-as aptas para a infestação. Após esse período, essas larvas foram utilizadas para infestação artificial de bezerros mantidos estabulados na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz. Completo o ciclo parasitário, ou seja, 21 dias após infestação as fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* foram coletadas diariamente do chão dos estábulos e também diretamente do corpo dos animais. A infestação artificial foi realizada para que fossem obtidas larvas de *B. microplus* sabidamente isentas de tratamento químico, permitindo assim maior confiabilidade aos resultados.

Adquiridas as fêmeas, estas eram levadas ao laboratório para antissepsia das cutículas e incubadas para postura conforme descrito anteriormente. Nesta ocasião, os ovos foram pesados, divididos em alíquota de 50 mg e colocados em tubos de ensaio (Pirex®, NY) medindo 15 × 100 mm e vedados com algodão hidrófilo. Os ovos foram incubados e dez dias após o término da eclosão das larvas era realizado o bioensaio. Os tubos que não

**Tabela 1.** Isolados de *Beauveria bassiana* e outgroup com isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium album* (= *Beauveria alba*), seus hospedeiros ou substratos, regiões geográficas de origem, ano de isolamento e coleção de cultura procedente (continua).

<b>Isolados de <i>Beauveria</i> agrupados de acordo com hospedeiro / substrato de origem</b>				
<b>#</b>	<b>Isolado*</b>	<b>Hospedeiro, Substrato</b>	<b>Origem</b>	<b>Ano</b>
<i>Beauveria bassiana</i>				
01	Bb 02	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
02	Bb 09	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
03	Bb 13	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
04	Bb 15	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
05	Bb 19	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
06	Bb 21	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
07	Bb 23	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
08	Bb 27	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
09	Bb 31	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
10	Bb 35	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
11	Bb 38	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
12	Bb 44	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
13	Bb 46	(Acari: Ixodidae)	Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil	1999
14	LCM 01	(Acari: Ixodidae)	Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil	2002
15	ESALQ 986	(Acari: Ixodidae)	Piracicaba, São Paulo, Brasil	1990
16	CG 66	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Brasília, Distrito Federal, Brasil	1988
17	CG 222	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Costa do Surubim, Amazonas, Brasil	1981
18	CG 227	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Pacajus, Ceará, Brasil	1982
19	CG 228	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Manaus, Amazonas, Brasil	1991
20	CG 319	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil	1990
21	CG 464	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Francisco Beltrão, Paraná, Brasil	1984
22	CG 481	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Ribeira do Pombal, Bahia, Brasil	1985
23	CG 484	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Ponta Porã, Mato Grosso do Sul, Brasil	1983
24	CG 495	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Londrina, Paraná, Brasil	1987
25	CG 500	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Goiânia, Goiás, Brasil	1985
26	ARSEF 252	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Orono, Maine, Estados Unidos	1978
27	GHA	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Montana, Estados Unidos	1980
28	CG 02	(Coleoptera: Curculionidae)	Manaus, Amazonas, Brasil	1988
29	CG 138	(Coleoptera: Curculionidae)	Recife, Pernambuco, Brasil	1989
30	CG 367	(Coleoptera: Curculionidae)	Aracaju, Sergipe, Brasil	1991
31	CG 471	(Coleoptera: Curculionidae)	Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil	1984
32	CG 478	(Coleoptera: Curculionidae)	Campinas, São Paulo, Brasil	1983
33	CG 483	(Coleoptera: Curculionidae)	Goiânia, Goiás, Brasil	1982
34	EP 01	(Coleoptera: Curculionidae)	Itajaí, Santa Catarina, Brasil	1989
35	CG 17	(Coleoptera: Scolytidae)	Piracicaba, São Paulo, Brasil	1988
36	UFPE 496	(Coleoptera: Scolytidae)	Estados Unidos	1955
37	CG 01	(Homoptera: Cercopidae)	Brasília, Distrito Federal, Brasil	1984
38	CG 149	(Homoptera: Cercopidae)	Goiânia, Goiás, Brasil	1982
39	CG 154	(Homoptera: Cercopidae)	Jataí, Goiás, Brasil	1983
40	CG 234	(Homoptera: Cicadellidae)	Ponta Porã, Mato Grosso do Sul, Brasil	1983
41	CG 206	(Hymenoptera: Vespidae)	Costa do Arapapa, Amazonas, Brasil	1981
42	CG 235	(Hymenoptera: Vespidae)	Costa do Arapapa, Amazonas, Brasil	1981
43	CG 479	(Hymenoptera: Vespidae)	Santana do Ipanema, Alagoas, Brasil	1985
44	ESALQ 747	(Hymenoptera: Formicidae)	Belém Novo, Rio Grande do Sul, Brasil	1988
45	CCT 4641	(Hymenoptera: Formicidae)	Cuiabá, Mato Grosso, Brasil	1988
46	CG 251	(Hymenoptera: Formicidae)	Colinas do Sul, Goiás, Brasil	1991
47	CG 480	(Hymenoptera: Formicidae)	Ribeira do Pombal, Bahia, Brasil	1985
48	CG 487	(Hymenoptera: Apoidea)	São Carlos, Santa Catarina, Brasil	1984

**Tabela 1.** Continuação.

#	Isolado*	Hospedeiro, Substrato	Origem	Ano
49	UFPE 479	(Lepidoptera: Bombycidae)	Brasil	1955
50	CG 307	Solo	Goiás, Brasil	1990
51	CG 309	Solo	Salto da Divisa, Minas Gerais, Brasil	1990
52	CG 310	Solo	Jequié, Bahia, Brasil	1990
53	CCT 3161	Contaminante de Laboratório	Estados Unidos	1970
OUT GROUP				
#	Isolado*	Hospedeiro, Substrato	Origem	Ano
<i>Beauveria amorpha</i>				
54	ARSEF 656	(Homoptera: Cicadellidae)	Hunan, China	1981
55	ARSEF 1682	(Coleoptera: Scarabaeidae)	Nagano Prefecture, Japão	1980
56	ARSEF 4755	Solo	Bruny Island, Tasmânia, Austrália	1988
<i>Beauveria brongiartii</i>				
57	ATCC 58798	(Diptera: Tipulidae)	Czechoslovakia	?
<i>Beauveria velata</i>				
58	ARSEF 2998	(Lepidoptera)	Equador	1990
<i>Beauveria vermiconia</i>				
59	ARSEF 2922	Cinza vulânica	Valdivia, Los Lagos, Chile	1974
<i>Engyodontium albus (=Beauveria alba)</i>				
60	UFPE 3138	Solo marinho	Pernambuco, Brasil	1989

\* Coleção de Culturas: **Bb** = Laboratório de Coleção de Cultura de Fungos – Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Brasil; **LCM** = Laboratório de Controle Microbiano - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Brasil; **ESALQ** = Departamento de Entomologia - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ / USP, Brasil; **CG** = Centro Nacional de Recursos Genéticos - CENARGEN / EMBRAPA, Brasil; **ARSEF** = ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures - ARSEF / USDA, Estados Unidos; **EP** = Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A. – EPAGRI, Brasil; **UFPE** = Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Brasil; **CCT** = Coleção de Culturas Tropicais André Tosello, Brasil; **GHA** = Isolado comercializado por Emerald Bioagriculture Corporation, MYCOTROL ES<sup>®</sup>, EPA 070810-00006, Estados Unidos; **ATCC** = American Type Culture Collection, Estados Unidos, USA.

apresentaram eclosão total das larvas foram descartados permitindo assegurar que em cada tubo de ensaio havia aproximadamente mil larvas de *B. microplus*.

#### 2.4 Preparo das suspensões e viabilidade dos conídios.

Os isolados de *Beauveria* spp. e *E. albus* foram cultivados em 23 ml de meio batata dextrose ágar (Difco Laboratories, Detroit, MI) suplementado com 1g  $\Gamma^{-1}$  de extrato de levedura (Technical, Difco) (PDAY) em placas de Petri (100 × 15 mm, Fisherbrand) mantidas em ausência de luz a 25 °C por 15 dias. Após esse período, os conídios de cada isolado foram colhidos em separado com auxílio de uma espátula e suspensos em uma solução estéril de Tween 80 (0,01% v/v) (LUZ *et al.*, 1998).

Obtida a suspensão, uma amostra foi quantificada em hematocítômetro ao microscópio óptico. Dessa forma, foi preparada para cada isolado uma suspensão ajustada à concentração de  $1,0 \times 10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ . As demais concentrações de  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  foram obtidas a partir de uma diluição seriada, adicionando 2 ml da suspensão mais concentrada em 18 ml de solução estéril de Tween 80 a 0,01%.

A viabilidade dos conídios foi aferida transferindo-se uma amostra de 0,1 ml da suspensão de  $10^5$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  de cada isolado para placas contendo meio de cultura batata dextrose ágar e espalhando-a com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a  $25 \pm 1$  °C e umidade relativa  $\geq 80\%$  durante 24 horas. Após este período, a

germinação dos conídios foi observada utilizando microscópio óptico com magnitude de 400 ×. Um número mínimo de 300 conídios por placa foi avaliado e o percentual de conídios viáveis foi calculado através da divisão do número de conídios germinados pelo número total de conídios contados (ALVES, 1998).

## **2.5 Infecção *in vitro* de larvas de *Boophilus microplus*.**

Os bioensaios foram constituídos por quatro grupos de tratamento ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) sendo cada um destes grupos formado por dez tubos de ensaio, cada um contendo aproximadamente mil larvas. Cada tubo recebeu 1 ml da suspensão de conídios, sendo as larvas mantidas imersas durante o período de um minuto. Após esse tempo, o excesso da suspensão foi eliminado através da inversão do tubo de ensaio e absorção pelo algodão que vedava o mesmo. Cada um destes tubos foi identificado com a concentração e o isolado do fungo inoculado.

Para cada dez isolados testados foram formados dois grupos controle, um positivo e um negativo, também com dez repetições. No grupo controle positivo, seguiu-se o mesmo método de inoculação, no entanto, cada tubo de ensaio contendo larvas recebeu 1 ml de solução estéril de Tween 80 a 0,01%. O grupo controle negativo não recebeu nenhum tipo de tratamento.

Após tratamento, os tubos de ensaio foram mantidos incubados a  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa superior a 80%. A avaliação do efeito da infecção dos diferentes isolados de *Beauveria* spp. e *E. albus* sobre as larvas de *B. microplus* foi feita através da observação ao microscópio estereoscópio da estimativa do percentual de mortalidade das larvas a cada 5 dias após inoculação das suspensões. Esta metodologia foi baseada nos estudos de Grillo Torrado e Gutierrez (1969) e Bittencourt *et al.* (1996).

Em um primeiro bioensaio todos os 60 isolados de *Beauveria* spp. e *E. albus* foram testados. Em seguida, o experimento foi repetido na íntegra utilizando-se a mesma metodologia e novos lotes de conídios de cada isolado. Posteriormente, cinco isolados de *B. bassiana* foram escolhidos baseados nos resultados obtidos no primeiro bioensaio, e foram testados novamente em um segundo bioensaio. Também foi realizada uma segunda repetição deste experimento utilizando-se a mesma metodologia e novos lotes de conídios de cada isolado.

Importante notar que foram utilizadas nos bioensaios larvas provenientes de diferentes populações de *B. microplus*. Neste sentido, as infestações artificiais conduzidas para adquirir larvas de *B. microplus* para o primeiro bioensaio foram realizadas utilizando larvas provenientes de fêmeas ingurgitadas coletadas na Bovinocultura de Leite da UFRRJ. No entanto, nas infestações para adquirir larvas para o segundo bioensaio foram utilizadas larvas provenientes das fêmeas ingurgitadas coletadas em propriedade particular em Seropédica.

## **2.6 Isolamento dos fungos após bioensaios.**

Após a realização dos bioensaios, uma amostra de larvas dos grupos controle e outra de larvas mortas dos grupos tratamento dos diferentes isolados testados foi retirada dos respectivos recipientes e transferida para placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar. As placas de Petri foram devidamente identificadas e mantidas incubadas a  $25 \pm 1$  °C e UR  $\geq 80\%$ .

Após a observação do desenvolvimento fúngico, as colônias foram avaliadas quanto aos aspectos macromorfológicos, e as características micromorfológicas foram observadas sob microscópio óptico em fragmentos da colônia entre lâmina e lamínula, juntamente com uma gota do corante Lactofenol de Amann com Azul de Algodão (HAWKSWORTH, 1977).

## 2.7 Análise estatística e próbites

Para o estudo estatístico foi aplicada a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis devido os resultados obtidos tratarem-se de uma variável discreta e sua avaliação ser de caráter qualitativo. Este teste foi seguido do teste SNK (Student-Newman-Keuls) para comparação entre as ordenações médias e verificar entre quais tratamentos houve diferença significativa, com níveis de significância menor que 5% ( $P < 0,05$ ) (SAMPAIO, 2002).

O cálculo matemático das concentrações letais,  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  e seus respectivos intervalos de confiança, foram feitos pelo método de análise de próbites segundo FINNEY (1971), e os cálculos foram realizados com auxílio do programa “Probit or Logit Analysis”.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Viabilidade dos conídios.

A viabilidade dos conídios nas suspensões variou entre 97 e 100% garantindo que as suspensões apresentavam conídios capazes de causar infecção. Além disso, esses dados revelam que as suspensões de conídios utilizadas nos bioensaios apresentavam-se padronizadas, permitindo condições igualitárias de atuação para os diferentes isolados testados em ambos os bioensaios.

### 3.2 Virulência dos isolados sobre larvas de *Boophilus microplus*.

No primeiro bioensaio, os isolados estudados apresentaram grande variabilidade quanto a virulência sobre larvas de *B. microplus*. Em geral, em todos os grupos de tratamento o percentual de mortalidade das larvas aconteceu de forma diretamente proporcional a concentração de conídios utilizada. Neste sentido, quanto maior a concentração de conídios na suspensão, maior foi o percentual de mortalidade das larvas de *B. microplus* (Tabela 2). Os grupos controle positivo e negativo não apresentaram mortalidade das larvas, garantido a confiabilidade dos resultados obtidos.

O percentual médio de mortalidade das larvas variou de 0% a quase 100% quando expostos a suspensão de maior concentração de conídios em 30 dias após tratamento. Os isolados mais virulentos foram os de *B. bassiana*, CG206 e CG464, os quais promoveram percentual médio de mortalidade das larvas superior a 90%. Em contrapartida, os isolados UFPE 479, UFPE 496 e CG 234 também de *B. bassiana* não promoveram mortalidade das larvas de *B. microplus*. O isolado de *E. albus* e os isolados das demais espécies de *Beauveria* apresentaram baixo potencial virulento sobre larvas de *B. microplus*, no entanto, o isolado ARSEF 4755 de *B. amorpha* foi uma exceção promovendo um percentual médio de mortalidade de 60% das larvas (Figura 1).

Uma análise comparativa da virulência dos isolados também pode ser feita através da avaliação das Concentrações Letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ) obtidas no primeiro bioensaio 30 dias após tratamento (Tabela 3).

No segundo bioensaio, os cinco isolados de *B. bassiana* (Bb 23, Bb 44, ESALQ 986, ESALQ 747 e CG 480) promoveram elevados percentuais de mortalidade e em menor tempo que o observado no primeiro bioensaio ( $P < 0,05$ ) (Figuras 2, 3, 4, 5 e 6). Foi observado que o percentual de mortalidade das larvas ocorreu de forma diretamente proporcional a concentração de conídios nas suspensões e não foi observado mortalidade de larvas nos grupos controle mesmo aos 30 dias após tratamento. Também as Concentrações Letais ( $CL_{50}$



**Tabela 2** Percentual médio de mortalidade das larvas de *Boophilus microplus* obtido no primeiro bioensaio 30 dias após exposição aos diferentes isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium album* (= *Beauveria alba*) ( $P < 0,05$ ). Experimento realizado sob condições controladas de  $27 \pm 1$  °C e Umidade Relativa superior a 80% (continua).

<b>Percentual médio de mortalidade das larvas de <i>Boophilus microplus</i></b>						
#	Isolado*	Controle	10 <sup>5</sup> *	10 <sup>6</sup> *	10 <sup>7</sup> *	10 <sup>8</sup> *
<i>Beauveria bassiana</i>						
01	Bb 02	0,0 a	3,0 a	14,5 b	41,3 c	26,6 c
02	Bb 09	0,0 a	0,3 a	1,3 a	22,8 b	24,8 b
03	Bb 13	0,0 a	0,0 a	3,4 b	12,6 c	9,2 c
04	Bb 15	0,0 a	1,0 a	1,8 ab	7,5 b	17,5 c
05	Bb 19	0,0 a	4,5 b	6,0 b	25,0 c	25,0 c
06	Bb 21	0,0 a	3,5 b	9,8 c	10,5 cd	45,0 d
07	Bb 23	0,0 a	0,8 a	2,0 ab	11,3 b	8,8 b
08	Bb 27	0,0 a	0,0 a	0,5 a	5,3 b	6,8 b
09	Bb 31	0,0 a	4,8 b	6,5 b	16,0 c	34,3 c
10	Bb 35	0,0 a	0,0 a	6,0 b	6,0 b	9,0 b
11	Bb 38	0,0 a	1,3 a	5,8 b	24,0 c	25,0 c
12	Bb 44	0,0 a	13,0 b	16,5 bc	23,9 cd	36,8 d
13	Bb 46	0,0 a	8,8 b	12,0 bc	18,0 c	58,4 d
14	LCM 01	0,0 a	6,8 b	13,0 b	42,1 c	48,8 c
15	ESALQ 986	0,0 a	12,3 b	12,8 b	17,3 b	58,5 c
16	CG 66	0,0 a	0,0 a	3,3 b	6,8 b	21,3 c
17	CG 222	0,0 a	3,8 b	4,5 b	12,8 c	40,3 d
18	CG 227	0,0 a	5,8 b	8,9 bc	13,8 c	46,1 d
19	CG 228	0,0 a	1,5 ab	3,5 b	13,0 c	38,8 d
20	CG 319	0,0 a	8,5 b	23,3 b	60,0 c	70,8 c
21	CG 464	0,0 a	13,5 b	32,5 c	56,5 cd	95,0 d
22	CG 481	0,0 a	17,5 b	29,0 bc	44,0 c	56,0 c
23	CG 484	0,0 a	11,8 b	21,6 bc	34,7 cd	50,0 d
24	CG 495	0,0 a	1,8 ab	4,8 b	18,3 c	50,8 c
25	CG 500	0,0 a	31,8 b	35,3 bc	61,0 cd	69,3 d
26	ARSEF 252	0,0 a	3,5 b	4,0 b	17,0 c	22,0 c
27	GHA	0,0 a	2,0 a	4,5 a	25,0 b	23,5 b
28	CG 02	0,0 a	8,9 b	15,5 bc	22,0 cd	30,3 d
29	CG 138	0,0 a	3,0 ab	13,0 bc	31,0 cd	74,0 d
30	CG 367	0,0 a	0,0 a	4,0 b	20,8 c	30,0 c
31	CG 471	0,0 a	2,5 ab	6,0 b	18,8 c	75,8 d
32	CG 478	0,0 a	11,8 b	17,8 b	47,5 c	78,8 d
33	CG 483	0,0 a	4,8 b	10,3 b	27,1 c	41,6 c
34	EP 01	0,0 a	15,5 b	19,3 b	40,8 c	65,6 c
35	CG 17	0,0 a	5,5 ab	17,4 b	35,8 c	56,0 c
36	UFPE 496	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
37	CG 01	0,0 a	6,1 b	6,8 b	7,0 b	10,0 b
38	CG 149	0,0 a	4,0 b	4,3 b	6,8 b	21,9 c
39	CG 154	0,0 a	2,0 ab	2,0 ab	7,0 bc	26,0 c
40	CG 234	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,5 a
41	CG 206	0,0 a	4,0 ab	14,0 bc	60,0 cd	93,0 d
42	CG 235	0,0 a	4,5 ab	16,0 bc	30,0 c	50,6 c
43	CG 479	0,0 a	1,0 a	2,5 ab	6,5 b	12,3 b
44	ESALQ 747	0,0 a	1,0 ab	1,7 abc	3,5 bc	4,75 c
45	CCT 4641	0,0 a	2,0 ab	2,0 ab	5,0 bc	13,9 d
46	CG 251	0,0 a	2,5 b	7,8 b	19,0 b	20,0 b
47	CG 480	0,0 a	1,3 a	0,8 a	5,0 b	13,5 c
48	CG 487	0,0 a	3,8 b	6,3 b	36,8 c	51,3 c
49	UFPE 479	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a

**Tabela 2.** Continuação.

#	Isolado*	Controle	10 <sup>5*</sup>	10 <sup>6*</sup>	10 <sup>7*</sup>	10 <sup>8*</sup>
50	CG 307	0,0 a	2,5 a	8,5 b	19,4 c	55,0 c
51	CG 309	0,0 a	1,0 a	12,0 b	18,0 bc	58,2 c
52	CG 310	0,0 a	1,5 a	1,8 a	10,7 b	29,0 b
53	CCT 3161	0,0 a	2,0 ab	2,3 ab	5,3 bc	8,8 c
<i>Beauveria amorphha</i>						
54	ARSEF 656	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,8 a	1,3 a
55	ARSEF 1682	0,0 a	0,0 a	1,0 a	2,3 ab	9,3 b
56	ARSEF 4755	0,0 a	18,0 b	28,9 b	66,0 c	64,7 c
<i>Beauveria brongniartii</i>						
57	ATCC 58798	0,0 a	0,0 a	0,0 a	1,5 a	3,5 a
<i>Beauveria velata</i>						
58	ARSEF 2998	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	9,2 b
<i>Beauveria vermiconia</i>						
59	ARSEF 2922	0,0 a	2,8 b	6,0 c	8,6 cd	10,0 d
<i>Engyodontium albus (=Beauveria alba)</i>						
60	UFPE 3138	0,0 a	0,0 a	1,3 ab	2,5 bc	3,5 c

Médias seguidas de mesma letra em uma mesma linha não diferem estatisticamente entre si a  $P < 0,05$ .

\* Concentração da suspensão em conídios ml<sup>-1</sup>.

e CL<sub>90</sub>) (Tabela 4) apresentaram já aos 10 dias após tratamento, valores inferiores aos observados 30 dias após tratamento no primeiro bioensaio.

O isolado ESALQ 986 promoveu 58,5 % de mortalidade média das larvas 30 dias após o tratamento no primeiro bioensaio. No segundo bioensaio a mortalidade das larvas atingiu este percentual em apenas 10 dias de infecção e atingiu os 97% aos 30 dias.

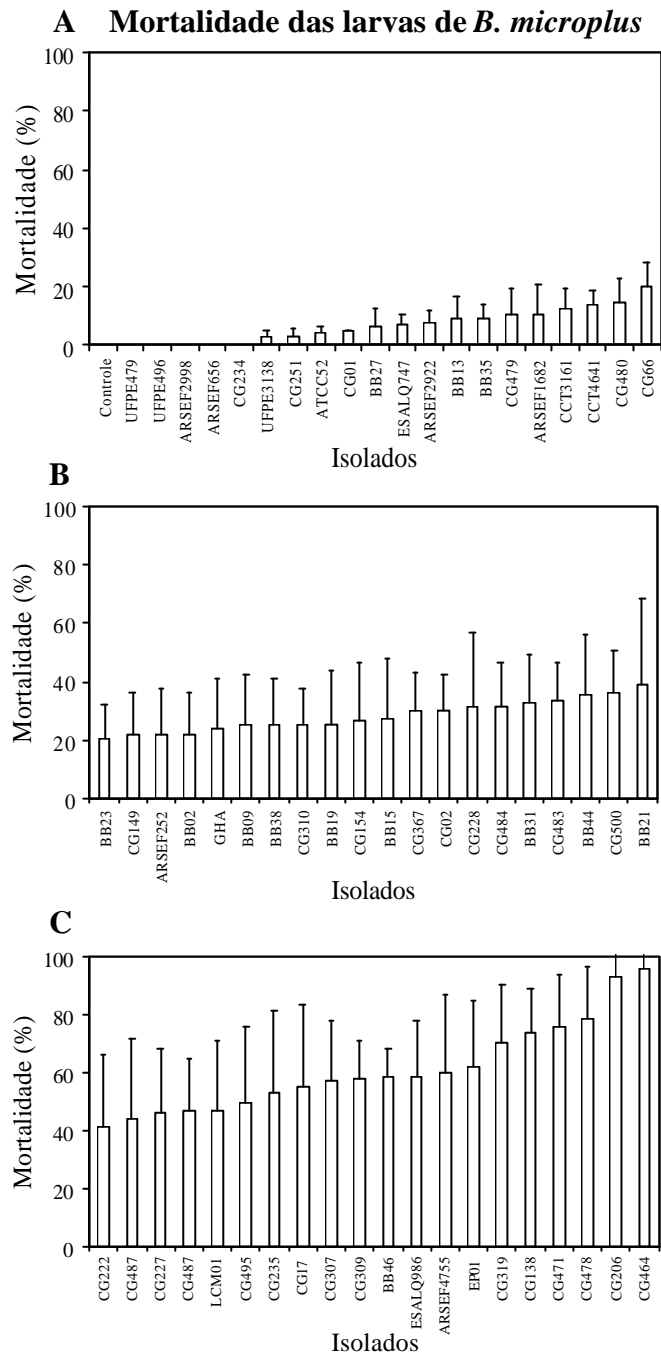
Os isolados Bb 44 e ESALQ 747 promoveram baixos percentuais de mortalidade no trigésimo dia após tratamento no primeiro bioensaio, e promoveram mortalidade similar aos 10 dias após tratamento no segundo bioensaio (36,8% e 5%, e 30% e 36% respectivamente). No segundo bioensaio estes isolados promoveram 100% de mortalidade das larvas aos 30 dias após tratamento.

Os isolados Bb 23 e CG 480 também promoveram no primeiro bioensaio baixos percentuais de mortalidade das larvas 30 dias após tratamento, no entanto promoveram elevados percentuais ainda no décimo dia após tratamento no segundo bioensaio. Os percentuais de mortalidade no segundo bioensaio atingiram praticamente 100% no vigésimo dia após tratamento.

### 3.3 Isolamento dos fungos após bioensaios.

Foi observado desenvolvimento de micélio fúngico sobre a cutícula das larvas mortas ao término do bioensaio. Também foi verificado o desenvolvimento de colônias fúngicas sobre o meio de cultura nos locais onde foram depositadas amostras de larvas mortas após realização dos bioensaios. Estas colônias foram identificadas macro e micromorfológicamente como as devidas espécies de fungo utilizadas nos bioensaios.

Uma amostra de larvas dos grupos controle positivo e negativo que também foi transferida para meios de cultura, foi mantida durante o mesmo período de tempo e sob as mesmas condições de temperatura e umidade que as demais, no entanto, não foi observado desenvolvimento de colônias fúngicas sobre o artrópode ou sobre o meio.



**Figura 1.** Percentuais de mortalidade das larvas de *Boophilus microplus* obtidos no primeiro bioensaio 30 dias após exposição a  $1,0 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  dos diferentes isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*). Experimento realizado sob condições controladas de  $27 \pm 1$  °C e Umidade Relativa superior a 80%. O desvio padrão foi baseado nos resultados obtidos no ensaio e na sua respectiva repetição.

**Tabela 3** Concentração letal (CL50 e CL90) dos diferentes isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium album* (= *Beauveria alba*) obtida no primeiro bioensaio com larvas de *Boophilus microplus* 30 dias após tratamento. Experimento realizado sob condições controladas de  $27 \pm 1$  °C e Umidade Relativa superior a 80% (continua).

<b>Concentração Letal dos isolados</b>				
N°	Isolado	CL (Conídios ml <sup>-1</sup> )	Intervalo de Confiança (Conídios ml <sup>-1</sup> )	
<i>Beauveria bassiana</i>				
01	Bb 02	CL <sub>50</sub> :	$6,31 \times 10^9$	$1,05 \times 10^8 - 3,80 \times 10^{11}$
		CL <sub>90</sub> :	$1,58 \times 10^{13}$	$7,66 \times 10^8 - 1,63 \times 10^{18}$
02	Bb 09	CL <sub>50</sub> :	$6,55 \times 10^9$	$3,35 \times 10^8 - 1,28 \times 10^{11}$
		CL <sub>90</sub> :	$7,98 \times 10^{11}$	$1,75 \times 10^9 - 9,82 \times 10^{14}$
03	Bb 13	CL <sub>50</sub> :	$1,60 \times 10^{12}$	$6,54 \times 10^6 - 3,88 \times 10^{17}$
		CL <sub>90</sub> :	$7,58 \times 10^{15}$	$8,90 \times 10^5 - 2,62 \times 10^{27}$
04	Bb 15	CL <sub>50</sub> :	$6,88 \times 10^{10}$	$1,49 \times 10^8 - 3,18 \times 10^{13}$
		CL <sub>90</sub> :	$2,21 \times 10^{13}$	$2,13 \times 10^8 - 1,48 \times 10^{19}$
05	Bb 19	CL <sub>50</sub> :	$2,82 \times 10^{10}$	$1,16 \times 10^8 - 6,88 \times 10^{12}$
		CL <sub>90</sub> :	$6,55 \times 10^{13}$	$4,22 \times 10^9 - 7,05 \times 10^{19}$
06	Bb 21	CL <sub>50</sub> :	$3,07 \times 10^9$	$2,46 \times 10^8 - 3,83 \times 10^{10}$
		CL <sub>90</sub> :	$5,50 \times 10^{11}$	$2,17 \times 10^9 - 3,40 \times 10^{14}$
07	Bb 23	CL <sub>50</sub> :	$3,11 \times 10^{12}$	$2,48 \times 10^6 - 3,90 \times 10^{18}$
		CL <sub>90</sub> :	$1,94 \times 10^{16}$	$1,58 \times 10^5 - 1,50 \times 10^{29}$
08	Bb 27	CL <sub>50</sub> :	$1,20 \times 10^{12}$	$3,21 \times 10^7 - 4,50 \times 10^{17}$
		CL <sub>90</sub> :	$8,16 \times 10^{14}$	$2,13 \times 10^7 - 1,12 \times 10^{26}$
09	Bb 31	CL <sub>50</sub> :	$1,10 \times 10^{10}$	$2,01 \times 10^8 - 5,00 \times 10^{11}$
		CL <sub>90</sub> :	$6,13 \times 10^{12}$	$1,29 \times 10^9 - 1,14 \times 10^{17}$
10	Bb 35	CL <sub>50</sub> :	$2,94 \times 10^{13}$	$2,84 \times 10^4 - 5,45 \times 10^{22}$
		CL <sub>90</sub> :	$1,62 \times 10^{18}$	$6,12 \times 10 - 1,96 \times 10^{37}$
11	Bb 38	CL <sub>50</sub> :	$1,21 \times 10^{10}$	$2,22 \times 10^8 - 6,60 \times 10^{11}$
		CL <sub>90</sub> :	$5,94 \times 10^{12}$	$1,25 \times 10^9 - 1,11 \times 10^{17}$
12	Bb 44	CL <sub>50</sub> :	$2,63 \times 10^{10}$	$2,40 \times 10^7 - 2,88 \times 10^{13}$
		CL <sub>90</sub> :	$1,50 \times 10^{15}$	$2,23 \times 10^7 - 1,86 \times 10^{24}$
13	Bb 46	CL <sub>50</sub> :	$1,00 \times 10^9$	$1,38 \times 10^8 - 7,23 \times 10^9$
		CL <sub>90</sub> :	$2,19 \times 10^{11}$	$1,97 \times 10^9 - 5,25 \times 10^{13}$
14	LCM 01	CL <sub>50</sub> :	$6,82 \times 10^8$	$1,02 \times 10^8 - 4,55 \times 10^9$
		CL <sub>90</sub> :	$1,94 \times 10^{11}$	$1,72 \times 10^9 - 4,68 \times 10^{13}$
15	ESALQ 986	CL <sub>50</sub> :	$1,21 \times 10^9$	$1,17 \times 10^8 - 1,26 \times 10^{10}$
		CL <sub>90</sub> :	$5,85 \times 10^{11}$	$1,73 \times 10^9 - 5,06 \times 10^{14}$
16	CG 66	CL <sub>50</sub> :	$2,20 \times 10^{10}$	$2,80 \times 10^8 - 1,73 \times 10^{12}$
		CL <sub>90</sub> :	$2,98 \times 10^{12}$	$6,60 \times 10^8 - 5,26 \times 10^{16}$
17	CG 222	CL <sub>50</sub> :	$4,00 \times 10^9$	$2,82 \times 10^8 - 5,66 \times 10^{10}$
		CL <sub>90</sub> :	$6,11 \times 10^{11}$	$2,10 \times 10^9 - 4,46 \times 10^{14}$
18	CG 227	CL <sub>50</sub> :	$3,02 \times 10^9$	$2,09 \times 10^8 - 4,35 \times 10^{10}$
		CL <sub>90</sub> :	$8,34 \times 10^{11}$	$2,07 \times 10^9 - 8,90 \times 10^{14}$
19	CG 228	CL <sub>50</sub> :	$3,00 \times 10^9$	$3,39 \times 10^8 - 2,59 \times 10^{10}$
		CL <sub>90</sub> :	$1,99 \times 10^{11}$	$2,06 \times 10^9 - 4,00 \times 10^{13}$
20	CG 319	CL <sub>50</sub> :	$9,21 \times 10^7$	$3,14 \times 10^7 - 2,70 \times 10^8$
		CL <sub>90</sub> :	$7,62 \times 10^9$	$6,60 \times 10^8 - 1,31 \times 10^{11}$
21	CG 464	CL <sub>50</sub> :	$3,23 \times 10^7$	$1,37 \times 10^7 - 7,63 \times 10^7$
		CL <sub>90</sub> :	$1,10 \times 10^9$	$2,26 \times 10^8 - 6,90 \times 10^9$
22	CG 481	CL <sub>50</sub> :	$3,29 \times 10^8$	$3,22 \times 10^7 - 3,36 \times 10^9$
		CL <sub>90</sub> :	$1,09 \times 10^{12}$	$6,13 \times 10^8 - 6,52 \times 10^{15}$
23	CG 484	CL <sub>50</sub> :	$9,95 \times 10^8$	$6,75 \times 10^7 - 1,47 \times 10^{10}$
		CL <sub>90</sub> :	$1,78 \times 10^{12}$	$1,01 \times 10^9 - 1,05 \times 10^{16}$
24	CG 495	CL <sub>50</sub> :	$1,10 \times 10^9$	$2,49 \times 10^8 - 4,89 \times 10^9$
		CL <sub>90</sub> :	$4,88 \times 10^{10}$	$1,93 \times 10^9 - 2,08 \times 10^{12}$

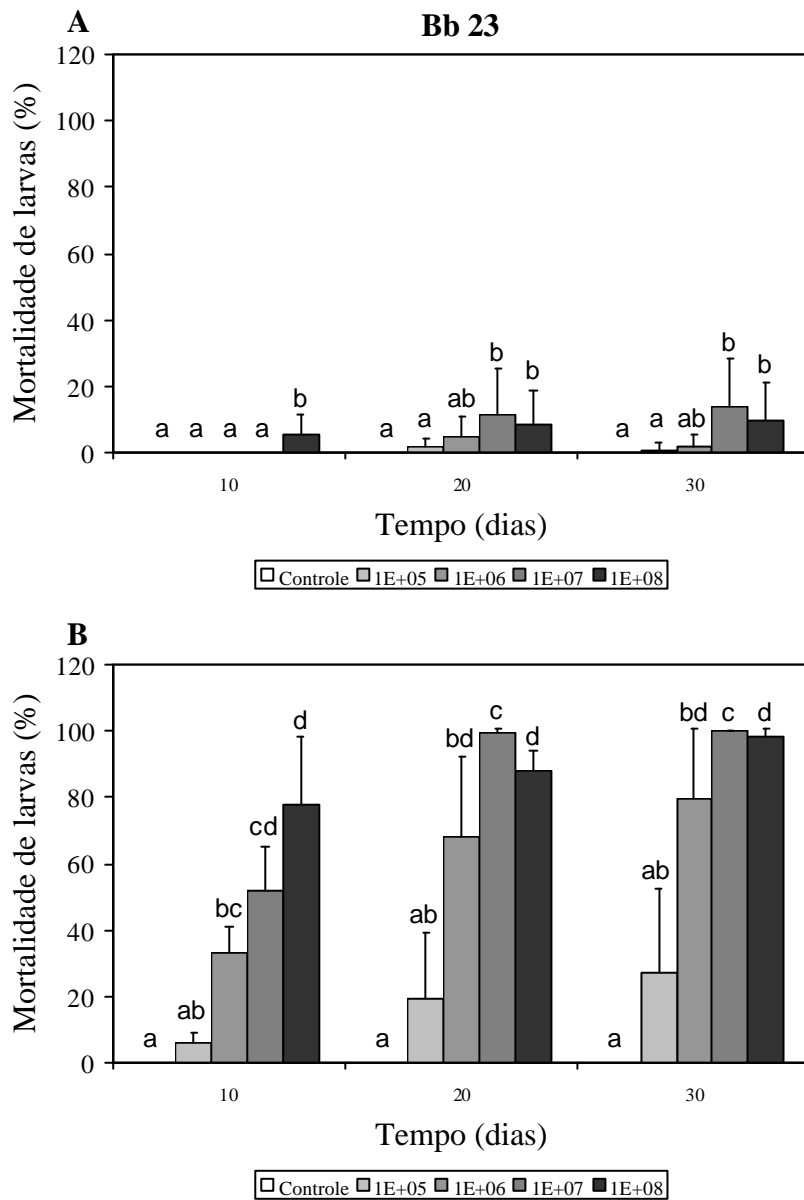
**Tabela 3.** Continuação.

N°	Isolado	CL (Conídios ml <sup>-1</sup> )		Intervalo de Confiança (Conídios ml <sup>-1</sup> )
25	CG 500	CL <sub>50</sub> :	$3,53 \times 10^7$	$5,99 \times 10^6 - 2,08 \times 10^8$
		CL <sub>90</sub> :	$1,27 \times 10^{11}$	$2,91 \times 10^8 - 1,48 \times 10^{14}$
26	ARSEF 252	CL <sub>50</sub> :	$6,87 \times 10^{10}$	$1,04 \times 10^8 - 4,53 \times 10^{13}$
		CL <sub>90</sub> :	$1,30 \times 10^{14}$	$2,25 \times 10^8 - 6,41 \times 10^{20}$
27	GHA	CL <sub>50</sub> :	$1,63 \times 10^{10}$	$1,98 \times 10^8 - 1,33 \times 10^{12}$
		CL <sub>90</sub> :	$1,09 \times 10^{15}$	$9,95 \times 10^8 - 5,34 \times 10^{17}$
28	CG 02	CL <sub>50</sub> :	$7,41 \times 10^{10}$	$1,95 \times 10^7 - 2,81 \times 10^{14}$
		CL <sub>90</sub> :	$4,11 \times 10^{15}$	$1,11 \times 10^7 - 3,73 \times 10^{25}$
29	CG 138	CL <sub>50</sub> :	$2,38 \times 10^8$	$8,94 \times 10^7 - 6,33 \times 10^8$
		CL <sub>90</sub> :	$7,60 \times 10^9$	$9,80 \times 10^8 - 8,22 \times 10^{10}$
30	CG 367	CL <sub>50</sub> :	$4,45 \times 10^9$	$3,26 \times 10^8 - 6,08 \times 10^{10}$
		CL <sub>90</sub> :	$4,78 \times 10^{11}$	$2,00 \times 10^9 - 2,78 \times 10^{14}$
31	CG 471	CL <sub>50</sub> :	$3,35 \times 10^8$	$1,39 \times 10^8 - 8,07 \times 10^8$
		CL <sub>90</sub> :	$6,04 \times 10^9$	$1,01 \times 10^9 - 4,80 \times 10^{10}$
32	CG 478	CL <sub>50</sub> :	$1,04 \times 10^8$	$3,64 \times 10^7 - 2,95 \times 10^8$
		CL <sub>90</sub> :	$7,01 \times 10^9$	$6,86 \times 10^8 - 1,04 \times 10^{11}$
33	CG 483	CL <sub>50</sub> :	$2,32 \times 10^9$	$1,72 \times 10^8 - 3,14 \times 10^{10}$
		CL <sub>90</sub> :	$8,40 \times 10^{11}$	$1,97 \times 10^9 - 9,55 \times 10^{14}$
34	EP 01	CL <sub>50</sub> :	$2,32 \times 10^8$	$4,70 \times 10^8 - 1,15 \times 10^9$
		CL <sub>90</sub> :	$8,43 \times 10^{10}$	$1,13 \times 10^8 - 1,26 \times 10^{13}$
35	CG 17	CL <sub>50</sub> :	$4,90 \times 10^8$	$9,65 \times 10^7 - 2,48 \times 10^9$
		CL <sub>90</sub> :	$8,59 \times 10^{10}$	$1,64 \times 10^9 - 8,56 \times 10^{12}$
36	UFPE 496	CL <sub>50</sub> :	*	*
		CL <sub>90</sub> :		
37	CG 01	CL <sub>50</sub> :	$1,91 \times 10^{23}$	“Variação excessiva”
		CL <sub>90</sub> :	$4,35 \times 10^{37}$	
38	CG 149	CL <sub>50</sub> :	$2,74 \times 10^{10}$	$4,18 \times 10^7 - 1,80 \times 10^{15}$
		CL <sub>90</sub> :	$9,22 \times 10^{15}$	$3,14 \times 10^7 - 4,39 \times 10^{23}$
39	CG 154	CL <sub>50</sub> :	$2,61 \times 10^{11}$	$3,84 \times 10^7 - 1,78 \times 10^{15}$
		CL <sub>90</sub> :	$1,09 \times 10^{15}$	$1,51 \times 10^7 - 1,01 \times 10^{22}$
40	CG 234	CL <sub>50</sub> :	$7,92 \times 10^{21}$	$5,88 \times 10^{-39} - 1,70 \times 10^{38}$
		CL <sub>90</sub> :	$1,45 \times 10^{28}$	$5,88 \times 10^{-39} - 1,70 \times 10^{38}$
41	CG 206	CL <sub>50</sub> :	$6,10 \times 10^7$	$3,03 \times 10^7 - 1,23 \times 10^8$
		CL <sub>90</sub> :	$7,96 \times 10^8$	$2,46 \times 10^8 - 3,11 \times 10^9$
42	CG 235	CL <sub>50</sub> :	$8,92 \times 10^8$	$1,29 \times 10^8 - 6,18 \times 10^9$
		CL <sub>90</sub> :	$2,01 \times 10^{11}$	$1,91 \times 10^9 - 4,48 \times 10^{13}$
43	CG 479	CL <sub>50</sub> :	$8,63 \times 10^{11}$	$1,33 \times 10^7 - 5,61 \times 10^{16}$
		CL <sub>90</sub> :	$1,62 \times 10^{15}$	$2,94 \times 10^6 - 2,34 \times 10^{25}$
44	ESALQ 747	CL <sub>50</sub> :	$2,79 \times 10^{11}$	$2,93 \times 10^5 - 2,65 \times 10^{37}$
		CL <sub>90</sub> :	$1,85 \times 10^{15}$	$1,30 \times 10^{13} - 1,70 \times 10^{38}$
45	CCT 4641	CL <sub>50</sub> :	$1,12 \times 10^{12}$	$9,83 \times 10^6 - 1,28 \times 10^{17}$
		CL <sub>90</sub> :	$2,86 \times 10^{15}$	$1,77 \times 10^6 - 1,44 \times 10^{26}$
46	CG 251	CL <sub>50</sub> :	$1,91 \times 10^{23}$	“Variação excessiva”
		CL <sub>90</sub> :	$4,35 \times 10^{37}$	
47	CG 480	CL <sub>50</sub> :	$2,81 \times 10^{11}$	$4,08 \times 10^7 - 1,94 \times 10^{15}$
		CL <sub>90</sub> :	$1,60 \times 10^{14}$	$1,85 \times 10^7 - 1,84 \times 10^{22}$
48	CG 487	CL <sub>50</sub> :	$6,66 \times 10^8$	$1,48 \times 10^8 - 2,99 \times 10^9$
		CL <sub>90</sub> :	$5,56 \times 10^{10}$	$1,83 \times 10^9 - 2,94 \times 10^{12}$
49	UFPE 479	CL <sub>50</sub> :	*	*
		CL <sub>90</sub> :		
50	CG 307	CL <sub>50</sub> :	$8,85 \times 10^8$	$1,99 \times 10^8 - 3,94 \times 10^9$
		CL <sub>90</sub> :	$5,23 \times 10^{10}$	$1,93 \times 10^9 - 2,42 \times 10^{12}$
51	CG 309	CL <sub>50</sub> :	$7,12 \times 10^8$	$1,85 \times 10^8 - 2,74 \times 10^9$
		CL <sub>90</sub> :	$3,42 \times 10^{10}$	$1,76 \times 10^9 - 1,07 \times 10^{12}$
52	CG 310	CL <sub>50</sub> :	$8,25 \times 10^9$	$3,53 \times 10^8 - 1,93 \times 10^{11}$
		CL <sub>90</sub> :	$8,61 \times 10^{11}$	$1,48 \times 10^9 - 1,40 \times 10^{15}$

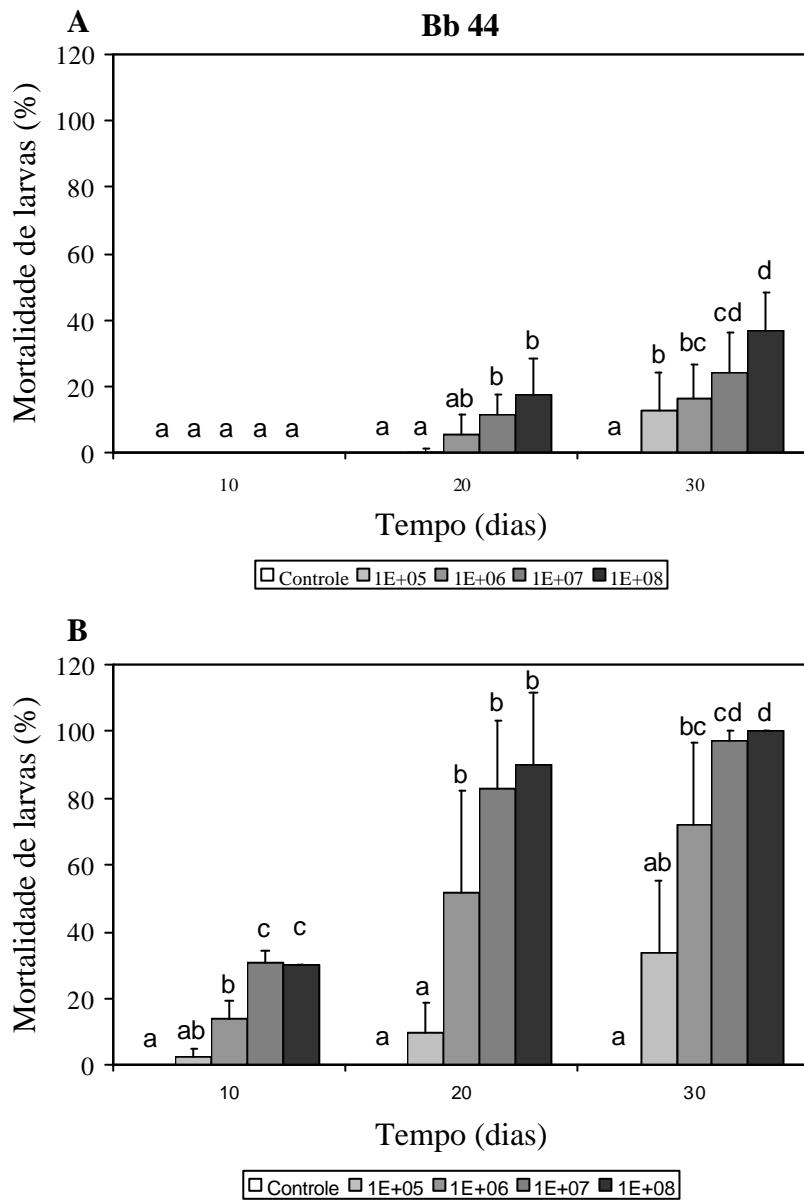
**Tabela 3.** Continuação.

N°	Isolado	CL (Conídios ml <sup>-1</sup> )	Intervalo de Confiança (Conídios ml <sup>-1</sup> )
<i>Beauveria amorpha</i>			
<b>53</b>	CCT 3161	CL <sub>50</sub> :	$1,89 \times 10^{14}$
		CL <sub>90</sub> :	$1,71 \times 10^{19}$
<b>54</b>	ARSEF 656	CL <sub>50</sub> :	$7,34 \times 10^{15}$
		CL <sub>90</sub> :	$7,51 \times 10^{19}$
<b>55</b>	ARSEF 1682	CL <sub>50</sub> :	$2,57 \times 10^{11}$
		CL <sub>90</sub> :	$5,20 \times 10^{13}$
<b>56</b>	ARSEF 4755	CL <sub>50</sub> :	$6,94 \times 10^7$
		CL <sub>90</sub> :	$3,11 \times 10^{10}$
<i>Beauveria brongniartii</i>			
<b>57</b>	ATCC 58798	CL <sub>50</sub> :	$5,78 \times 10^{12}$
		CL <sub>90</sub> :	$2,86 \times 10^{15}$
<i>Beauveria velata</i>			
<b>58</b>	ARSEF 2998	CL <sub>50</sub> :	$2,04 \times 10^{10}$
		CL <sub>90</sub> :	$3,48 \times 10^{11}$
<i>Beauveria vermiconia</i>			
<b>59</b>	ARSEF 2922	CL <sub>50</sub> :	$2,48 \times 10^{15}$
		CL <sub>90</sub> :	$1,13 \times 10^{22}$
<i>Engyodontium albus (=Beauveria alba)</i>			
<b>60</b>	UFPE 3138	CL <sub>50</sub> :	$1,04 \times 10^{15}$
		CL <sub>90</sub> :	$2,64 \times 10^{19}$

\* Não houve mortalidade de larvas no bioensaio, logo CL não foi calculada.

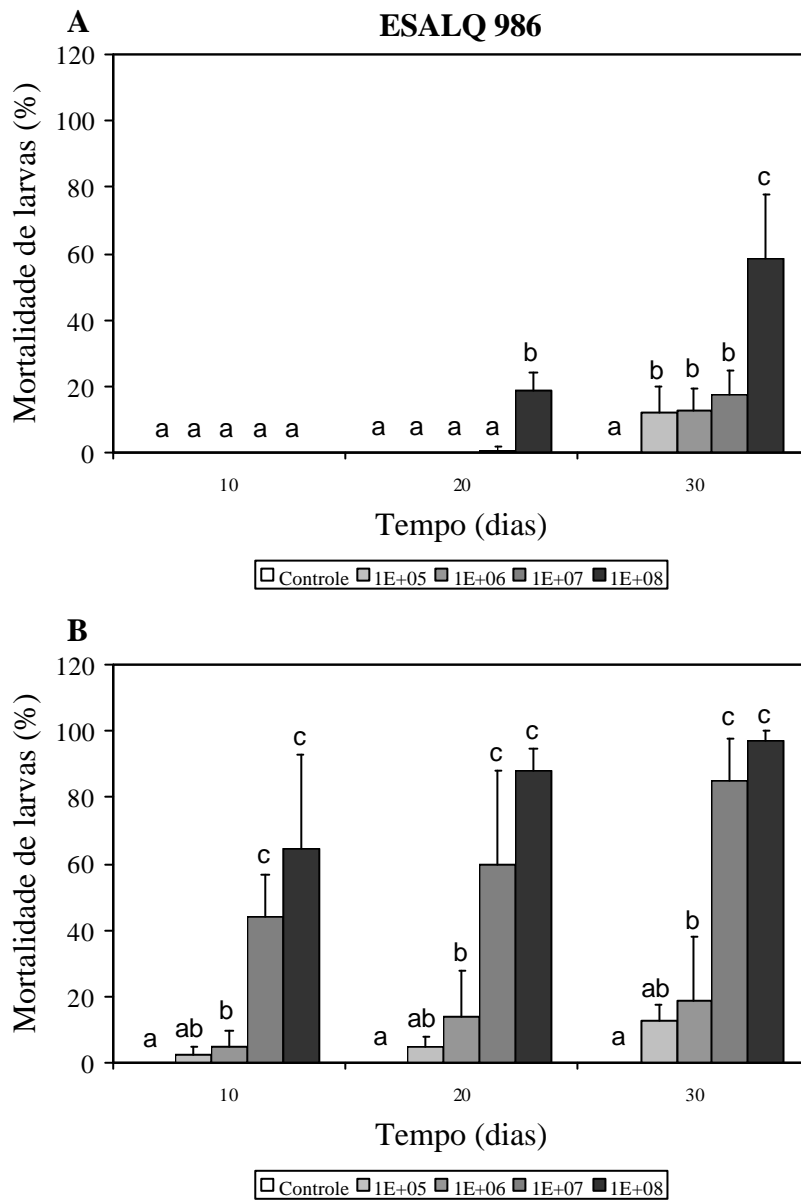


**Figura 2.** Percentuais de mortalidade das larvas de *Boophilus microplus* obtidos no primeiro (A) e no segundo bioensaios (B) após exposição a  $1,0 \times 10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  do isolado Bb 23 de *Beauveria bassiana*. Experimentos realizados sob condições controladas de  $27 \pm 1$  °C e Umidade Relativa superior a 80%. O desvio padrão foi baseado nos resultados obtidos no ensaio e na sua respectiva repetição.

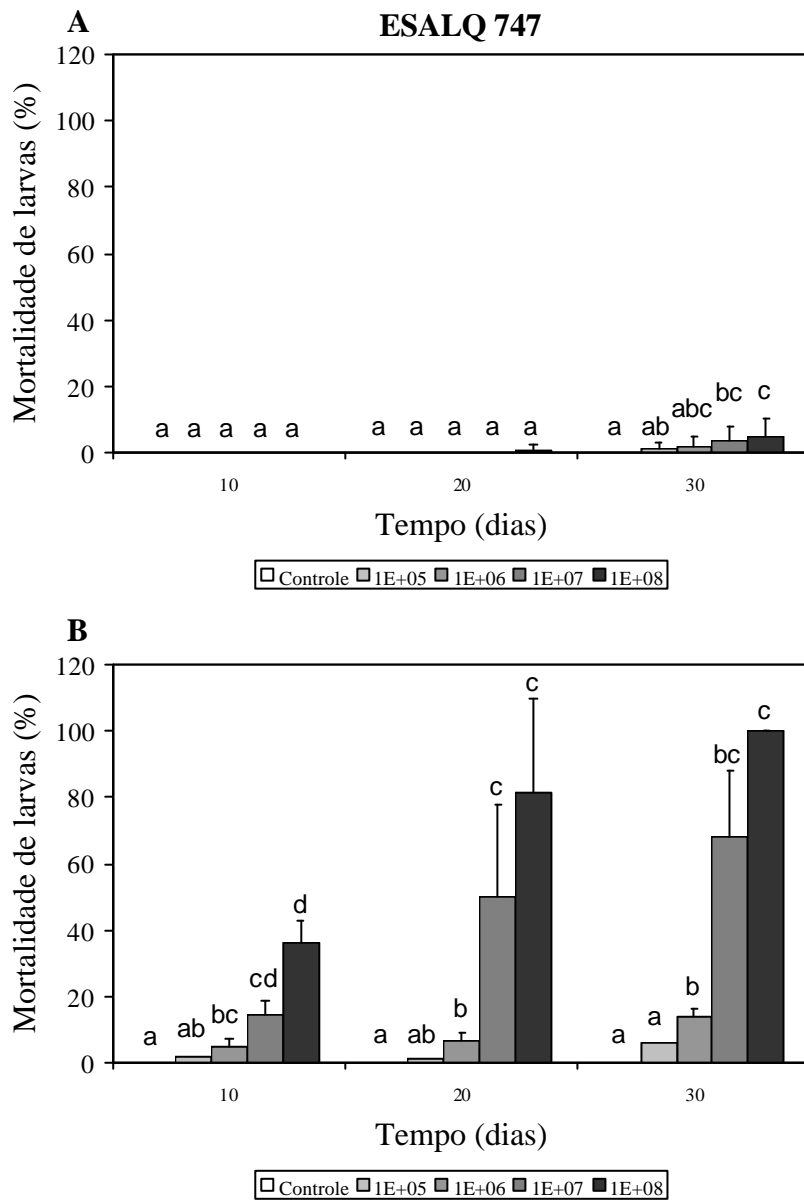


**Figura 3.** Percentuais de mortalidade das larvas de *Boophilus microplus* obtidos no primeiro (A) e no segundo bioensaios (B) após exposição a  $1,0 \times 10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  do isolado Bb 44 de *Beauveria bassiana*. Experimentos realizados sob condições controladas de  $27 \pm 1$  °C e Umidade Relativa superior a 80%. O desvio padrão foi baseado nos resultados obtidos no ensaio e na sua respectiva repetição.

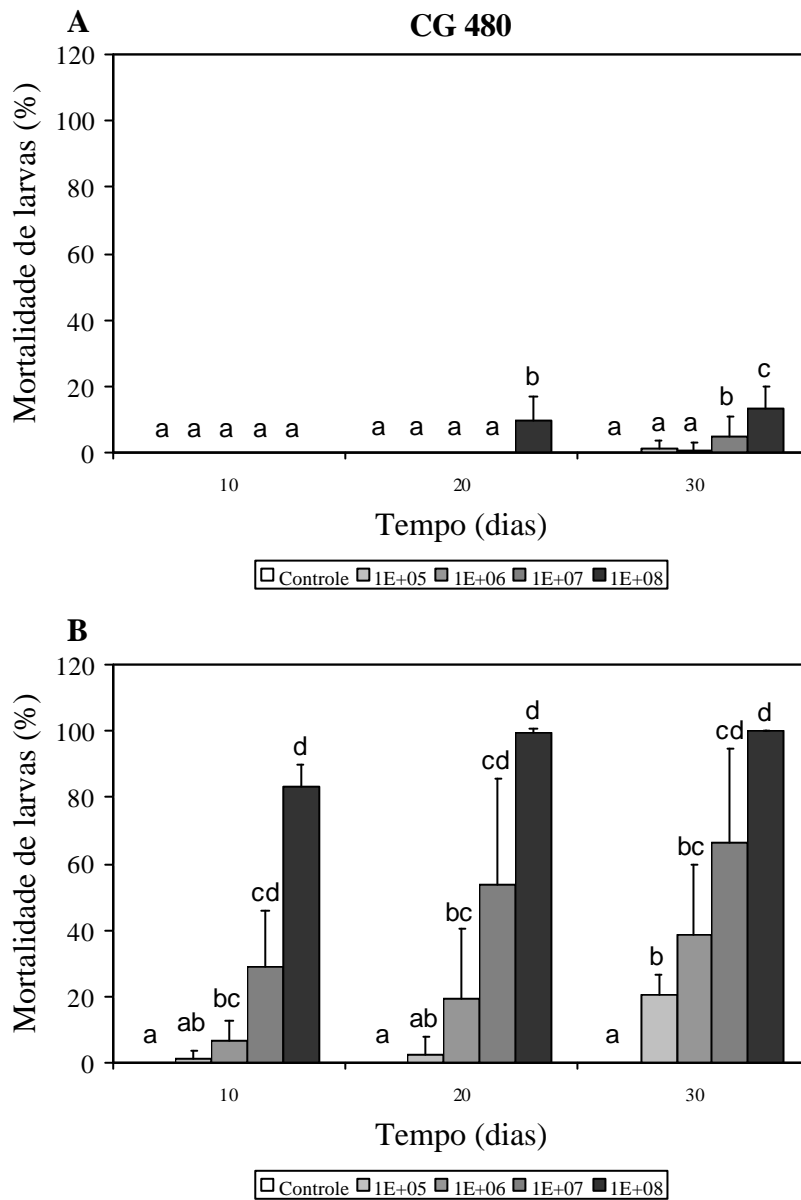




**Figura 4.** Percentuais de mortalidade das larvas de *Boophilus microplus* obtidos no primeiro (A) e no segundo bioensaios (B) após exposição a  $1,0 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  do isolado ESALQ 986 de *Beauveria bassiana*. Experimentos realizados sob condições controladas de  $27 \pm 1$  °C e Umidade Relativa superior a 80%. O desvio padrão foi baseado nos resultados obtidos no ensaio e na sua respectiva repetição.



**Figura 5.** Percentuais de mortalidade das larvas de *Boophilus microplus* obtidos no primeiro (A) e no segundo bioensaios (B) após exposição a  $1,0 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  do isolado ESALQ 747 de *Beauveria bassiana*. Experimentos realizados sob condições controladas de  $27 \pm 1$  °C e Umidade Relativa superior a 80%. O desvio padrão foi baseado nos resultados obtidos no ensaio e na sua respectiva repetição.



**Figura 6.** Percentuais de mortalidade das larvas de *Boophilus microplus* obtidos no primeiro (A) e no segundo bioensaios (B) após exposição a  $1,0 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  do isolado CG 480 de *Beauveria bassiana*. Experimentos realizados sob condições controladas de  $27 \pm 1$  °C e Umidade Relativa superior a 80%. O desvio padrão foi baseado nos resultados obtidos no ensaio e na sua respectiva repetição.

**Tabela 4.** Concentração letal (CL50 e CL90) dos isolados de *Beauveria bassiana* obtida no segundo bioensaio com larvas de *Boophilus microplus* aos 10, 20 e 30 dias após tratamento. Experimento realizado sob condições controladas de  $27 \pm 1$  °C e Umidade Relativa superior a 80% (continua).

<b>Concentração Letal dos isolados</b>				
<b>N°</b>	<b>Isolado</b>	<b>CL (Conídios ml<sup>-1</sup>)</b>		<b>Intervalo de Confiança (Conídios ml<sup>-1</sup>)</b>
10° dia:				
<b>07</b>	Bb 23	CL <sub>50</sub> :	$2,98 \times 10^6$	$1,46 \times 10^6 - 6,09 \times 10^6$
		CL <sub>90</sub> :	$2,89 \times 10^7$	$1,01 \times 10^7 - 9,78 \times 10^7$
<b>12</b>	Bb 44	CL <sub>50</sub> :	$3,02 \times 10^6$	$1,38 \times 10^6 - 6,60 \times 10^6$
		CL <sub>90</sub> :	$3,83 \times 10^7$	$1,25 \times 10^7 - 1,40 \times 10^8$
<b>15</b>	ESALQ 986	CL <sub>50</sub> :	$2,72 \times 10^7$	$1,40 \times 10^7 - 5,27 \times 10^7$
		CL <sub>90</sub> :	$2,84 \times 10^8$	$1,00 \times 10^8 - 9,53 \times 10^8$
<b>44</b>	ESALQ 747	CL <sub>50</sub> :	$5,24 \times 10^7$	$2,99 \times 10^7 - 9,20 \times 10^7$
		CL <sub>90</sub> :	$2,92 \times 10^8$	$1,23 \times 10^8 - 7,99 \times 10^8$
<b>47</b>	CG 480	CL <sub>50</sub> :	$2,01 \times 10^7$	$8,97 \times 10^6 - 4,51 \times 10^7$
		CL <sub>90</sub> :	$4,99 \times 10^8$	$1,27 \times 10^8 - 2,44 \times 10^9$
20° dia:				
<b>07</b>	Bb 23	CL <sub>50</sub> :	$6,43 \times 10^6$	$1,97 \times 10^6 - 2,01 \times 10^7$
		CL <sub>90</sub> :	$6,30 \times 10^8$	$9,03 \times 10^7 - 6,03 \times 10^9$
<b>12</b>	Bb 44	CL <sub>50</sub> :	$1,78 \times 10^7$	$7,99 \times 10^6 - 3,97 \times 10^7$
		CL <sub>90</sub> :	$4,19 \times 10^8$	$1,10 \times 10^8 - 1,97 \times 10^9$
<b>15</b>	ESALQ 986	CL <sub>50</sub> :	$9,07 \times 10^7$	$4,57 \times 10^7 - 1,80 \times 10^8$
		CL <sub>90</sub> :	$1,04 \times 10^9$	$3,26 \times 10^8 - 4,00 \times 10^9$
<b>44</b>	ESALQ 747	CL <sub>50</sub> :	$1,65 \times 10^8$	$8,30 \times 10^7 - 3,30 \times 10^8$
		CL <sub>90</sub> :	$1,77 \times 10^9$	$5,19 \times 10^8 - 7,36 \times 10^9$
<b>47</b>	CG 480	CL <sub>50</sub> :	$6,36 \times 10^7$	$3,43 \times 10^7 - 1,18 \times 10^8$
		CL <sub>90</sub> :	$5,01 \times 10^8$	$1,89 \times 10^8 - 1,56 \times 10^9$
30° dia:				
<b>07</b>	Bb 23	CL <sub>50</sub> :	$1,11 \times 10^7$	$3,17 \times 10^7 - 1,56 \times 10^8$
		CL <sub>90</sub> :	$1,56 \times 10^9$	$3,61 \times 10^8 - 8,59 \times 10^9$
<b>12</b>	Bb 44	CL <sub>50</sub> :	$9,68 \times 10^9$	$1,89 \times 10^8 - 4,95 \times 10^{11}$
		CL <sub>90</sub> :	$6,86 \times 10^{12}$	$1,25 \times 10^9 - 1,52 \times 10^{17}$
<b>15</b>	ESALQ 986	CL <sub>50</sub> :	$3,40 \times 10^8$	$1,38 \times 10^8 - 8,41 \times 10^8$
		CL <sub>90</sub> :	$6,69 \times 10^9$	$1,05 \times 10^9 - 5,75 \times 10^{10}$
<b>44</b>	ESALQ 747	CL <sub>50</sub> :	$4,28 \times 10^9$	$4,06 \times 10^8 - 4,52 \times 10^{10}$
		CL <sub>90</sub> :	$2,07 \times 10^{11}$	$1,65 \times 10^9 - 5,67 \times 10^{13}$
<b>47</b>	CG 480	CL <sub>50</sub> :	$2,48 \times 10^8$	$1,27 \times 10^8 - 4,82 \times 10^8$
		CL <sub>90</sub> :	$2,16 \times 10^9$	$6,47 \times 10^8 - 8,75 \times 10^9$

## 4 DISCUSSÃO

O presente estudo permitiu selecionar isolados de *B. bassiana* com maior potencial virulento sobre larvas de *B. microplus* e comprovar que este entomopatógeno apresenta potencial de controle sobre a fase de larvas deste artrópode. Além disso, uma grande variabilidade em virulência foi detectada entre os diferentes isolados estudados. Em estudos prévios também tem sido detectada variação de virulência entre isolados de *B. bassiana* (LUZ *et al.*, 1998; PAIÃO *et al.*, 2001; VICENTINI *et al.*, 2001) e *M. anisopliae* (FRAZZON *et al.*, 2000) sobre diferentes artrópodes.

Evidências indicam que além das características genéticas de cada isolado, existem fatores que podem estabelecer a condição de virulência de determinado isolado fúngico, promovendo aumento ou diminuição deste potencial. Neste sentido, Fargues e Robert (1983) e Frazzon *et al.*, (2000) observaram aumento significativo da virulência de um isolado de *M. anisopliae* após passagem pelo hospedeiro. O aumento da virulência após passagem *in vivo* já foi relatada também em *B. bassiana* (SCHAERFFENBERG, 1964; WASTI; HARTMANN, 1975), *Aspergillus flavus* e *Isaria farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*) conforme revisado por Fargues e Robert (1983). Em contrapartida, a diminuição da virulência em isolados de *M. anisopliae* (FARGUES; ROBERT, 1983) e *B. bassiana* (AIZAWA, 1971) também já foi relatada após cultivos sucessivos *in vitro*. Embora resultados similares não tenham sido relatados em *B. bassiana* em outros estudos (BROWNBRIDGE *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2006) é possível que o efeito do cultivo sucessivo em meios artificiais seja variável também entre os diferentes isolados de uma mesma espécie (BROWNBRIDGE *et al.*, 2001).

Não foi detectada relação entre o potencial de virulência e a origem dos isolados estudados. No entanto, evidências deste tipo de relação já foram relatadas por Vicentini *et al.* (2001) onde isolados de *B. bassiana* obtidos de insetos pertencentes a Ordem Hemiptera, subordem Homoptera, foram os isolados mais virulentos sobre ninfas de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Também Goettel *et al.* (1990) supôs que um isolado seria mais patogênico para o hospedeiro do qual ele foi originado, no entanto os isolados obtidos de *B. microplus* no presente estudo apresentaram variados níveis de virulência sobre as larvas do próprio hospedeiro e não se destacaram entre os cinco isolados mais virulentos (Figura 1).

Estudos prévios têm demonstrado elevados percentuais de mortalidade de larvas de *B. microplus* infectadas por *M. anisopliae* e *B. bassiana* em apenas dez dias após tratamento (BITTENCOURT *et al.*, 1994; BITTENCOURT *et al.*, 1996; FERNANDES *et al.*, 2003, 2006). Entretanto, no presente estudo todos os isolados de *B. bassiana* promoveram tardiamente a mortalidade de larvas de *B. microplus* no primeiro bioensaio. No entanto, no segundo bioensaio, no qual foram testadas larvas de *B. microplus* de outra procedência houve mortalidade significativa no décimo dia após tratamento. Dessa forma, é interessante notar que os mesmos isolados testados em bioensaios utilizando larvas de *B. microplus* provenientes de diferentes populações manifestaram diferente potencial de virulência, tendo sido a população analisada no primeiro bioensaio mais tolerante à infecção por *B. bassiana* do que a do segundo bioensaio. Neste sentido, a seleção de isolados de *B. bassiana* baseada nos resultados obtidos no primeiro bioensaio permite obter isolados com maior potencial de virulência sobre populações de *B. microplus* sobretudo naquelas mais suscetíveis.

Segundo Polar *et al.* (2005b) é possível que os carrapatos sejam fisiológica ou estruturalmente tolerantes a infecção por fungos entomopatogênicos, visto que elevadas concentrações de conídios estabelecidas nos ensaios em laboratório são necessárias para se estabelecer a rápida mortalidade dos carrapatos. Essa afirmativa é sustentada pelo fato de que não foram encontrados relatos de epizootias ocorrendo naturalmente em populações de carrapatos.

Não foram encontrados estudos analisando a susceptibilidade de diferentes populações de carrapatos a um determinado entomopatógeno. Neste sentido, o efeito obtido em ensaios laboratoriais com carrapatos tem sido atribuído diretamente à virulência dos isolados dos entomopatógenos. No entanto, conforme revisado por Omoto e Alves (1998), McGaughey (1985) comprovou em condições de campo diferenças na susceptibilidade de populações de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) a *Bacillus thuringiensis*, e também Abot *et al.* (1995) verificaram diferenças na susceptibilidade de populações da lagarta *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) ao entomopatógeno *Baculovirus anticarsia* na cultura de soja.

Sendo assim, os dados apresentados no presente estudo indicam que diferentes populações desta espécie de carrapato podem manifestar diferentes níveis de susceptibilidade a infecção por *B. bassiana*. Neste caso, não só as condições genéticas e fisiológicas de determinado isolado fúngico, mas também a susceptibilidade dos indivíduos de uma população podem interferir na eficácia do biocontrole de determinada população do carrapato *B. microplus*. Neste sentido, tendo em vista que é possível a seleção dos isolados de maior potencial virulento entre uma variedade de isolados pesquisados, a pesquisa de uma formulação desses isolados em adjuvantes que permitam aumentar o potencial de virulência parece ser um meio pertinente para se obter maior eficácia nos programas de biocontrole de carrapatos.

## CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste estudo permitem elaborar as seguintes conclusões:

- 1- Todos os isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* estudados apresentaram características macro e micromorfológicas compatíveis com a espécie;
- 2- A produção dos conídios parece estar fortemente relacionada à condição morfológica dos isolados, indicando que a baixa produção de conídios está relacionada à degeneração dos isolados;
- 3- A análise de eletroforese de isoenzimas permitiu revelar que o isolado de *E. albus* difere geneticamente de *B. bassiana*;
- 4- A análise de AFLP e o seqüenciamento de ITS de rDNA demonstraram notável variação genética entre os isolados de *B. bassiana* e os demais isolados das diferentes espécies de *Beauveria* spp. analisadas;
- 5- A análise de eletroforese de isoenzimas e a análise de AFLP revelaram que os isolados brasileiros de *B. bassiana* apresentam considerável variação genética;
- 6- A tradicional técnica de Isoenzimas é um importante método para detecção de variabilidade genética entre isolados de *B. bassiana*, apresentando resultados bastante similares àqueles obtidos pela moderna técnica de AFLP;
- 7- Em território brasileiro, as populações de *B. bassiana* originárias da região Sul demonstraram variação genética significativamente diferente em relação as das regiões Norte e Nordeste. As populações de todas as regiões brasileiras mostraram diferenças em relação à população norte americana;
- 8- A distância geográfica é fator importante para detecção de variação genética entre isolados de *B. bassiana*, sendo portanto, fator relevante de influência na estrutura populacional em *B. bassiana*;
- 9- A variabilidade genética detectada entre os isolados estudados indica que *B. bassiana* representa um agregado de espécies;
- 10- Isolados brasileiros de *B. bassiana* originários de uma mesma área geográfica apresentaram elevado coeficiente de similaridade e até mesmo total similaridade entre si evidenciando uma população com estrutura clonal;
- 11- Poucos isolados de *Beauveria* spp. foram inibidos pela exposição a 45 °C por uma hora, no entanto, grande variabilidade quanto a termotolerância dos conídios foi observada entre os isolados após duas horas de exposição a 45 °C;
- 12- A exposição dos conídios de *B. bassiana* ao calor retarda o processo de germinação;

- 13- As temperaturas entre 44 °C e 45 °C por um período de seis horas de exposição, ou entre 46 °C e 47 °C por quatro horas foram limitantes à germinação dos conídios dos isolados mais termotolerantes de *B. bassiana*;
- 14- Os conídios de *Beauveria* spp. permaneceram ativos quando submetidos à temperatura de 5 °C e apresentaram a maioria dos conídios em processo de germinação, com exceção dos isolados UFPE 3138, CG 66, UFPE 479, CG 227 e CG 02;
- 15- Em comparação com *M. anisopliae*, os isolados de *Beauveria* spp. apresentaram maior atividade ao frio, concluindo portanto que *B. bassiana* é mais psicrófila do que os isolados de *M. anisopliae*;
- 16- Conídios de *Beauveria* expostos à radiação UV-B demonstraram atraso no processo de germinação;
- 17- Existe alta variabilidade na tolerância à radiação UV-B entre os isolados de *B. bassiana*;
- 18- A exposição dos isolados de *B. bassiana* aos raios UV-B e ao frio em habitat natural reflete diretamente na sensibilidade dos isolados quando submetidos a estes estresses;
- 19- Diferentes populações de *B. microplus* podem manifestar diferentes níveis de suscetibilidade à infecção por *B. bassiana*.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle biológico de carrapatos tem mostrado resultados bastante satisfatórios em laboratório, mas poucos programas têm sido testados em condições de campo. Em condições naturais a adversidade do meio ambiente põe em risco a eficácia de programas de biocontrole, principalmente tratando-se das condições climáticas de países tropicais como o Brasil. No entanto, os resultados obtidos neste estudo permitem eleger isolados de *B. bassiana* para a pesquisa de programas do controle biológico do carrapato *B. microplus* e de outros artrópodes praga em condições de campo.

Neste sentido, os isolados foram avaliados morfológicamente, avaliados quanto à capacidade de produção de conídios, caracterizados molecularmente, avaliados quanto à tolerância ao calor, ao frio e à radiação ultravioleta, e quanto ao potencial virulento sobre larvas de *B. microplus*. As diferentes metodologias empregadas forneceram importantes informações que contribuirão para a utilização do fungo *B. bassiana* como agente de biocontrole de artrópodes. Em relação a análise molecular foi notado que a utilização da técnica de eletroforese de isoenzimas revelou resultados muito similares aos resultados obtidos pela moderna técnica de AFLP-PCR, indicando que a tradicional técnica de Isoenzimas é uma ferramenta importante para detecção de variabilidade genética entre isolados de *B. bassiana*.

O desempenho de cada um dos isolados submetidos aos diferentes estudos pode ser observado resumidamente na Tabela 1. O isolado CG 138 de *B. bassiana* foi o que apresentou melhor desempenho em todos os testes avaliados. No entanto, outros isolados como o CG228, CG 464, CG 584, CG 495, ARSEF 252, GHA, CG 471, CG 149, CG 206, CG 235, CG 487, CG 307 e CG 310 também demonstraram condições satisfatórias, embora não tenham apresentado o melhor desempenho em todos os testes. Nenhum dos isolados das diferentes espécies de *Beauverias* pp. e *Engyodontium albus* apresentaram condições satisfatórias para atuarem como agentes de biocontrole.

Além da seleção de isolados, o presente estudo permitiu obter diversas informações a respeito do entomopatógeno *B. bassiana*, e neste sentido torna-se pertinente relacionar e discutir os dados obtidos nos diferentes estudos.

Em relação aos estudos de tolerância a radiação UV-B e calor, foi demonstrado que a tolerância a estes estresses nem sempre está relacionado em *B. bassiana*. Portanto, isolados tolerantes ao calor mostraram-se sensíveis à exposição à radiação UV-B (por exemplo, Bb 13 e Bb 31), assim como isolados UV-B tolerantes mostraram-se sensíveis à exposição ao calor (por exemplo, ESALQ 986 e CG 222). Em *M. anisopliae*, foi estabelecido que aproximadamente 65% dos isolados manifestaram a mesma tolerância à radiação UV-B e ao calor (RANGEL *et al.*, 2005), enquanto que Bidochka *et al.* (2001) demonstraram que aproximadamente 90% dos isolados foram tolerantes a ambos os estresses. Por outro lado, muitos isolados de *B. bassiana* apresentaram baixa tolerância à exposição ao calor e aos raios UV-B (por exemplo, Bb 02, Bb 09, Bb21, Bb 38, Bb 44, Bb 46, LCM 01 e EP 01). Além disso, os isolados das diferentes espécies de *Beauveria* spp. foram sensíveis a ambos os estresses, com exceção do isolado ARSEF 656 de *B. amorpha* que apresentou 70,9% de conídios viáveis após duas horas de exposição ao calor.

Não foi estabelecida relação entre grupos genéticos com tolerância a radiação UV-B, termotolerância ou virulência dos isolados. Também Riba *et al.* (1986b) e Bidochka *et al.* (2002) não relacionaram semelhança genética à virulência de isolados fúngicos. No entanto, Bidochka *et al.* (2002) estabeleceu grupos de isolados geneticamente semelhantes e

**Tabela 1.** Resumo do desempenho de cada um dos isolados de *Beauveria* spp. e *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) (continua).

N°	Isolados*	Origem (1)	Condição morfológica(2)	Produção de conídios (3)	Grupo em MLEE (4)	Grupo em AFLP (5)	Tolerância à UV-B (6)	Tolerância ao calor (7)	Tolerância ao frio (8)	Virulência (9)
01	Bb 02	Acari / RJ	++	-	1	1	-	-	++	+
02	Bb 09	Acari / RJ	+	-	1	1	-	-	++	+
03	Bb 13	Acari / RJ	+	+	1	1	-	++	++	-
04	Bb 15	Acari / RJ	++	-	1	1	+	+	++	+
05	Bb 19	Acari / RJ	++	++	1	1	+	+	++	+
06	Bb 21	Acari / RJ	-	-	1	1	+	-	++	+
07	Bb 23	Acari / RJ	++	-	1	1	-	+	++	+
08	Bb 27	Acari / RJ	+	+	1	1	+	+	++	-
09	Bb 31	Acari / RJ	-	+	1	1	-	++	++	+
10	Bb 35	Acari / RJ	+	+	4	1	+	-	++	-
11	Bb 38	Acari / RJ	++	+	1	1	-	+	++	+
12	Bb 44	Acari / RJ	-	-	1	1	-	+	++	+
13	Bb 46	Acari / RJ	+	-	1	1	-	-	++	++
14	LCM 01	Acari / RJ	-	-	1	1	-	-	++	+
15	ESALQ 986	Acari / RJ	++	-	1	1	+	-	++	++
16	CG 66	Col. / DF	++	+		8	+	-	+	+
17	CG 222	Col. / AM	++	-	2	5	++	-	++	+
18	CG 227	Col. / CE	++	++		1	+	++	+	+
19	CG 228	Col. / AM	++	++	6	8	++	++	+	+
20	CG 319	Col. / RS	++	++	1	2	+	+	++	++
21	CG 464	Col. / PR	+	+	1	2	+	++	++	++
22	CG 481	Col. / BA	++	+	1	5	+	+	++	++
23	CG 484	Col. / MS	++	++	1	2	++	+	++	+

**Tabela 1.** Continuação.

Nº	Isolados*	Origem (1)	Condição morfológica(2)	Produção de conídios (3)	Grupo em MLEE (4)	Grupo em AFLP (5)	Tolerância à UV-B (6)	Tolerância ao calor (7)	Tolerância ao frio (8)	Virulência (9)
24	CG 495	Col. / PR	+	+	1	2	++	+	++	+
25	CG 500	Col. / GO	++	+	1	3	+	+	++	+
26	ARSEF 252	Col. / EUA	++	++	10	10	+	++	++	+
27	GHA	Col. / EUA	++	++	5	11	++	++	++	+
28	CG 02	Col. / AM	++	+	1	4	-	+	+	+
29	CG 138	Col. / PE	++	+	11	11	++	++	++	++
30	CG 367	Col. / SE	+	-	3	6	+	-	++	+
31	CG 471	Col. / RS	++	-	2	1	++	+	++	++
32	CG 478	Col. / SP	++	+	1	1	-	+	++	++
33	CG 483	Col. / GO	++	++	6	6	-	+	++	+
34	EP 01	Col. / SC	-	-	1	1	-	-	++	++
35	CG 17	Col. / SP	++	+	1	1	+	+	+	++
36	UFPE 496	Col. / EUA	-	-	12	11	+	-	++	-
37	CG 01	Hom. / DF	+	-	1	2	++	++	++	-
38	CG 149	Hom. / GO	++	++	1	6	++	+	++	+
39	CG 154	Hom. / GO	++	++	2	6	+	-	++	+
40	CG 234	Hom. / MS	+	-	3	4	+	+	++	-
41	CG 206	Hym. / AM	++	++	1	6	++	+	++	++
42	CG 235	Hym. / AM	++	+	1	6	++	+	++	++
43	CG 479	Hym. / AL	+	+	6	5	+	+	++	-
44	ESALQ 747	Hym. / RS	++	+	1	1	+	+	++	-
45	CCT 4641	Hym. / MG	-	-	1	4	+	+	++	-
46	CG 251	Hym. / GO	++	++	7	9	++	++	++	-

**Tabela 1.** Continuação.

N°	Isolados*	Origem (1)	Condição morfológica(2)	Produção de conídios (3)	Grupo em MLEE (4)	Grupo em AFLP (5)	Tolerância à UV-B (6)	Tolerância ao calor (7)	Tolerância ao frio (8)	Virulência (9)
47	CG 480	Hym. / BA	++	++	5	7	+	+	++	-
48	CG 487	Hym. / SC	++	+	1	1	++	++	++	+
49	UFPE 479	Lep. / DF	-	+	2	5	+	-	+	-
50	CG 307	Solo / GO	+	+	1	5	+	++	++	++
51	CG 309	Solo / MG	++	+	2	1	-	++	++	++
52	CG 310	Solo / BA	++	+	2	5	++	+	++	+
53	CCT 3161	Cont / EUA	-	+	8	11	+	++	++	-
<b>OUTGROUP</b>										
54	ARSEF 656	Hom. / Chi	++	+	7		+	++	++	-
55	ARSEF 1682	Col. / Japão	-	+	9		-	-	++	-
56	ARSEF 4755	Solo / Aust.	++	+	12		-	-	++	++
57	ATCC 58798	Dip. / Czec.	+	-	5		-	-	++	-
58	ARSEF 2998	Lep. / Equa	-	-	13		+	-	++	-
59	ARSEF 2922	Solo / Chile	+	-	13		+	-	++	-
60	UFPE 3138	Solo / PE	-	-	13		-	-	-	-

(\*) Isolados de 01 a 53: *Beauveria bassiana*; 54 a 56: *B. amorpha*; 57: *B. brongniartii*; 58: *B. velata*; 59: *B. vermiconia*; 60: *Engyodontium album*.

(1) Hospedeiro / Estado ou país de origem. Col.=Coleoptera; Hom.=Homoptera; Hym.=Hymenoptera; Lep.=Lepidoptera; Dip.=Diptera; Cont=Contaminante.

(2) (-) Isolado apresentando muitas células conidiogênicas solitárias; (+) Isolado apresentando células conidiogênicas formando cachos pouco densos; (++) Isolado apresentando células conidiogênicas formando cachos densos.

(3) Produção de conídios em 0,589 cm<sup>2</sup> da cultura: (-) até 2000 × 10<sup>4</sup> conídios; (+) de 2000 × 10<sup>4</sup> a 6000 × 10<sup>4</sup> conídios; (++) superior a 6000 × 10<sup>4</sup> conídios.

(4) Grupo ao qual o isolado pertenceu no dendrograma gerado com os dados obtidos pela técnica de eletroforese de isoenzimas (MLEE).

(5) Grupo ao qual o isolado pertenceu no dendrograma gerado com os dados obtidos pela técnica AFLP-PCR.

(6) Germinação relativa dos conídios após duas horas de exposição à UV-B: (-) 0% a 20%; (+) 20% a 50%; (++) > 50%.

(7) Germinação relativa dos conídios após duas horas de exposição a 45 °C: (-) 0% a 20%; (+) 20% a 60%; (++) > 60%.

(8) Germinação relativa dos conídios expostos a 5 °C durante 15 dias: (-) 0% a 20%; (+) 20% a 60%; (++) > 60%.

(9) Mortalidade média de larvas de *B. microplus* 30 dias após exposição a 1,0 × 10<sup>8</sup> conídios ml<sup>-1</sup>: (-) 0% a 20%; (+) 20% a 50%; (++) > 50%.

fortemente associados ao habitat de origem. Grupos genéticos foram associados ao habitat agrícola, de florestas ou região Ártica. Esses autores também observaram o desenvolvimento dos isolados em diferentes temperaturas e demonstraram que o grupo de isolados oriundos de habitat Ártico e de florestas apresentaram melhor desenvolvimento sob baixas temperaturas. Isolados de habitat agrícola se desenvolveram melhor a 37 °C e foram também mais resistentes à exposição aos raios ultravioleta. Além disso, a habilidade de desenvolver-se entre 15 e 25 °C coincidiu com a rápida mortalidade de insetos expostos à infecção. Embora este tipo de relação não tenha sido observada no presente estudo, foi obtida uma série de informações importantes sobre a estrutura populacional de isolados brasileiros de *B. bassiana*. Além disso, embora os dados não permitissem relacionar os resultados com o habitat de origem dos isolados, a tolerância à UV-B e ao frio mostraram relação latitude-dependente.

É importante notar que mesmo os isolados de *B. bassiana* mais virulentos e mais tolerantes a UV-B e ao calor não estarão aptos a atuarem em programas de controle biológico sem que antes se estabeleça uma formulação adequada destes isolados e uma estratégia de controle. Os isolados mais tolerantes não resistiriam à exposição continuada ao calor e a radiação UV-B como ocorre no ambiente em determinadas épocas do ano. Neste sentido, uma estratégia de controle deve atentar para aplicações nas estações em que o calor e a incidência dos raios ultravioleta ocorrem de forma mais amena, como no outono e no inverno. Também a adição de adjuvantes pode garantir uma maior eficácia do isolado permitindo uma maior aderência dos conídios ao artrópode alvo, e também bloqueando raios UV-B. Quanto à estratégia de utilização de produto biológico, Kaaya *et al.* (2000) sugerem que métodos de aplicação nas pastagens permitiriam controlar diferentes espécies de carrapatos eliminando as fêmeas em postura e larvas antes de atingirem o hospedeiro. Além disso, esse método ainda permitiria uma proteção à radiação solar direta.

Além desses aspectos também outros deverão ser investigados para garantir a eficácia do biocontrole como a toxicidade do produto para mamíferos, estabilidade dos conídios e impacto ambiental. Futuros estudos devem caminhar nesta direção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOT, A.R.; MOSCARDI, F.; FUXA, J.R.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; RICHTER, A.R. Susceptibility of populations of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Entomologic Science**, v.30, p.62-69, 1995.

AIZAWA, K. Strain improvement and preservation of virulence. In: BURGESS, H.D.; HUSSEY, N.W. **Microbial Control of Insects and Mites**. New York: Academic Press, 1971. p.666-668.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, 1998. 574p.

AL-RUBEAI, M.A.; EL-HASSI, M.F. Inactivation of wild type and mutant *Aspergillus nidulans* conidia by far-UV, near-UV, visible and sun lights. **Environmental and Experimental Botany**, v.26, p.245-252, 1986.

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. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-382.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VII Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.59, p.115-129, 1961.

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.

AZEVEDO, J.L. Engenharia genética aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 239-268.

BALSAMO-CRIVELLI, G. Ossevizione sopra una nuova specie di Mucedinea del genere *Botrytis*. **Biblioteca Italiana Ossia Giornale di Letteratura Scienze ed Arti**, v.39, p.125, 1835.

BARROS, T.A.M.; EVANS, D.E. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infectantes do carrapato dos bovinos *Boophilus microplus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.9, p.17-21, 1989.

BATERMAN, R. The development of a mycoinsecticide for the control of locust and grasshoppers. **Outlook on Agriculture**, v.26, p.13-18, 1997.

BEAUVERIE, J. Les Muscardines. Le genre *Beauveria*. **Revue Générale de Botanique**, v.26, p.81-157, 1914.

BERRETA, M.F.; LECUONA, R.E.; ZANDOMENI, R.O.; GRAU, O. Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent labels. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.71, p.145-150, 1998.

BIDOCHKA, M.J.; KAMP, A.M.; LAVENDER, T.M.; DEKONING, J.; De CROSS, J.N.A. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.1335-1342, 2001.

BIDOCHKA, M.J.; KASPERSKI, J.E.; WILD, G.A.M. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. **Canadian Journal of Botany**, v.76, p.1198-1204, 1998.

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

BIDOCHKA, M.J.; MENZIES, F.V.; KAMP, A.M. Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. **Archives of Microbiology**, v.178, p. 531-537, 2002.

BISSETT, J.; WIDDEN, P. A new species of *Beauveria* isolated from Scottish moorland soil. **Canadian Journal of Botany**, v.66, p.361-362, 1988.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*. **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v.16, p.41-47, 1994.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; VIEGAS, E.C.; LIMA, A. F. Isolamento e cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, a partir do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) artificialmente infectado. **Revista Universidade Rural, Série Ciência da Vida**, v.17, p.55-60, 1995.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; PERALVA, S.L.F.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.; PERALVA, S.L.F.S.; SOUZA, E.J.; MASCARENHAS, A.G.; ALVES, S.B. Ação de dois isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* sobre algumas características biológicas de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* em laboratório. **Revista Universidade Rural, Série Ciência da Vida**, v.19, p. 65-71, 1997.

BOUCIAS, D.; STOKES, C.; SUAZO, A.; FUNDERBURK, J. AFLP analysis of the entomopathogen *Nomuraea rileyi*. **Mycologia**, v.92, p.638-648, 2000.

BOUCIAS, D.G.; McCOY, C.M.; JOSLYN, O.J. Isozyme differentiation among 17 geographical isolates of *Hirsutella thompsonii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.39, p.329-337, 1982.

BOYCEV, D.; RIZVANOV, K. Relation of *Botrytis cinerea* to ixodid ticks. **Zoologie Zeitschrift Ukranien**, v.39, p.460, 1960.

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, 2001a.

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, 2001b.

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

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.

BRIDGE, P.D.; ABRAHAM, Y.J.; CORNISH, M.C.; PRIOR, C.; MOORE, D. The chemotaxonomy of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates from the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Mycopathologia**, v.111, p. 85-90, 1990.

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

CARNEIRO, M.E.; MONTEIRO, S.G.; DAEMON, E.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Effects of isolate 986 of the fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., on eggs of the tick *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.8, p.59-62, 1999.

CASTRILLO, L.A.; BROOKS, W.M. Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD analyses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.72, p.190-196, 1998.

CASTRILLO, L.A.; WIEGMANN, B.M.; BROOKS, W.M. Genetic variation in *Beauveria bassiana* populations associated with the darkling beetle *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.73, p. 269-275, 1999.

CASTRILLO, L.A.; VANDENBERG, J.D.; WRAIGHT, S.P. Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.82, p.75-83, 2003.



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.

CHAPPELL, M.A.; WHITMAN, D.W. Grasshopper thermoregulation. In: CHAPMAN, R. **Biology of grasshoppers**. New York: Wiley, 1990. p.143-172.

COBB, B.D.; CLARKSON, J.M. Detection of molecular variation in the insect pathogenic fungus *Metarhizium* using RAPD-PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v.12, p.319-324, 1993.

COCHRANE, B.J.; BROWN, J.K.; WAIN, R.P.; YANGCO, B.G.; STRAKE, D.T. Genetic studies in the genus *Basidiobolus* I. isozyme variations among isolates of human and natural populations. **Mycologia**, v.81, p.504-513, 1989.

COONEY, D.G.; EMERSON, R. **Thermophilic fungi. An account of their biology, activities and classification**. Londres: W.H. Freeman, 1964. 188p.

COUTEAUDIER, Y.; VIAUD, M.; RIBA, G. Genetic nature, stability, and improved virulence of hybrids from protoplast fusion in *Beauveria*. **Microbial Ecology**, v.32, p.1-10, 1996.

CRISAN, E.V. Current concepts of thermophilism and the thermophilic fungi. **Mycologia**, v.65, p.1171-1198, 1973.

DE CROSS, J.N.A.; BIDOCHKA, M.J. Effects of low temperature on growth parameters in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.45, p.1055-1061, 1999.

DE HOOG, G.S. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. **Studies in Mycology**, n.1, p.1-41, 1972.

DE HOOG, G.S. Notes on fungicolous hyphomycetes and their relatives. **Persoonia**, v.10, p.33-81, 1978.

DE HOOG, G.S.; RAO, V. Some new Hyphomyetes. **Persoonia**, v.8, p.207-212, 1975.

DE MURO, M.A.; ELLIOTT, S.; MOORE, D.; PARKER, B.L.; SKINNER, M.; REID, W.; EL BOUHSSINI, M. Molecular characterization of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of Sunn Pests (*Eurygaster* and *Aelia* species). **Mycological Research**, v.109, p.294-306, 2005.

DE MURO, M.A.; MEHTA, S.; MOORE, D. The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin. **FEMS Microbiology Letters**, v.229, p.249-257, 2003.

DEVI, K.U.; SRIDEVI, V.; MOHAN, Ch.M.; PADMAVATHI, J. Effect of high temperature and water stress on *in vitro* germination and growth in isolates of the entomopathogenic

fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.88, p.181-189, 2005.

DIMBI, S.; MANIANIA, N.K.; LUX, S.A.; MUEKE, J.M. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. **Biocontrol**, v.49, p.83-94, 2004.

DOBERSKI, J.W. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Solytus scolytus*: effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.37, p.195-200, 1981.

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

EKESI, S.; MANIANIA, N.K.; AMPONG-NYARKO, K. Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. **Biocontrol Science and Technology**, v.9, p.177-185, 1999.

ELLEDGE, S.J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. **Science**, v.274, p.1664-1672, 1996.

FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A. ROUGIER, M. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. **Mycologia**, v.89, 383-392, 1997a.

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.

FARGUES, J.; MANIANIA, N.K.; DELMAS, J.C.; SMITS, N. Influence of temperature on *in vitro* growth of entomopathogenic hyphomycetes. **Agronomie**, v.12, p.557-564, 1992.

FARGUES, J.F.; ROBERT, P.H. Effects of passaging 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.

FARGUES, J.; ROUGIER, M.; GOUJET, R.; ITIER, B. Effet du rayonnement solaire sur la persistance des conidiospores de l'hyphomycète entomopathogène, *Nomuraea rileyi*, à la surface d'un couvert vegetal. **Entomophaga**, v.33, p.357-370, 1988.

FARGUES, J.; ROUGIER, M.; GOUJET, R.; SMITS, N.; COUSTERE, C.; ITIER, B. Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by near-ultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.69, p.70-78, 1997b.

FEGAN, M.; MANNERS, J.M.; MACLEAN, D.J.; IRWIN, J.A.G.; SAMUELS, K.D.Z.; HOLDOM, D.G.; LI, D.P. Random amplified polymorphic DNA markers reveal high degree

of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, v.139, p.2075-2081, 1993.

FERNANDES, É.K.K.; COSTA, G.L.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus*. **Journal of Basic Microbiology**, v.44, p.270-274, 2004.

FERNANDES, E.K.K.; COSTA, G.L.; MORAES, A.M.L.; ZAHNER, V.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. **Parasitology Research**, v.98, p.324-332, 2006.

FERNANDES, É.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*. **Journal of Basic Microbiology**, v.43, p.393-398, 2003.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

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

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

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

GAITAN, A.; VALDERRAMA, A.M.; SALDARRIAGA, G.; VELEZ, P.; BUSTILLO, A. Genetic variability of *Beauveria bassiana* associated with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* and other insects. **Mycological Research**, v.106, p.1307-1314, 2002.

GEIS, P.A.; SZANISZLO, P.J. Carotenoid pigments of the dematiaceous fungus *Wangiella dermatitidis*. **Mycologia**, v.76, p.268-273, 1984.

GINDIN, G.; SAMISH, M.; ALEKSEEV, E.; GLAZER, I. The susceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) ticks to entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, v.11, p.111-118, 2001.

GLARE, T.R.; INWOOD, A.J. Morphological and genetic characterization of *Beauveria* spp. from New Zealand. **Mycological Research**, v.102, p.250-256, 1998.

GOETTEL, M.S.; POPRAWSKI, T.J.; VANDENBERG, J.D. et al. Safety of non-target invertebrates to fungal biocontrol agents. In: LAIRD, M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W. **Safety of Microbial Insecticides**. Boca Raton: CRC Press Inc, 1990. p.115-132.

GONZÁLES, J.C. O carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Revisão histórica e conceitual). **A Hora Veterinária**, v.21, p.23-28, 2002.

GORSKOVA, G.J. Reduction of fecundity of ixodid ticks females induced by fungal infection. **Vetsnik Leningraskogo Universitit**, v.21, p.13-16, 1966.

GOWER, J.C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**, v.53, p.325-338, 1966.

GRILLO TORRADO, J.M.G.; GUTIERREZ, R.O. Método para medir la actividad de los acaricidas sobre larvas de garrapata. Evolución de sensibilidad. **Revista de Investigaciones Agropecuarias, serie 4, Patolgia Animal**, v. 6, p.135-158, 1969.

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.

HAIN, J.; WELLER, E.M.; JUNG, T.; BURKART, W. Effects of ionizing- and UV B-radiation on proteins controlling cell cycle progression in human cells: comparison of the MCF-7 adenocarcinoma and the SCL-2 squamous cell carcinoma cell line. **International Journal of Radiation Biology**, v.70, p.261-271, 1996.

HALLSWORTH, J.E.; MAGAN, N. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.74, p.261-266, 1999.

HARMON, J.D. Keeping pace with cockroaches. **Pest Control Technology**, v.22, p.42-44, 1994.

HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. **Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics**. New York: Elsevier Science Publishers, 1976. 285p.

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

HEINRICH, B. The hot-blooded insects. Cambridge: Harvard University Press, 1993. p.601.

HORN, S.C. **Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos no Brasil**. Boletim de Defesa Sanitária Animal, N° Especial, 1983.

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

IGNOFFO, C.M.; PUTTLER, B.; HOSTETTER, D.L.; DICKERSON, W.A. Susceptibility of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatali*, to several isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.28, p.259-262, 1976.

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.

KAAYA, G.P.; MWANGI, E.N.; OUNA, E.A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous

fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.67, p.15-20, 1996.

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

KAWAMURA, C.; TSUJIMOTO, T.; TSUGE, T. Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternate*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, p.59-63, 1999.

KELLER, S. The *Beauveria – Melolontha* project: experiences with regard to locust and grasshopper control. In: LOMER, C. J.; PRIOR, C. **Biological Control of Locusts and Grasshoppers**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 279-286.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; DAVID, J.C.; STALPERS, J.A. Dictionary of the fungi. Wallingford: CAB International, 2001.

KIRKLAND, B.H.; WESTWOOD, G.S.; KEYHANI, N.O. Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to ixodidae species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. **Journal of Medical Entomology**, v.41, p.705-711, 2004.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v.5, p.150-163, 2004.

LELAND, J.E.; BEHLE, R.W. Coating *Beauveria bassiana* with lignin for protection from solar radiation and effects on pathogenicity to *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae). **Biocontrol Science and Technology**, v.15, p.309-320, 2005.

LEWONTIN, R.C. **The genetic basis of evolutionary change**. New York: Columbia University Press.

LIU, H.; SKINNER, M.; BROWNBRIGDE, M.; PARKER, B.L. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.82, p.139-147, 2003.

LUZ, C.; TIGANO, M.S.; SILVA, I.G.; CORDEIRO, C.M.T.; ALJANABI, S. M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p.839-846, 1998.

MACLEOD, D.M. Investigations of the genera *Beauveria* Vuill. And *Tritirachium* Limber. **Canadian Journal of Botany**, v.32, p.818-890, 1954.

MADRONICH, S. UV radiation in the natural and perturbed atmosphere. In: TEVINI, M. **UV-B Radiation and Ozone Depletion**. Lewis: Boca Raton, 1993. p.17-69.

- MAGAN, N. Fungi in extreme environments. In: WICKLOW, D.T.; SODERSTROM, B.E. **Environmental and Microbial Relationships**. New York: Springer, 1997.
- MAUER, P.; COUTEAUDIER, Y.; GIRARD, P.A.; BRIDGE, P.A.; RIBA, G. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. **Mycological Research**, v.101, p. 159-164, 1997.
- McCAMMON, S.A.; RATH, A.C. Separation of *Metarhizium anisopliae* strains by temperature-dependent germination rates. **Mycological Research**, v.98, p.1253-1257, 1994.
- McGAUGHEY, W.H. Insect resistance to biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, v.229, p.193-195, 1985.
- MEUNIER, J.R.; GRIMONT, P.A.D. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Research in Microbiology**, v.144, p.373-379, 1993.
- MICALES, J.A.; ALFENAS, A.C.; BONDE, M.R. Isoenzimas na taxonomia e na genética de fungos. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Minas Gerais: Ed. UFG, 1998. p.447-502.
- MILNER, R.J.; HUPPATZ, R.J.; SWARIS, S.C. A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.57, p.121-123, 1991.
- MILNER, R.J.; STAPLES, J.A.; LUTTON, G.G. The selection of an isolate of the hyphomycete fungus, *Metarhizium anisopliae*, for control of termites in Australia. **Biological Control**, v.11, p.240-247, 1998.
- MOHAMED, A.K.A.; SIKOROWSKI, P.P.; BELL, J.V. The susceptibility of *Heliothis zea* larvae to *Nomuraea rileyi* at various temperatures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.21, p.444-459, 1977.
- MONTEIRO, S.G.; BAHIENSE, T.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre a fase parasitária do carrapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) Schulze, 1937 (Acari: Ixodidae). **Ciência Rural, Santa Maria**, v.33, p.559-563, 2003.
- MOORE, D.; BRIDGE, P.D.; HIGGINS, P.M.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C. Ultra-violet radiation-damage to *Metarhizium flavoviridae* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. **Annals of Applied Biology**, v.122, p.605-616, 1993.
- MORAES, A. M. L. Análise fenotípica e genotípica de cepas de *Aspergillus* Seção Circumdati isoladas de insetos. 2003. 117p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- MORLEY-DAVIES, J.; MOORE, D.; PRIOR, C. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. **Mycological Research**, v.100, p.31-38, 1996.

- MUELLER, U.G.; WOLFENBARGER, L.L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Tree**, v.14, p.389-394, 1999.
- MUGNAI, L.; BRIDGE, P.D.; EVANS, H.C. A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. **Mycological Research**, v.92, p.199-209, 1989.
- MWANGI, E.N.; KAAYA, G.P.; ESSUMAN, S. Experimental infections of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, and natural infections of some ticks with bacteria and fungi. **Journal of African Zoology**, v.109, p.151-160, 1995.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **American Nature**, v.106, p.283-292, 1972.
- NEUVÉGLISE, C.; BRYGOO, Y.; VERCAMBRE, B.; RIBA, G. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. **Mycological Research**, v.98, p.322-328, 1994.
- NEUVÉGLISE, C.; BRYGOO, Y.; RIBA, G. 28S rDNA group I introns: a powerful tool for identifying strains of *Beauveria brongniartii*. **Molecular Ecology**, v.6, p.373-381, 1997.
- NICHOLSON, W.L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H.J.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.548-572, 2000.
- NOVENTA JORDÃO, M.A.; COUTO, R.M.; GOLDMAN, M.H.S.; AGUIRRE, J.; CAPLAN, A.; TEREZI, H.F.; GOLDMAN, G.H. Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings. **Microbiology**, v.145, p.3229-3234, 1999.
- OMOTO, C.; ALVES, S.B. Mecanismos de defesa de insetos contra entomopatógenos. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.55-73.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; AZEVEDO, J.L. Parasexuality in *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.57, p.172-176, 1991.
- 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 Biotechnology**, v.17, p.241-251, 2001.
- PENNA, V. M. **Boophilus microplus: a resistência genética do hospedeiro como forma de controle**. Belo Horizonte: Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG, 1990. 65p.
- PETCH, T. Studies in entomogenous fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v.10, p.244-371, 1926.
- PETIT-FRÈRE, C.; CLINGEN, P.H.; ARLETT, C.F.; GREEN, M.H.L. Inhibition of RNA and DNA synthesis in UV-irradiated normal human fibroblasts is correlated with pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct formation. **Mutation Research**, v.354, p.87-94, 1996.
- PETROCELLI, T.; SLINGERLAND, J. UV-B induced cell cycle check-points in an early stage human melanoma line WM35. **Oncogene**, v.19, p.4480-4490, 2000.

POLAR, P.; DE MURO, M.A.; KAIRO, M.T.K.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S.A. ROACH-BENN, C. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. **Veterinary Parasitology**, v.134, p.159-167, 2005a.

POLAR, P.; DE MURO, M.A.; KAIRO, M.T.K.; PETERKIN, D.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S.A. Assessment of fungal isolates for development of a myco-acaricide for cattle tick control. **Vector Borne and Zoonotic Disease**, v.5, p.276-284, 2005b.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MacDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v.5, p.141-238, 1953.

PONTECORVO, G. The parasexual cycle in fungi. **Annual Review of Microbiology**, v.10, p.393-400, 1956.

POPRAWSKI, T.J.; RIBA, G.; JONES, W.A.; AIOUN, A. Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from *Sitona* Weevils (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, v.17, p.275-279, 1988.

PRETTE, N.; MONTEIRO, A.C.; GARCIA, M.V.; SOARES, V.E. Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.35, p.855-861, 2005.

QUINLAN, J. Use of fungi to control insects in glasshouses. In: BURGE, M.N. **Fungi in Biocontrol Control Systems**. Manchester: Manchester University Press, 1988. p.19-36.

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.

RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.88, p.116-125, 2005.

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.

RATH, A.C.; ANDERSON, G.C.; WORLEDGE, D.; KOEN, T.B. The effect of low temperatures on the virulence of *Metarhizium anisopliae* (DAT F-001) to the subterranean scarab, *Adoryphorus couloni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.65, p.186-192, 1995.

REHNER, S.A. Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*. In: VEGA, F.E.; BLACKWELL, M. **Insect-fungal Association Ecology and Evolution**. New York: Oxford University Press, 2005.



REHNER, S.A.; BUCKLEY, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, v.97, p.84-98, 2005.

REHNER, S.A.; POSADA, F.; BUCKLEY, E.P.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; VEGA, F.E. Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s.l. pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.93, p.11-21, 2006.

REIS, R.C.S.; MELO, D.R.; SOUZA, E.J.S.; 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, p.544-547, 2001.

RIBA, G.; BOUVIER-FOURCADE, I.; CAUDAL, A. Isoenzymes polymorphism in *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) entomogenous fungi. **Mycopathologia**, v.96, p.161-169, 1986a.

RIBA, G.; RAVELOJOANA, A.A.M. The parasexual cycle in the entomopathogenous fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) Brown and Smith. **Canadian Journal of Microbiology**, v.30, p.922-926, 1984.

RIBA, G.; SOARES, G.G.; Jr.; SAMSON, R.A.; ONILLON, J.; CAUDAL, A. Isoenzyme analysis of isolates of the entomogenous fungi *Tolypocladium cylindrosporum* and *Tolypocladium extinguens* (Deuteromycotina; Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 48, 362-367, 1986b.

RIVALIER, E.; SEYDEL, S. Nouveau procédé de culture sur lames gélosés appliqué a l'étude microscopique de champignons deteignes. **Annals of Parasitology**, v.10, p.444-452, 1932.

ROBERTS, D.W.; CAMPBELL, A.A. Stability of entomopathogenic fungi. In: IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L. **Environmental Stability of Microbial Insecticides**. Lanham: Entomological Society of America, 1977. p.19-76.

ROBERTS, D.W.; HAJEK, A.E. Entomopathogenic fungi as bioinsecticides. In: LEATHAM, G.F. **Frontiers in Industrial Mycology**. New York: Chapman & hall, 1992. p.144-159.

RODDAM, L.F.; RATH, A.C. Isolation and characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* from subantartic Macquarie Island. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.69, p.285-288, 1997.

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.

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

SAMSINAKOVA, A. *Beauveria globulifera* (Speg.) Pic. Lako Parasit. Klistete *Ixodes ricinus*. **Zoologie List.**, v.6, p.329-30, 1957.

SAMSON, R.A.; EVANS, H.C. Two new *Beauveria* spp. from South America. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.39, p.93-97, 1982.

SCHAERFFENBERG, B. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarhizium*. **Journal of Insect Pathology**, v.6, p.8-20, 1964.

SCHIERWATER, B.; ENDER, A. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. **Nucleic Acids Research**, v.21, p.4647-4648, 1993.

SCOTT, J.; STRAUS, N. A review of current methods in DNA fingerprinting. In: **Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification**. New York, Harwood Academic Publishers, 2000. p.209-224.

SEKHON, A.S.; PADHYE, A.A.; KAUFMAN, L.; GARG, A.K.; AJELLO, L.; AMBROSIE, E.; PANTER, T. Antigenic relationships among pathogenic *Beauveria bassiana* with *Engyodontium album* (= *B. alba*) and non-pathogenic species of the genus *Beauveria*. **Mycopathologia**, v.138, p.1-4, 1997.

SETLOW, B.; SETLOW, P. Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.4109-4112, 1995.

SETLOW, B.; SETLOW, P. Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.3486-3495, 1996.

SETLOW, B.; SETLOW, P. Heat killing of *Bacillus subtilis* spores in water is not due to oxidative damage. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, p.4109-4112, 1998.

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.66, p.199-205, 2000.

SMITS, N.; BRIERE, J.F.; FARGUES, J. Comparison of non-linear temperature-dependent development rate models applied to *in vitro* growth of entomopathogenic fungi. **Mycological Research**, v.107, p.1476-1484, 2003.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.

SOARES, G.G.; MARCHAL, M.; FERRON, P. Susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera, Curculionidae) larvae to *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviridae* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) at two different temperatures. **Environmental Entomology**, v.12, p.1886-1890, 1983.

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

SOSA-GÓMEZ, D.R.; ALVES, S.B.; TIGANO-MILANI, M. Characterization and phenetic analysis of geographical isolates of *Beauveria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, p.401-409, 1994.

SOUZA, E.J.; REIS, R.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Evaluation of *in vitro* effect of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on eggs and larvae of *Amblyomma cajennense*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.8, p.127-131, 1999.

ST LEGER, R.J.; ALLEE, L.L.; MAY, B.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. World wide distribution of genetic variation in *Beauveria* spp. **Mycological Research**, v.96, p.1007-1015, 1992a.

ST LEGER, R.J.; MAY, B.; ALLEE, L.L.; FRANK, D.C.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.60, p.89-101, 1992b.

SUWANNAKUT, S.; BOUCIAS, D.G.; WIWAT, C. Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid hosts. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.90, p.169-176, 2005.

TIAN, G. F. Infecting and killing *Hyalomma detritum* with fungi. **Journal of Veterinary Science and Technology**, v.7, p.11-13, 1984.

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

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

TIGANO-MILANI, M.S.; HONEYCUTT, R.J.; LACEY, L. A.; ASSIS, R. ; Mc CLELLAND, M.; SOBRAL, B.W.S. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.65, p.274-282, 1995b.

TIGANO-MILANI, M.S.; CARNEIRO, R.G.; FARIA, M.R.; FRAZÃO, H.S.; McCOY, C.W. Isozyme characterization and pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* and *Paecilomyces lilacinus* to *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) and *Meloidogyne javanica* (Nematoda: Tylenchidae). **Biological Control**, v.5, p.378-382, 1995c.

TUVESON, R.W.; McCOY, C.W. Far-ultraviolet sensitivity and photoreactivation of *Hirsutella thompsonii*. **Annals of Applied Biology**, v.101, p.13-18, 1982.

VARELA, A.; MORALES, E. Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.67, p.147-152, 1996.

VIAUD, M.; COUTEAUDIER, Y.; LEVIS, C.; RIBA, G. Genome organization in *Beauveria bassiana*: electrophoretic karyotype, gene mapping and telomeric fingerprints. **Fungal Genetics and Biology**, v.20, p.175-183, 1996.

VICENTINI, S.; FARIA, M.; OLIVEIRA, M.R.V. Screening of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates against nymphs of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) with description of a new bioassay method. **Biological Control**, v.30, p.97-103, 2001.

VUILLEMIN, P. *Beauveria*, nouveau genre de Verticilliacies. **Bulletin de la Société Botanique de France**, v.59, p.34-40, 1912.

WANG, C.; SHAH, F.A.; PATEL, N.; LI, Z.; BUTT, T.M. Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structure of *Beauveria bassiana*. **Environmental Microbiology**, v.5, p.908-915, 2003.

WANG, S.; MIAO, X.; ZHAO, W.; Bo HUANG; FAN, M.; LI, Z.; HUANG, Y. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). **Mycological Research**, v.109, p.1364-1372, 2005.

WANG, Y.C.; HSU, M.T. Inhibition of initiation of simian virus 40 DNA replication during acute response of cells irradiated by ultraviolet light. **Nucleic Acids Research**, v.24, p.3149-3157, 1996.

WASTI, S.S.; HARTMANN, G.C. Experimental parasitization of larvae of the gypsy moth, *Porthetria dispar*. (L.), with the entomogenous fungus, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. **Parasitology**, v.70, p.341-346, 1975.

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

WHARTON, R.H. Acaricide resistance and cattle tick control. **Australian Veterinary Journal**, v.43, p.394-398, 1967.

WHARTON, R. H. Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus*. In: PAL, R.; WHARTON, R. H. **Control of arthropods of medical and veterinary importance**. London: Plenum Press, 1974.

WILL III, O.H.; DIXON, D.; BIRNEY, A.; THOMAS, P.L. Effects of far UV and visible light on germination of wild type and albino teliospores of *Ustilago nuda*. **Journal of Plant Pathology**, v.9, p.225-229, 1987.

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

ZIMMERMANN, G. Effect of high-temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.40, p.36-40, 1982.

ZIMMERMAN, G. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. **Pesticide Science**, v.37, p.375-379, 1993.