

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFOFISIOLÓGICA DE  
DIFERENTES ISOLADOS DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO  
*Metarhizium anisopliae* E ANÁLISE MORFOLÓGICA DO  
PROCESSO DE INFECÇÃO EM *Boophilus microplus*

Tese de Doutorado

WALQUÍRIA ARRUDA

Porto Alegre, 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Caracterização Molecular e Morfofisiológica de Diferentes Isolados do  
Fungo Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e Análise  
Morfológica do Processo de Infecção em *Boophilus microplus*

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Walquíria Arruda

Orientadores: Profa. Marilene Henning Vainstein

Prof. Augusto Schrank

Porto Alegre, 2005

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica e de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

À minha família, pela força e pela  
presença constante, todos os dias.

Ao Adilson, pelo imenso carinho,  
incentivo, apoio e companheirismo.  
Sem você nada disto seria possível.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus orientadores Profa. Marilene H. Vainstein e Prof. Augusto Schrank pela oportunidade, orientação, sugestões e apoio.

À Universidade Federal de Goiás e ao Depto de Morfologia, pelo afastamento para continuidade da minha formação.

Ao PICDT/Capes pela bolsa de auxílio.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica, por permitir o uso de suas dependências para preparação e análise ultraestrutural.

Aos professores Elliot W. Kitajima e Henrique B. Ferreira, membros da comissão de acompanhamento, pelas sugestões e ao Prof. Arnaldo Zaha por atuar como relator desta tese.

Ao Prof. Giancarlo Pasquali pelas facilidades do seqüenciamento.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia.

A Dr. Maria Fátima Grossi de Sá pela oportunidade de estágio na Embrapa-Cenargen.

Aos secretários da Pós-graduação, Sílvia e Luciano, pela disponibilidade e atenção.

Aos funcionários da esterilização, Sr. Milton e Paulo, pela ajuda constante na preparação de meios e soluções.

Aos colegas dos laboratórios 208 e 213 pela agradável convivência e em especial a Irina pela amizade e auxílio na parte de microscopia, a Josi pela amizade e confiança e a Lúcia e Roberta pelo carinho.

Aos colegas do laboratório 205 pelo convívio, em especial ao César pelos ensinamentos na parte de BioMol.

Aos demais colegas do Centro de Biotecnologia.

Ao Marcos Oliveira de Carvalho pelo auxílio na construção da árvore filogenética.

A todos que de uma maneira ou de outra contribuíram para o desenvolvimento desta tese.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xvi</b>
<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO I: ANÁLISE MOLECULAR E MORFOFISIOLÓGICA DE DIFERENTES ISOLADOS DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO <i>METARHIZIUM</i>.</b>	<b>21</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
1.1. <i>Metarhizium anisopliae</i>	21
1.2. Micovírus e <i>Metarhizium</i> spp.	25
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
3.1. Material Biológico	29
3.2. Manutenção dos Isolados	29
3.3. Extração de Ácidos Nucléicos	31
3.4. Amplificação do rDNA por PCR	32
3.5. Seqüenciamento e Análises Filogenéticas	33
3.6. Tratamento com a Enzima Nuclease S1	33
3.7. Caracterização Morfológica dos Conídios por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	34
3.8. Bioensaios	34
3.9. Avaliação do Efeito da Temperatura	35
3.10. Avaliação do Efeito do pH	36
3.11. Análises Estatísticas	36
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>37</b>
4.1. Amplificação do rDNA e Seqüenciamento	37
4.2. Tratamento com a Enzima Nuclease S1	40
4.3. Análise Morfológica de Colônias e dos Conídios dos Isolados de <i>Metarhizium</i>	41
4.5. Efeito da Temperatura no Crescimento e Esporulação dos Isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	49
4.6. Efeito do pH no Crescimento e Esporulação dos Isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	52
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>56</b>

<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO II: ANÁLISE MORFOLÓGICA DO PROCESSO DE INFECÇÃO DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i> SOBRE O CARRAPATO <i>BOOPHILUS MICROPLUS</i></b>	<b>70</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>70</b>
1.1. Controle Biológico	70
1.2. O Processo de Infecção	74
1.2.1. Ciclo Patógeno-Hospedeiro	77
1.3. O Carrapato <i>Boophilus microplus</i>	78
1.3.1. Métodos de Controle	81
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>86</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>87</b>
3.1 Material Biológico	87
3.2. Bioensaios	87
3.3. Análises Microscópicas	89
3.3.1. Microscopia Óptica (MO)	89
3.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	89
3.3.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	90
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>92</b>
4.1. Infecção do Carrapato <i>Boophilus microplus</i>	92
4.1.1. Microscopia Óptica (MO)	92
4.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	96
4.1.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	101
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>119</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>126</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>135</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

μg	micrograma
μl	microlitro
μm	micrômetro
cm	centímetro
CTAB	cetiltrimetilamônio bromide
dsRNA	RNA dupla fita
EDTA	ácido etileno diamianino tetracético
g	grama
h	horas
ITS	espaço transcrito interno
kV	kilovolts
M	molar
MCc	Meio de Cove completo
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MEV	microscopia eletrônica de varredura
mg	miligrama
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
ng	nanograma
nm	nanometro
°C	graus Celsius
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecilsulfato de sódio
s	segundo

spp	espécies
Tris	2-amino-2-hidroxi-metilpropano-1,3-diol
Tween	polisorbitano
U	unidades
v/v	volume por volume
var	variedade

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

Figura 1	Detalhes morfológicos de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> .	21
Figura 2	Região da repetição ribossômica utilizada para amplificação do DNA de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	32
Figura 3	Eletroforese em gel de agarose (0,8%) do produto da PCR da região do rDNA dos isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	37
Figura 4	Árvore filogenética da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 28 isolados e 10 linhagens representativas de <i>Metarhizium</i> spp. com o número de acesso indicado.	39
Figura 5	Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos ácidos nucleicos totais de <i>Metarhizium</i> spp. após tratamento com S1 Nuclease.	41
Figura 6	Morfologia da colônia dos diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	42
Figura 7	Eletromicrografia de varredura dos conídios dos diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	43
Figura 8	Patogenicidade de diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp. em teleóginas de <i>Boophilus microplus</i> ao 4° dia de infecção.	45
Figura 9	Patogenicidade de diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp. em teleóginas de <i>Boophilus microplus</i> do 1° ao 4° dia de infecção.	45
Figura 10	Microscopia eletrônica de varredura do carrapato <i>Boophilus microplus</i> infectado com <i>Metarhizium anisopliae</i> isolados CG97 e CG30.	47
Figura 11	Detalhe do início da germinação, tubo germinativo e ponta da hifa durante o processo de infecção de <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado CG97 na superfície da cutícula do carrapato <i>Boophilus microplus</i> .	48
Figura 12	Influência da temperatura no desenvolvimento da colônia de diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	50
Figura 13	Influência da temperatura na esporulação de diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	51
Figura 14	Influência do pH 4,0 no desenvolvimento da colônia e esporulação de diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	53
Figura 15	Influência do pH 5,0 no desenvolvimento da colônia e esporulação de diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	53
Figura 16	Influência do pH 6,0 no desenvolvimento da colônia e esporulação de diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	54

Figura 17	Influência do pH 7,0 no desenvolvimento da colônia e esporulação de diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	54
Figura 18	Influência do pH 8,0 no desenvolvimento da colônia e esporulação de diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	55
Figura 19	Influência do pH 9,0 no desenvolvimento da colônia e esporulação de diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	55

## Capítulo II

Figura 1	Esquema da cutícula dos artrópodes.	75
Figura 2	Ciclo do carrapato <i>Boophilus microplus</i> .	80
Figura 3	Metodologia utilizada para o bioensaio.	88
Figura 4	Infecção de teleóginas do carrapato <i>Boophilus microplus</i> com <i>Metarhizium anisopliae</i> .	93
Figura 5	Fotomicrografia do tegumento do carrapato <i>Boophilus microplus</i> controle evidenciando as camadas da cutícula.	94
Figura 6	Fotomicrografia da cutícula do carrapato <i>Boophilus microplus</i> infectada com <i>Metarhizium anisopliae</i> .	95
Figura 7	Eletromicrografia de varredura de carrapatos <i>Boophilus microplus</i> controle e tratados com <i>Metarhizium anisopliae</i> .	98
Figura 8	Eletromicrografia da cutícula dissecada do carrapato <i>Boophilus microplus</i> após 48 h de infecção com <i>Metarhizium anisopliae</i> .	98
Figura 9	Detalhe da formação do tubo germinativo, apressório e penetração das hifas de <i>Metarhizium anisopliae</i> na superfície do carrapato <i>Boophilus microplus</i> .	99
Figura 10	Eletromicrografia de varredura de carrapatos <i>Boophilus microplus</i> infectados com <i>Metarhizium anisopliae</i> .	100
Figura 11	Detalhe da direta penetração por pressão mecânica e degradação enzimática da hifa de <i>Metarhizium anisopliae</i> na cutícula de <i>Boophilus microplus</i> .	101
Figura 12	Eletromicrografia de transmissão da cutícula do carrapato <i>Boophilus microplus</i> controle.	102
Figura 13	Ultraestrutura de diferentes estágios de desenvolvimento (germinação) dos conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> presente na superfície da cutícula de <i>Boophilus microplus</i> .	104
Figura 14	Ultraestrutura das células apressoriais de <i>Metarhizium anisopliae</i> na	105

superfície da cutícula de *Boophilus microplus* com 24 h de infecção.

- Figura 15 Eletromicrografia de transmissão dos conídios de *Metarhizium anisopliae* na superfície da cutícula de *Boophilus microplus* com 24 h de infecção 105
- Figura 16 Eletromicrografia de transmissão da cutícula do carrapato *Boophilus microplus* após 24 h de infecção com *Metarhizium anisopliae*. 108
- Figura 17 Eletromicrografia de transmissão do fungo *Metarhizium anisopliae* (isolado E6) na cutícula do carrapato *Boophilus microplus* após 24 h de infecção. 109
- Figura 18 Eletromicrografia de transmissão da cutícula de *Boophilus microplus* com 24 h de infecção com *Metarhizium anisopliae* evidenciando o regular espaço existente no ponto de união entre o fungo (região da célula apressorial) e endocutícula. 110
- Figura 19 Eletromicrografia de transmissão da cutícula de *Boophilus microplus* com 48 h de infecção com *Metarhizium anisopliae* isolado E6. 110
- Figura 20 Eletromicrografia de transmissão de um corpo de hifa presente na procutícula do carrapato *Boophilus microplus* com 24 h de infecção com *Metarhizium anisopliae*. 111
- Figura 21 Eletromicrografia de transmissão de um corpo de hifa presente na cutícula de *Boophilus microplus* após 48 h de infecção com *Metarhizium anisopliae*. 111
- Figura 22 Eletromicrografia de transmissão da cutícula do carrapato *Boophilus microplus* com 96 h de infecção com *Metarhizium anisopliae* isolado E6 evidenciando o intenso desenvolvimento de hifas na procutícula. 112
- Figura 23 Eletromicrografia de transmissão dos corpos de hifas *Metarhizium anisopliae* na cutícula de *Boophilus microplus* com 96 h de infecção. 112
- Figura 24 Detalhes ultraestruturais da hifa de *Metarhizium anisopliae* na cutícula de *Boophilus microplus*. 113
- Figura 25 Eletromicrografia de transmissão da cutícula de *Boophilus microplus* infectada com *Metarhizium anisopliae* evidenciando a grande destruição da procutícula ocasionada pela presença de vacúolos e hifas na procutícula. 114
- Figura 26 Fotomicrografia dos ovos do carrapato *Boophilus microplus*. 116
- Figura 27 Eletromicrografia de varredura dos ovos do carrapato *Boophilus microplus*. 116
- Figura 28 Eletromicrografia de varredura dos ovos do carrapato *Boophilus microplus* com 2 dias de infecção com *Metarhizium anisopliae*. 117
- Figura 29 Eclosão dos ovos de *Boophilus microplus* controle e tratados com *Metarhizium anisopliae*. 118

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

Tabela 1	Lista dos isolados de <i>Metarhizium</i> spp. analisados.	30
----------	---	----

### Capítulo II

Tabela 1	Alguns produtos à base de <i>Metarhizium</i> spp. registrados ou em desenvolvimento comercial.	73
----------	--	----

Tabela 2	Produtos químicos utilizados para o controle do carrapato <i>Boophilus microplus</i> .	83
----------	--	----

## RESUMO

A caracterização molecular e morfofisiológica de 28 isolados de *Metarhizium* ssp. foi avaliada por análises de seqüências do espaçador transcrito interno (ITS1 e ITS2), presença de elementos dsRNA e taxa de crescimento e esporulação em diferentes temperaturas e pH. A patogenicidade de 19 isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium* ssp. foi avaliada para fêmeas ingurgitadas do carrapato *Boophilus microplus*. As alterações cronológicas durante o processo de infecção *Metarhizium anisopliae* isolado E6 em *B. microplus* foi avaliada em detalhe por microscopia óptica e eletrônica de varredura e transmissão. O seqüenciamento do espaçador transcrito interno confirmou a identidade taxonômica dos isolados avaliados como *M. anisopliae* var. *anisopliae* ou *M. anisopliae* var. *majus* e mostrou que dois isolados (CG291 e CG423), previamente classificados como *Metarhizium flavoviride*, são pertencentes a *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Os testes sobre a influência da temperatura e pH no desenvolvimento e esporulação dos isolados evidenciaram que a melhor temperatura de crescimento para a maioria desses foi 28°C e que o crescimento foi ótimo na faixa de pH entre 4 a 9. Os bioensaios mostraram que três isolados (C14, CG47 e CG97) foram altamente patogênicos para fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* sendo tão virulentos quanto o isolado E6, previamente analisado, causando cerca de 90-100% de mortalidade ao 4º dia de infecção. Outros isolados foram menos virulentos ou não mostraram virulência para o carrapato. A presença de dsRNA foi avaliada em 28 isolados e detectada em 21 isolados. Vários padrões de dsRNA foram observados baseados no tamanho molecular analisado por eletroforese em gel de agarose. Nenhuma correlação foi observada entre a presença de dsRNA e a virulência do fungo. As observações microscópicas evidenciaram que o fungo *M. anisopliae* isolado E6 invade seu hospedeiro por penetração direta da cutícula, sendo que este processo envolveu as etapas de adesão e germinação dos conídios, formação do apressório e penetração do fungo na cutícula do hospedeiro. A adesão e germinação dos conídios na superfície da cutícula se iniciou após 24 h de infecção. Neste mesmo tempo, ocorreu diferenciação do apressório, estrutura que exerce a pressão mecânica durante o processo de penetração, sendo que este processo é facilitado pela ação de enzimas

hidrolíticas secretadas pelo fungo. A penetração de algumas hifas ocorreu até 24 h após a infecção do fungo, embora, neste mesmo tempo de infecção, a maioria dos conídios ainda estivesse em processo de germinação. A penetração em massa do fungo foi observada 72 h após a infecção e, após 96 h, as hifas emergiram na superfície da cutícula para originarem novos conídios e assegurarem a perpetuação do fungo. A intensa invasão das hifas nos tecidos adjacentes confirmou a eficácia do isolado E6 na infecção do carrapato *B. microplus*.



## ABSTRACT

The molecular and morphophysiological characterization of 28 isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium* spp. was analyzed by sequence data of the internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2), temperature and pH rate and by the presence of dsRNA elements. The pathogenicity of 19 *Metarhizium* ssp. isolates against *Boophilus microplus* engorged females was also evaluated. The chronological and histological alterations of *Metarhizium anisopliae* during the interaction with one of its hosts, the cattle tick *B. microplus*, were investigated by light, scanning and transmission electron microscopy. The molecular characterization using the analysis of sequence data of internal transcribed spacer confirmed the taxonomic identity of the isolates as *M. anisopliae* var. *anisopliae* or *M. anisopliae* var. *majus* and it showed that two isolates (CG291 and CG423), considered as *Metarhizium flavoviride*, clustered as *M. anisopliae* var. *anisopliae*. The temperature and pH tests showed that *M. anisopliae* isolates grew optimally at 28°C and the growth of isolates were optimal from pH 4 to 9. Bioassays showed three *M. anisopliae* isolates (C14, CG47 and CG97) very pathogenic to *B. microplus* engorged females. These isolates, likewise the isolate E6, were the most virulent and it caused around 90-100% mortality on day 4 post infection. The other isolates evaluated were less virulent or no virulent to *B. microplus* tick. All isolates were tested for the presence of dsRNA genomes and 21 out of 28 isolates revealed the presence of dsRNA bands. Several dsRNA patterns were observed based on molecular size determined by electrophoresis. When the virulence of different isolates with and without dsRNA was compared, no significant differences were observed. *M. anisopliae* isolate E6 invades the host *B. microplus* by direct penetration through cuticle. This process involves adhesion of conidia on the cuticle, conidia germination, appressoria formation and penetration itself. Twenty-four hours post-infection conidia are adhered and germination starts on the host cuticle surface. At this time, the conidia differentiate to form appressoria exerting mechanical pressure and trigger hydrolytic enzyme secretion, which leads to penetration through host cuticle. The penetration of some hyphae occurs within 24 h post-inoculation, although, by this time, most conidia are only starting to germinate. Massive penetration is observed at 72 h post-inoculation and at 96 h

the hyphae start to emerge from the cuticle surface to form conidia and ensure fungal perpetuation. The hyphae intense invasion in adjacent tissues was observed by light microscopy, confirming the effectiveness of *M. anisopliae* to infect the tick *B. microplus* and to produce significant morphological alterations in the cuticle.

## JUSTIFICATIVA

O controle biológico de insetos praga da agricultura por fungos entomopatogênicos, em especial por *Metarhizium anisopliae*, vem sendo ampla e continuamente estudado, tendo-se, atualmente, formulações comerciais para o controle de alguns deles, como a cigarrinha da cana de açúcar. Um grande interesse vem sendo apontado para o controle biológico de carrapatos, visto que estes artrópodes são ectoparasitas hematófagos de várias espécies de mamíferos. A espécie *Boophilus microplus* é comumente denominada de carrapato do boi, apresentando grande importância econômica para a pecuária nacional, por causar diversas injúrias aos seus hospedeiros e acarretar baixas na produção de leite e carne, perda de massa corporal, desvalorização do couro e transmissão de doenças.

O controle de carrapatos é realizado através da utilização de acaricidas químicos, que, por sua vez, ocasionam vários danos, devido à contaminação residual no leite e na carne, além de poluição ambiental e desenvolvimento de resistência pelos carrapatos, elevando os custos de sua utilização. Por tantas desvantagens e em virtude da crescente conscientização da opinião pública sobre os efeitos deletérios da utilização de produtos químicos, é cada vez mais freqüente a busca de novas estratégias de controle que possam reduzir ou até mesmo, substituir a utilização de produtos químicos. Dentro deste contexto, o emprego do controle biológico por fungos entomopatogênicos é uma estratégia promissora, visto que já é comprovado que *M. anisopliae* infecta carrapatos (BITTENCCOURT *et al.*, 1999; FRAZZON *et al.*, 2000) e seu mecanismo de ação parece ser o mesmo relatado para os insetos (por pressão mecânica devido à formação do apressório e por produção de enzimas hidrolíticas que degradam a cutícula do artrópode, além da produção de destruxinas) (CLARKSON & CHANLEY, 1996; BIDOCHKA *et al.*, 1997; KERSHAW *et al.*, 1999).

Em se tratando do desenvolvimento de micoinseticidas, vários fatores são determinantes para a seleção de novos isolados de fungos entomopatogênicos a serem utilizados como agentes de biocontrole, como a correta classificação, resistência a fatores abióticos como a temperatura, e a presença de vírus dsRNA, que pode diminuir sua virulência. O critério mais utilizado para classificação de

fungos entomopatogênicos é baseado na morfologia e tamanho dos conídios. Entretanto novas metodologias com base molecular têm auxiliado os critérios morfológicos no reconhecimento de novos grupos ou variedades. É o caso do seqüenciamento da região ITS ou espaçador transcrito interno, cuja seqüência permite resolver relações evolucionárias das espécies e gêneros de *Metarhizium* (CURRAN *et al.*, 1994; DRIVER *et al.*, 2000).

Associado aos métodos moleculares, a avaliação de isolados resistentes a temperaturas adversas também têm sido utilizada como método de caracterização de isolados de *Metarhizium*, assim como é utilizada para selecionar isolados resistentes a condições ambientais adversas e que podem ser utilizados como agente de biocontrole a campo (YIP *et al.*, 1992; DRIVER *et al.*, 2000). A temperatura é um fator essencial para o desenvolvimento de fungos entomopatogênicos na superfície do hospedeiro, podendo influenciar na infecção e tempo de morte do hospedeiro, sendo considerada um fator de patogenicidade (INGLIS *et al.*, 2001). Além da temperatura, outros fatores são correlacionados com a patogenicidade associado a fungos, como a presença de vírus de dsRNA em seu genoma. Estes micovírus são comuns em vários grupos de fungos, incluindo *M. anisopliae*. Na maioria das vezes, estas infecções são latentes, no entanto, a presença destes elementos está fortemente correlacionada com variações no fenótipo e, principalmente, com o grau de patogenicidade do fungo. Tendo em vista que, *Metarhizium spp.* é um importante patógeno utilizado como agente de controle biológico, a determinação dos fatores que possam afetar a sua patogenicidade, assim como sua correta classificação e entendimento do mecanismo de ação são de fundamental importância para a seleção de novos isolados que possam ser utilizados como potenciais agentes de biocontrole.

#### Referências

- BIDOCHKA, M. J.; ST LEGER, R. J. Mechanisms of Deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *Mem. Entomol. Soc. Can.*, 171:213-224, 1997.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASCARENHAS, A. G.; FACCINI, J. L. H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. *Ciência Rural*, 29:351-354. 1999.

- CLARKSON, J.; CHARNLEY, K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol.*, 4:197-203, 1996.
- CURRAN, J.; DRIVER, F.; BALLARD, J. W. O.; MILNER, R. J. Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycol. Res.*, 98:547-552. 1994.
- DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol. Res.*, 104:134-150. 2000.
- 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*. *Vet. Parasitol.*, 94:117-125. 2000.
- INGLIS, G. D.; GOETTEL, M. S.; BUTT, T. M.; STRASSER, H. Use of Hyfomicetous fungi for managing insect pests. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (eds.) *Fungi as Biological Agents: Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing, p. 23-69, 2001.
- KERSHAW, M. J.; MOORHOUSE, E. R.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S. E.; CHARNLEY, A. K. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *J. Invertebr. Pathol.*, 74:213-223, 1999.
- YIP, H. Y.; RATH, C.; KOEN, T. B. Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabaeidae: Adoryphorus couloni). *Mycol. Res.*, 96:92-96. 1992.

## CAPÍTULO I: ANÁLISE MOLECULAR E MORFOFISIOLÓGICA DE DIFERENTES ISOLADOS DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *METARHIZIUM*.

### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1. *Metarhizium anisopliae*

*Metarhizium* spp. é um fungo filamentoso, entomopatogênico e acaricida. São considerados fungos deuteromicetos pertencentes à classe Hiphomycetes. Apresenta micélio hialino e septado, com conidióforos característicos, sobre os quais surgem conídios (normalmente uninucleados, cilíndricos e de dimensões variáveis) em colunas compactas, (Figura 1). Seu estudo data de 1879, quando o patologista russo Ilya Metschnikoff o isolou de larvas do besouro *Anisopliae austriaca* Hbst, classificando-o como *Entomophthora anisopliae*. Um ano depois, o mesmo pesquisador o descreve como *Isaria destructor*. Mais tarde, em 1883, este fungo foi classificado por Sorokin, como *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, permanecendo assim até os dias atuais (LIMA, 1989; ALVES, 1998).

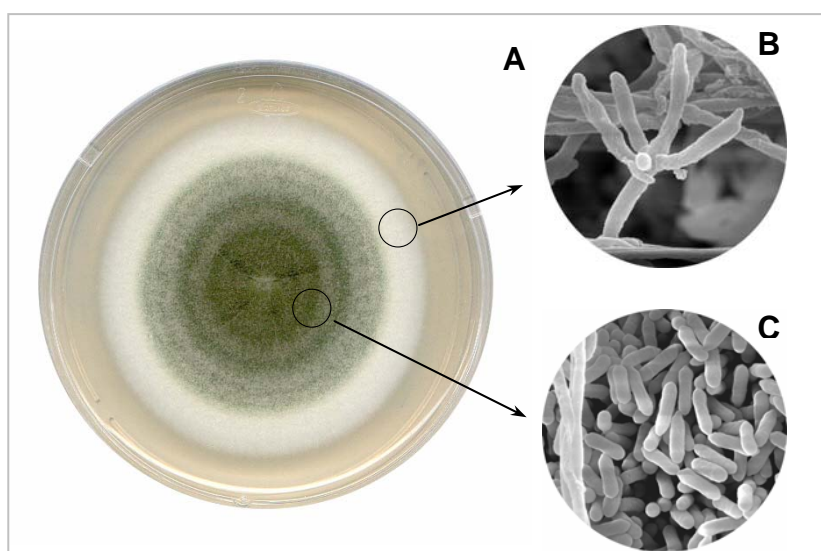


Figura 1. Detalhes morfológicos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. A) Aspecto da colônia do isolado E6 com conídio de coloração verde. B) Conidióforo. C) Morfologia do conídio.

A taxonomia do gênero foi revista inicialmente por TULLOCH (1976), que reconheceu apenas duas espécies: *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal, considerando *Metarhizium album* Petch como sinônimo de *M. anisopliae*. Entretanto, ROMBACH *et al.* (1987) restaurou a espécie *M. album*, considerando-a diferente de *M. anisopliae*. A taxonomia revisada por ROMBACH *et al.* (1987) se baseia na disposição das fiálides e as espécies são distinguidas com base nas características morfológicas dos conídios (forma e cor) e células conidiogênicas (CURRAN *et al.*, 1994). De acordo com esta classificação taxonômica são distinguidas três espécies no gênero *Metarhizium*:

- 1) *M. anisopliae* que apresenta fiálide cilíndrica sustentando cadeias de conídios cilíndricos de cor normalmente verde;
- 2) *M. flavoviride* com fiálide em forma de clave com conídios ovóides a elípticos com coloração normalmente verde;
- 3) *M. album* que apresenta fiálides em forma de clave com conídios ovóides a elípticos de cor branca a marrom (CURRAN *et al.*, 1994).

Na espécie *M. anisopliae* são reconhecidas duas variedades, a var. *majus*, com conídios com comprimento entre 10-14 x 4-6  $\mu\text{m}$ , e a var. *anisopliae*, com conídios com comprimento variando de 5-7 x 2-3  $\mu\text{m}$  (DRIVER & MILNER, 1998). Diferenças quanto à especificidade de hospedeiro são observadas entre as duas variedades. Desta forma, *M. anisopliae* var. *anisopliae* tem um amplo espectro de hospedeiros, sendo encontrado mais freqüentemente infectando insetos tropicais em todo mundo, e *M. anisopliae* var. *majus* infecta preferencialmente larvas de *Oryctes* (Coleoptera) (ROMBACH *et al.* 1987; RAKOTONIRAINY *et al.*, 1994). Na espécie *M. flavoviride*, são distinguidas duas variedades, var. *flavoviride* com conídios com tamanho de 6-11 x 3-5  $\mu\text{m}$  e var. *minus* com conídios com tamanho de 4-7 x 2-3  $\mu\text{m}$  (CURRAN *et al.*, 1994). A espécie *M. album* apresenta conídios com dimensões entre 3-6 x 1,5-2,5  $\mu\text{m}$  (DRIVER & MILNER, 1998).

A precisa identificação de isolados de *Metarhizium* spp. é um pré-requisito para registro e patente de qualquer produto comercial (YIP *et al.*, 1992), para verificar a pureza da produção e para monitorar a persistência e comportamento de um isolado liberado no meio ambiente. Desta forma, outros métodos, além dos critérios morfológicos, têm sido utilizados para caracterizar os isolados de

*Metarhizium* spp. e elucidar possíveis relações evolutivas entre eles e as espécies do gênero. Assim, os critérios morfológicos utilizados para classificação e taxonomia de *M. anisopliae* têm sido complementados com novos critérios para diferenciar as espécies de *Metarhizium* spp. como: temperatura (YIP *et al.*, 1992; McCAMMON & RATH, 1994), análises de isoenzimas (ST LEGER *et al.*, 1992; RAKOTONIRAINY *et al.*, 1994), métodos moleculares baseados em RAPD-PCR (COBB & CLARKSON, 1993; LEAL *et al.*, 1994; BRIDGE *et al.*, 1997), RFLP (PIPE *et al.*, 1995; MAVRIDOU & TYPAS, 1998), RFLP-PCR (LEAL *et al.*, 1997), e análises de seqüências de rDNA (CURRAN *et al.*, 1994; DRIVER *et al.*, 2000).

O rDNA é atualmente utilizado para se obter um estudo detalhado de comparações entre diferentes grupos taxonômicos, fornecendo informações valiosas para estudos filogenéticos. Essas seqüências contêm regiões variáveis e regiões conservadas, permitindo a comparação e/ou discriminação de organismos de diferentes níveis taxonômicos. A análise do rDNA é utilizado em uma ampla variedade de organismos, incluindo leveduras, como *Cryptococcus neoformans* (KATSU *et al.*, 2004), e fungos filamentosos, como *Trichoderma* spp. (HERMOSA *et al.*, 2004), *Beauveria* spp. (GLARE & INWOOD, 1998) e *Metarhizium* spp. (DRIVER *et al.*, 2000).

O rDNA do fungo é organizado em unidades repetidas organizadas em “tandem”. Uma unidade inclui 3 genes rRNA (18S, 5,8S e 28S) e em cada unidade os genes são separados por espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2). As seqüências de rDNA estão presentes em alto número de cópias no genoma do fungo, com considerável variação entre as espécies. Os genes de rRNA de 18S, 5,8S e 28S evoluem lentamente e são, portanto, regiões altamente conservadas entre espécies e gêneros, podendo ser utilizadas para comparar organismos distantes. O espaçador transcrito interno, entre esses genes, evolui bem mais rápido, e são consideradas regiões menos conservadas e freqüentemente utilizadas como uma fonte de heterogeneidade para comparar espécies de fungos dentro de um gênero ou variedades de uma espécie (EDEL, 1998; LIU *et al.*, 2002; SAUFRAMANIEN *et al.*, 2003).

Segundo BRIDGE & ARORA (1998), algumas razões permitem utilizar a região do ITS em estudos de caracterização molecular em fungos, dentre elas:



- 1) o pequeno tamanho das regiões do ITS (cerca de 500-800pb), que permite fácil amplificação por PCR;
- 2) a natureza multicópia da repetição rDNA, o que torna estas regiões fáceis de amplificar, mesmo em amostras diluídas ou degradadas;
- 3) a alta variabilidade desta região entre espécies distintas morfológicamente.

Levando-se em consideração análises de seqüências do rDNA, DRIVER *et al.* (2000) reavaliaram a taxonomia do gênero *Metarhizium* e encontraram um alto nível de diversidade genética entre 123 isolados analisados. Seus resultados confirmaram o monopólio do grupo *M. anisopliae* e os autores reconheceram duas outras variedades (*M. anisopliae* var. *lepidiotum* e *M. anisopliae* var. *acridum*), além de duas novas variedades de *M. flavoviride* (*M. flavoviride* var. *novazealandicum* e *M. flavoviride* var. *pemphigum*). Da mesma forma, utilizando análises de seqüências da região de ITS do rDNA, LIU *et al.* (2001; 2002) identificaram o fungo *M. anisopliae* var. *majus* como sendo a forma anamorfa de *Cordyceps brittlebankisoides*, classificando *M. anisopliae* var. *majus* como um ascomiceto.

O desenvolvimento do fungo em diferentes temperaturas, quando associado à caracterização morfológica dos conídios é um outro critério utilizado para classificação de *Metarhizium* (YIP *et al.*, 1992 e DRIVER *et al.*, 2000). Desta maneira, YIP *et al.* (1992), propuseram um método para classificar e diferenciar 204 isolados de *Metarhizium* baseado na sua capacidade de germinar e se desenvolver em diferentes temperaturas, associado a características morfológicas como tamanho e cor do conídio durante a esporulação. Estes autores sugeriram que isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, podem ser separados em distintos grupos de acordo com a temperatura de crescimento: os capazes de germinar a baixas temperaturas (5°C), considerados espécies *cold-active*; os capazes de germinar a altas temperaturas (37°C), considerados *heat-active*; e os que germinam nas temperaturas intermediárias, considerados *meso-thermoactive*.

Além de ser um fator utilizado para a classificação de isolados de *Metarhizium*, a temperatura, junto com a virulência e a especificidade de hospedeiro, é um importante fator para a seleção de isolados a serem utilizados como micoinseticidas (MILNER, 2000). A temperatura influencia a taxa de

germinação, crescimento e esporulação, assim como a sobrevivência do fungo. Também influencia a taxa de infecção do entomopatógeno e o tempo de morte do hospedeiro (INGLIS *et al.*, 2001). De acordo com McCAMMON & RATH (1994), as condições ambientais onde o fungo será ativo devem ser levadas em consideração na escolha de um isolado para o desenvolvimento de micoinseticida. Por outro lado, OUEDRAOGO *et al.* (1997) relatam que as limitações termais para fungos entomopatógenos não são apenas as condições ambientais, mas também aquelas relacionadas à termorregulação do hospedeiro, que podem reduzir a incidência da doença.

A temperatura ótima para o crescimento da maioria dos entomopatógenos está entre 20 e 25°C, mas a infecção e doença podem ocorrer a temperaturas entre 15 e 30°C. ALVES (1998) descreve que *M. anisopliae* apresenta um crescimento ótimo em temperaturas entre 24 e 30°C e em pH 6,9, tolerando variações de pH entre 2,0 e 8,5. Acima de 30°C, o crescimento vegetativo é inibido, cessando, freqüentemente, a cerca de 37°C. A incapacidade dos fungos entomopatogênicos se desenvolverem em temperaturas acima de 37°C parece ser um forte indício de sua inviabilidade de infecção em mamíferos (INGLIS *et al.*, 2001). Normalmente, os fungos entomopatogênicos não são termofílicos na natureza, sendo praticamente incapazes de crescer a temperaturas superiores a 40°C; no entanto, HALLSWORTH & MAGAN (1999) relataram pela primeira vez, a capacidade de um isolado de *M. anisopliae* crescer a temperatura de 40°C e RANGEL *et al.* (2005) verificaram que isolados de *Metarhizium* são termotolerantes às temperaturas de 40 e 45°C. A capacidade de determinados isolados de *M. anisopliae* se desenvolverem em temperaturas extremas pode ser bastante favorável para seu uso como agente de biocontrole, desta forma, os efeitos da temperatura deveriam ser determinados em novos isolados selecionados para atuar como agentes de biocontrole a campo.

## **1.2. Micovírus e *Metarhizium* spp.**

A presença de RNA fita-dupla (dsRNA) no genoma de fungos é um indicativo comum da presença de micovírus. Na maioria dos casos, os micovírus existem como simples partículas ribonucleoprotéicas intracelulares contendo um

genoma, geralmente RNA fita-dupla (dsRNA), incluso dentro de um capsídio, com cobertura protéica (CASTRO *et al.*, 1999). Geralmente, estes vírus são latentes, uma vez que muitos fungos infectados por micovírus não apresentam sintomas. Entretanto, a presença de elementos de dsRNA é correlacionada com variações particulares no fenótipo do hospedeiro.

Vírus de dsRNA são comumente encontrados infectando diferentes grupos de fungos, incluindo leveduras e fungos filamentosos e sua presença já foi comprovada em várias espécies, incluindo *Penicillium stoloniferum* (DETROY *et al.*, 1978), *Pythium irregulare* (GILLINGS *et al.*, 1993), *Aspergillus* (VARGA *et al.*, 1994; 1998), *Saccharomyces cerevisiae* (WICKNER, 1996), *Beauveria bassiana* (MELZER & BIDOCHKA, 1998), *Botrytis cinerea* (VILCHES & CASTILHO, 1997; CASTRO *et al.*, 1999), *Rhizoctonia solani* (ROBINSON & DEACON, 2002), *Fusarium graminearum* (CHU *et al.*, 2002), *Monilinia fructicola* (TSAI *et al.*, 2004) além de espécies do gênero *Metarhizium* (BOGO *et al.*, 1996; MELZER & BIDOCHKA, 1998; MARTINS *et al.*, 1999; FRAZZON *et al.*, 2000; GIMENEZ-PECCI *et al.*, 2002).

A principal importância relatada para a presença de micovírus inclui sua provável influência na patogenicidade do fungo, ocasionando hipovirulência (McCABE *et al.*, 1999). O primeiro relato da presença de vírus dsRNA associado a diminuição da virulência foi registrado por DAY *et al.* (1977). Estes autores relataram que isolados de *Endothia parasitica* contendo vírus de dsRNA exibiram várias anormalidades morfológicas e foram menos patogênicos que os isolados livres de vírus de dsRNA. Da mesma forma, CASTRO *et al.* (2003) relataram que a presença de micovírus de dsRNA conferiu hipovirulência em *B. cinerea*, sugerindo a relação entre sua presença e a diminuição da virulência do fungo. Além disso, MELZER & BIDOCHKA (1998), CHU *et al.* (2002) e TSAI *et al.* (2004) relataram que infecções por micovírus podem alterar a morfologia da colônia e reduzir a taxa de crescimento e esporulação do fungo. ().

O grande número de micovírus de dsRNA presente em populações naturais de fungos entomopatogênicos foi relatada por MELZER & BIDOCHKA (1998), constatando que cerca de 35,3% dos isolados estudados (de *M. anisopliae* e *B. bassiana*) apresentavam micovírus. A presença desses vírus em *Metarhizium* spp. foi demonstrada por BOGO *et al.* (1996), MELZER &

BIDOCHKA (1998), MARTINS *et al.* (1999), FRAZZON *et al.* (2000) e GIMÉNEZ-PECCI *et al.* (2002). MARTINS *et al.* (1999) relataram pela primeira vez a presença de micovírus não relacionada com hipovirulência em *M. flavoviride*. Por outro lado, FRAZZON *et al.* (2000), observaram que isolados de *M. anisopliae* livres de dsRNA foram mais infectivos para o carrapato *Boophilus microplus* do que isolados que continham esses dsRNA; no entanto, estes mesmos autores não relataram uma correlação entre a presença destes vírus e a virulência dos isolados. GIMÉNEZ-PECCI *et al.* (2002), comparando os níveis de secreção de quitinases com isolados livres ou não de vírus, constataram que os isolados infectados por micovírus secretam menos endoquitinases do que os não-infectados, sugerindo uma possível interferência entre o genoma viral e os genes que codificam endoquitinases.

Pelo fato de *M. anisopliae* ser um importante patógeno utilizado como agente de controle biológico é de grande importância a determinação de correlações entre o caráter de virulência e presença de vírus dsRNA, assim como sua correta classificação e caracterização quanto às suas limitações termais.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

- Caracterizar, em nível molecular e morfofisiológico, diferentes isolados de *Metarhizium* spp.

### 2.2. Específicos

- Sequenciar as regiões do espaçador transcrito interno (ITS1 e ITS2) do rDNA dos isolados de *Metarhizium* spp.;
- Verificar a presença de vírus de dsRNA nos isolados de *Metarhizium* spp.;
- Avaliar a patogenicidade dos isolados de *Metarhizium* spp. em fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Boophilus microplus* e verificar a relação entre a presença de vírus de dsRNA e o grau de virulência de cada isolado;
- Analisar morfológicamente os conídios dos isolados por microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar o efeito da temperatura e do pH no desenvolvimento e na esporulação dos isolados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material Biológico

Os isolados do fungo *Metarhizium* spp. analisados, bem como seus hospedeiros e origem geográfica estão listados na Tabela 1.

Os isolados AL, M5, E6, MT e E9 foram cedidos pelo Dr. João Lúcio Azevedo da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz (ESALQ), USP. Os isolados CG foram obtidos da coleção de fungos entomopatogênicos do Cenargen/EMBRAPA, Brasília,DF, e os isolados C7, C11, C12, C14 e C19 foram cedidos pela Dra. Gloria Angelica Gonzales Hernandez, do Instituto de Investigacion en Biologia Experimental da Universidad de Guanajuato, México. O isolado RJd é um mutante espontâneo derivado do isolado selvagem RJc.

As fêmeas ingurgitadas do carrapato *B. microplus* foram obtidas da criação de bovinos da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

#### 3.2. Manutenção dos Isolados

Os diferentes isolados de *Metarhizium* spp. foram repicados em meio de Cove completo (MCc) (0,6% NaNO<sub>3</sub>, 1% glicose, 0,2% peptona, 0,05% extrato de levedura, 0,15% caseína e 2% de ágar) acrescido de 0,04% de elementos-traço (0,04% Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,4% CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,01% FeSO<sub>4</sub>, 0,8% MnSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,8% NaMnO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,8% ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) e 2% de solução de sais (2,6% KCl, 2,6% MgSO<sub>4</sub>, 7,6% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

A suspensão de conídios foi preparada a partir de culturas esporuladas. Os conídios foram coletados em solução de 0,01% Tween 80, transferidos para tubos e centrifugados a 5000 rpm (centrífuga CENTRA MP4 *International Equipment Company*), por 10 min. O sobrenadante da centrifugação foi descartado e os conídios foram lavados com água destilada esterilizada, novamente centrifugados e então mantidos em solução de glicerol 10%, a 4°C. A contagem dos conídios foi realizada em câmara de Neubauer e a suspensão foi ajustada para uma concentração de  $1 \times 10^8$  conídios.ml<sup>-1</sup> com água destilada esterilizada.

Tabela 1. Lista dos isolados de *Metarhizium* spp. analisados.

<b>Isolado</b>	<b>Espécie</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Origem geográfica</b>
AL	<i>M. anisopliae</i>	<i>Mahanarva postigata</i>	Alagoas
E6	<i>M. anisopliae</i>	<i>Deois flavopicta</i>	Espirito Santo
E9	<i>M. anisopliae</i>	<i>Deois incompleta</i>	Espirito Santo
M5	<i>M. anisopliae</i>	<i>Deois sp</i>	Pernambuco
MT	<i>M. anisopliae</i>	<i>Deois sp</i>	Mato Grosso
RJd	<i>M. anisopliae</i>	Mutante espontâneo	Cbiot/UFRGS/RS
Nordeste	<i>Metarhizium sp</i>	<i>Mahanarva postigata</i>	Pernambuco
C7	<i>M. anisopliae</i>	Não conhecido	México
C11	<i>Metarhizium sp</i>	Não conhecido	México
C12	<i>M. anisopliae</i>	Não conhecido	México
C14	<i>Metarhizium sp</i>	Não conhecido	México
C19	<i>M. anisopliae</i>	Não conhecido	México
CG27	<i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i>	Cultura monosporica	Brasil
CG30 (E6)	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Deois flavopicta</i>	Espirito Santo
CG31 (RJc)	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Deois flavopicta</i>	Rio de Janeiro
CG33	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Deois flavopicta</i>	Mato Grosso
CG46 (E9)	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Deois incompleta</i>	Espirito Santo
CG47 (ARSEF 552)	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Galactica sp</i>	Minas Gerais
CG87 (ESALQ PL43)	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Mahanarva posticata</i>	Alagoas
CG97	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Coleoptera</i>	Brasília
CG125	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Monalonion annulipes</i>	Pará
CG144	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Piezodorus guildinii</i>	Goiás
CG291 (ARSEF 324)	<i>M. flavoviride</i>	<i>Austracnis guttulosa</i>	Austrália
CG320 (ARSEF 297)	<i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i>	<i>Xyloryctes jamaicensis</i>	Samoa Ocidental
CG343 (ARSEF 23)	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Curculio caryae</i>	Carolina do Sul/EUA
CG374 (ATCC 26471)	<i>M. anisopliae</i>	<i>Oryctes monoceros</i>	Ilhas do Sul do Pacífico
CG423	<i>M. flavoviride</i>	<i>Schistocerca pallens</i>	Rio Grande do Norte
CG491	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Deois sp</i>	Paraná

### 3.3. Extração de Ácidos Nucléicos

Frascos contendo 50 ml de meio MCc líquido foram inoculados com uma suspensão de conídios suficiente para se obter uma concentração de  $1 \times 10^6$  conídios. $\text{ml}^{-1}$ . A incubação foi realizada com agitação de 100 rpm em shaker (TE-420 TECNAL), a 28°C, por 48 a 72 h. Após o tempo de incubação, o micélio foi coletado por filtração a baixo vácuo e os ácidos nucleicos foram extraídos de acordo com a metodologia proposta por ZHANG *et al.* (1996), com algumas modificações. Aproximadamente cerca de 0,2 g de micélio foram macerados em presença nitrogênio líquido por cerca de 3 min. O pó resultante da maceração foi transferido para tubos e ressuspendido em 600  $\mu\text{l}$  de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM EDTA, 2% SDS e 1%  $\beta$ -mercaptoetanol). A esta suspensão foram adicionados 80  $\mu\text{l}$  de uma solução composta de CTAB 10%/0,7 M NaCl e 120  $\mu\text{l}$  de NaCl 5 M. A mistura foi agitada em vortex e incubada a 65°C por 45 min seguida por incubação a 37°C, por 15 min. Após este procedimento, adicionou-se 400  $\mu\text{l}$  fenol e 400  $\mu\text{l}$  clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A mistura foi agitada em vortex, por 10 min, e centrifugada por 20 min a 14000 rpm (microcentrifuga JOUAN A14). O sobrenadante da centrifugação foi removido, misturado com 0,55% do volume com isopropanol e os ácidos nucleicos foram coletados por centrifugação a 14000 rpm por 10 min. O sedimento de ácidos nucleicos foi lavado com 500  $\mu\text{l}$  de etanol 70% e seco à temperatura ambiente.

Para uso na reação de PCR, os ácidos nucleicos, ressuspendidos em 200  $\mu\text{l}$  de água milli-Q, foram incubados por 30 min a 37°C com uma concentração final de 0,5 mg de RNase A. O DNA foi re-extraído acrescentando-se o mesmo volume de fenol e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e precipitado com isopropanol. Os ácidos nucleicos foram então ressuspendidos em 20  $\mu\text{l}$  de tampão TE (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5). Para uso na digestão enzimática com nuclease S1, omitiu-se o tratamento dos ácidos nucleicos com RNase A, sendo que o sedimento de ácidos nucleicos foi ressuspendido em 100  $\mu\text{l}$  de água milli-Q. A quantidade do DNA, após extração, foi estimada visualmente em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, a uma concentração final de 0,5  $\mu\text{g/ml}$ .



### 3.4. Amplificação do rDNA por PCR

A reação de amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 de todos os isolados foi efetuada utilizando-se os *primers* específicos TW81 5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC -3' e AB28 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT -3', descritos por CURRAN *et al.* (1994) (Figura 2). A reação foi efetuada em um volume de 25  $\mu$ l, contendo 2-20 ng de DNA genômico, 10 mM Tris pH 8,0, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5U Taq DNA polimerase (Cenbiot Enzimas), 3 mM de dNTPs e 50 pmol de cada *primer*. A reação foi efetuada em termociclador PTC-200 (*Peltier Thermal Cycler - MJ Research*) programado para uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min; anelamento a 60°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, seguido por uma desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 60°C por 2 min e extensão final a 72°C, por 10 min. Os produtos obtidos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l de brometo de etídio.

Os produtos obtidos da reação de PCR foram purificados pelo método de *freeze squeeze* (TAUTZ & RENZ, 1983) ou utilizando o kit de purificação *GFX<sup>TM</sup> PCR-DNA and gel bands purification Kit* (Amersham Pharmacia Biotech). A quantificação do DNA, após a purificação, foi efetuada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com 0,5  $\mu$ g/ml de brometo de etídeo e as amostras encaminhadas para seqüenciamento.

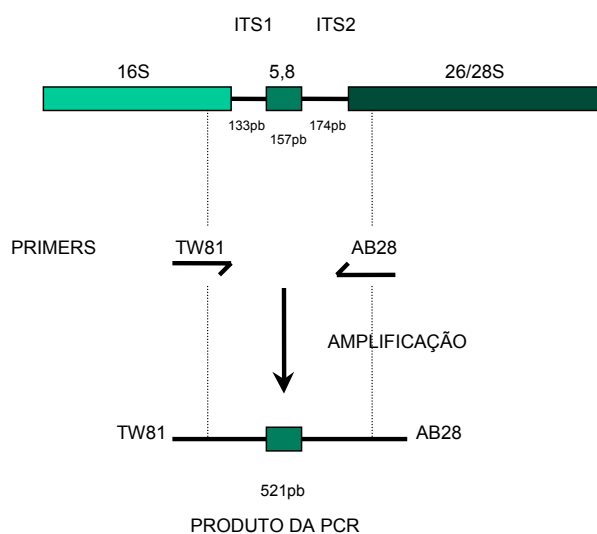


Figura 2. Região da repetição ribossômica utilizada para amplificação do DNA de *Metarhizium anisopliae* (modificado de CURRAN *et al.*, 1994).

### 3.5. Seqüenciamento e Análises Filogenéticas

O seqüenciamento das amostras foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando seqüenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (*Applied Biosystems*). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados por PCR utilizando-se 3,2 pmol do *primer* TW81 5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC -3' ou AB28 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT -3' e 2 µl do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (*Applied Biosystems*) em um volume final de 10 µl. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystems*) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 seg, 55°C por 5 seg e 60°C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µl de formamida, desnaturados a 95°C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no seqüenciador automático. Os dados de seqüenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v1.0.1* (*Applied Biosystems*) com os parâmetros *Dye Set* "Z"; *Mobility File* "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"; *BioLIMS Project* "3100\_Project1"; *Run Module 1* "StdSeq50\_POP6\_50cm\_cfv\_100"; e *Analysis Module 1* "BC-3100SR\_Seq\_FASTA.saz".

Os alinhamentos das seqüências foram realizados nos programas ClustalX e Bioedit Sequence Aligment Editor (HALL, 1999). As análises filogenéticas e moleculares foram realizadas utilizando o programa Mega 2.1 (KUMAR *et al.*, 2001). O método utilizado para a construção da árvore foi *Neighbour joining* usando os parâmetros Kimura-2-parâmetro e confiança de 5000 repetições de bootstrap.

### 3.6. Tratamento com a Enzima Nuclease S1

A nuclease S1 é uma endonuclease que catalisa a degradação específica de DNA ou RNA de fita simples. As condições utilizadas na reação com a nuclease S1 foram os seguintes: a digestão do RNA fita simples foi efetuada em

um volume de 20  $\mu$ l de reação, incluindo 5  $\mu$ l de DNA (aproximadamente 200 ng), 2  $\mu$ l do tampão da enzima nuclease S1 (10X), contendo 2,8 M NaCl, 300 mM acetato de sódio pH 4,5 e 10 mM ZnSO<sub>4</sub>, 2  $\mu$ l da enzima Nuclease S1 9U (*Amersham Pharmacia Biotech*). A reação foi efetuada por incubação em banho de água a 37°C por 3 horas, parada em banho de gelo e em seguida, o produto da reação foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com 0,5  $\mu$ g/ml de brometo de etídeo. Para digestão com RNase A, 5  $\mu$ l de amostra de DNA (aproximadamente 200 ng) foram incubadas a 37°C por 30 min com 50-200  $\mu$ g/mL de RNase A em tampão TE.

### **3.7. Caracterização Morfológica dos Conídios por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Os diferentes isolados de *Metarhizium* spp. foram repicados em placas de Petri contendo Mcc sólido com pH ajustado para 6,0 e incubados em câmara de germinação (TE-401 TECNAL) a 28°C até a esporulação (cerca de 7 dias). Pequenos fragmentos de 5 x 5 mm da colônia de cada isolado foram retirados com o auxílio de um bisturi (LIMA, 2002) e fixados *overnight* em 2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 acrescido de 3% sacarose. Após a fixação, estes fragmentos foram lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 por 4 vezes por 15 min cada e, em seguida, desidratados em série gradual de acetona (30, 50, 70 e 90%, por 15 min cada, e 100%, por 2 vezes 10 min), secos ao ponto crítico (*Critical Point Dryer* CPD 030 Baltec), cobertos com uma película de ouro no aparelho *Sputter Coater* (SCD 050 Baltec) e analisados ao microscópio de varredura Jeol JSM 5800, pertencente ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

### **3.8. Bioensaios**

Para o bioensaio, foram utilizadas 75 teleóginas para cada isolado de *Metarhizium* spp. a ser analisado. As fêmeas de *B. microplus* foram mergulhadas subseqüentemente em solução de hipoclorito de sódio, solução salina 0,87% e água destilada esterilizada. Em seguida, cada grupo de teleóginas foi mergulhado

por 30 s nas suspensões de conídios ( $1 \times 10^8$  conídios.ml<sup>-1</sup>) dos isolados E6 (controle positivo), Nordeste, C7, C11, C12, C14, C19, CG27, CG30, CG31, CG33, CG46, CG47, CG87, CG97, CG125, CG291, CG320 e CG374. Posteriormente, os carrapatos foram acondicionados em câmaras úmidas (> 90% de umidade), sendo colocadas 25 teleóginas em cada placa de Petri. As placas foram incubadas em câmara de germinação (TE-401 TECNAL) a 28°C por 4 dias. Diariamente foi realizada a observação dos carrapatos e a contagem dos animais mortos. O controle negativo foi realizado imergindo os carrapatos em água destilada estéril e mantendo-os nas mesmas condições dos grupos tratados.

Carrapatos tratados com os isolados CG30 e CG97 foram coletados com 1 a 4 dias de infecção e processados para microscopia eletrônica de varredura. As amostras foram fixadas *overnight* em 2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído 3% sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2, em seguida lavadas no mesmo tampão 4 vezes por 15 min cada, desidratadas em série gradual de acetona (30, 50, 70 e 90%, por 30 min cada, e 100%, por 2 vezes 30 min), secas ao ponto crítico (*Critical Point Dryer* CPD 030 Baltec), cobertas com uma película de ouro no aparelho *Sputter Coater* (SCD 050 Baltec) e analisados ao microscópio de varredura Jeol JSM 5800, pertencente ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

### 3.9. Avaliação do Efeito da Temperatura

Os experimentos para avaliação do efeito da temperatura de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. foram realizados repicando-se 10 µl de suspensão de conídios a concentração de  $1 \times 10^8$  conídios.ml<sup>-1</sup>, para cada um dos isolados, no centro de placas de Petri contendo MCc sólido com pH ajustado para 6,0 com solução de HCl 0,1 M, antes da autoclavagem. As placas foram incubadas em câmara de germinação (TE-401 TECNAL) a temperaturas de 2, 10, 16, 24, 28, 34, 37 e 40°C. Foram feitas 3 repetições para cada isolado. Duas medidas cardiais do diâmetro da colônia e do diâmetro da esporulação foram realizadas com 10 dias incubação para avaliação do crescimento da colônia e o diâmetro da esporulação.

### **3.10. Avaliação do Efeito do pH**

Para avaliar o efeito do pH no crescimento e esporulação de cada um dos isolados, inoculou-se 10 µl de suspensão de conídios a concentração de  $1 \times 10^8$  conídios.ml<sup>-1</sup> centralmente em cada placa de Petri contendo meio MCc sólido com pH 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0. O pH do meio foi ajustado antes da autoclavagem com solução de HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M. As placas inoculadas foram incubadas em câmara de germinação (TE-401 TECNAL) a 28°C. Foram realizadas 3 repetições para cada isolado. Duas medidas cardeais do diâmetro da colônia e esporulação foram realizadas com 10 dias de incubação para avaliar o crescimento da colônia e esporulação.

### **3.11. Análises Estatísticas**

As análises estatísticas (teste de Duncan) foram realizadas no programa STATISTICA (StatSoft, Inc., 1999) e os gráficos correspondentes foram feitos no programa MICRONAL ORIGIN (Micronal Software, Inc, 1997).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Amplificação do rDNA e Seqüenciamento

O seqüenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 foi realizado para obter diferenciação entre as espécies de *Metarhizium* analisadas e, assim, confirmar sua classificação. A partir de todos os isolados analisados foi amplificado um fragmento de aproximadamente 500 pb, conforme esperado (Figura 3).

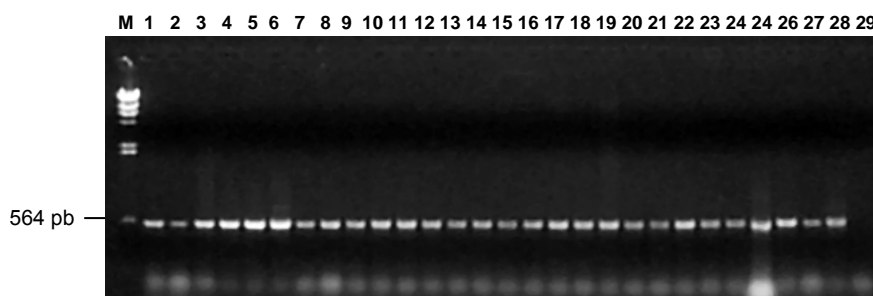


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) do produto da PCR da região do rDNA dos isolados de *Metarhizium* spp. M=Marcador DNA $\lambda$ /HindIII; 1=CG491; 2=CG423; 3=CG374; 4=CG343; 5=CG320; 6=CG291; 7=CG144; 8=CG125; 9=CG97; 10=CG87; 11=CG47; 12=CG46; 13=CG33; 14=CG31; 15=CG30; 16=CG27; 17=C19; 18=C14; 19=C12; 20=C11; 21=C7; 22=Nordeste; 23=RJd; 24=E9; 25=E6; 26=MT; 27=M5; 28=AL; 29=Controle negativo (sem DNA). Primers TW81 5'- GTTTCCGTAGGTGAACCTGC - 3' e AB28 5'- ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT -3'. Condições de amplificação: 94°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min; 60°C por 1 min, 72°C por 1 min, finalizando com 94°C por 1 min, 60°C por 2 min e 72°C, por 10 min.

As seqüências obtidas, correspondentes à região ITS1-5,8S-ITS2, foram alinhadas e comparadas com seqüências conhecidas (BLAST). O alinhamento de todas as seqüências encontra-se no apêndice. As seqüências encontradas mostraram 98% de similaridade dos isolados CG27, CG320 e CG374 com *M. anisopliae* var. *majus* e 98% de similaridade dos outros isolados com *M. anisopliae* var. *anisopliae*. A análise filogenética destas seqüências (Figura 4), revelou agrupamentos que identificaram os isolados analisados apenas em dois grupos (var. *anisopliae* e var. *majus*), confirmando a identidade taxonômica da

maioria dos isolados utilizados neste trabalho. Os isolados pertencentes à var. *anisopliae* mostraram-se filogeneticamente idênticos entre si e com a linhagem AY387579, padrão de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, e apresentaram 98% de similaridade com *M. anisopliae* var. *anisopliae*, assim como os isolados AL, E6, M5, MT, RJd, Nordeste, C7, C11, C12, C14 e C19, que não apresentavam classificação em variedade. O isolado CG374 se agrupou com os outros dois isolados de *M. anisopliae* var. *majus* (CG27, CG320) e com a linhagem AF137061, padrão de *M. anisopliae* var. *majus* e o alinhamento de suas seqüências apresentou 98% similaridade com *M. anisopliae* var. *majus*. Outros dois isolados, CG291 e CG423, considerados pertencentes a *M. flavoviride* (ou *M. anisopliae* var. *acridum* segundo DRIVER *et al.*, 2000), não se agruparam com a linhagem *M. anisopliae* var. *acridum* AF516324, ou com as outras variedades de *M. flavoviride*: *M. flavoviride pemphigum* AF139850, *M. flavoviride* var. *minus* AF138272, *M. flavoviride* var. *flavoviride* AY387582, *M. flavoviride* var. *novazealandicum* AF139853, *M. flavoviride* TypeE AF139855, mas sim, com *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Além disto, estes isolados também apresentaram 98% de similaridade com *M. anisopliae* var. *anisopliae*, indicando que estes isolados pertencem à espécie *M. anisopliae* var. *anisopliae* e não a *M. flavoviride*.

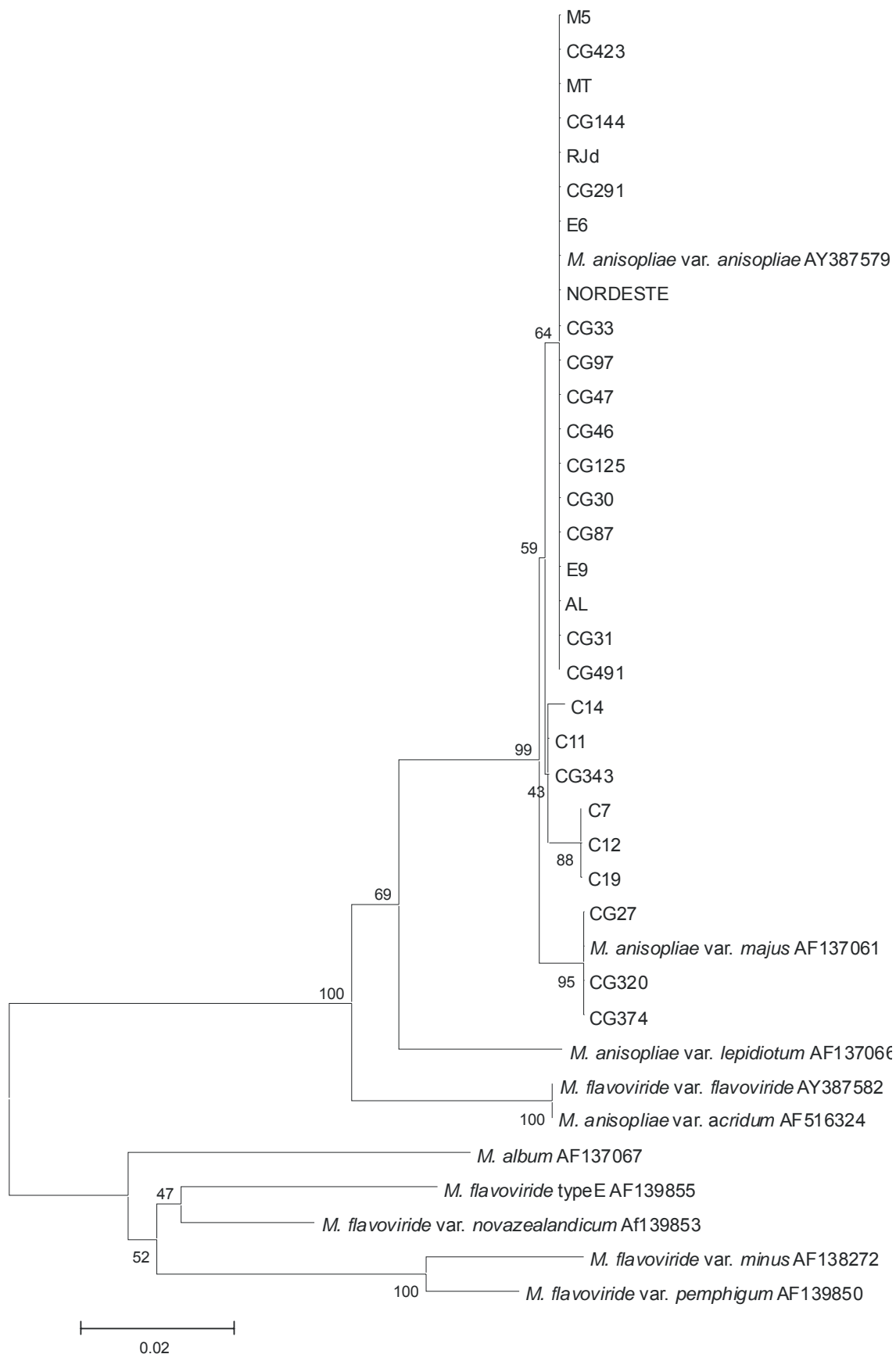


Figura 4. Árvore filogenética da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 28 isolados e 10 linhagens representativas de *Metarhizium* spp. com o número de acesso indicado. O método utilizado para a construção da árvore foi Neighbour joining usando Kimura 2 parâmetro. A confiança foi confirmada com 5000 repetições de bootstrap.



## 4.2. Tratamento com a Enzima Nuclease S1

Os ácidos nucléicos totais de isolados de *Metarhizium* spp. foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, onde se detectou, em 21 dos 28 isolados analisados, moléculas de ácidos nucléicos que migraram mais rápido do que o DNA cromossômico. A presença destas bandas foi avaliada após o tratamento com a enzima nuclease S1 e após tratamento com RNase A. A sua resistência ao tratamento com nuclease S1 (Figura 5) e sensibilidade ao tratamento com RNase A (dados não mostrados) indica que estas bandas são elementos dsRNA. As bandas apresentaram intensidades variáveis, indicando diferentes concentrações de ácidos nucléicos. Os isolados que apresentaram estes elementos foram AL, M5, MT, E9, RJd, Nordeste, C7, C11, C19, CG27, CG30, CG31, CG33, CG46, CG47, CG87, CG97, CG144, CG291, CG320, CG423. Observou-se após a eletroforese em gel de agarose, diferentes padrões de bandas dos elementos de dsRNA, levando-se em consideração as variações no número e tamanhos das bandas, em todos os isolados analisados. Os isolados AL, M5, MT, E9, CG144, CG423, apresentaram um padrão bem semelhante, com cerca de 4 bandas. Os isolados C7, C11, C19, Nordeste e CG33 apresentaram um padrão de vírus com duas bandas, entretanto, parecem existir dois padrões distintos de tamanho destas bandas, sendo um padrão similar para os isolados C7 e C19 e outro para os isolados C11, Nordeste e CG33. Outro padrão de vírus, apresentando três bandas, foi observado nos isolados CG30, CG46, CG47, CG97. Outros padrões de vírus foram observados nos isolados RJd, CG27, CG31, CG87, CG291 e CG320. Não se observou correlação entre a presença de dsRNA e padrões de bandas e a variedade ou entre as variedades de *Metarhizium* analisadas, verificando-se principalmente uma grande variabilidade de padrões na variedade *anisopliae*.

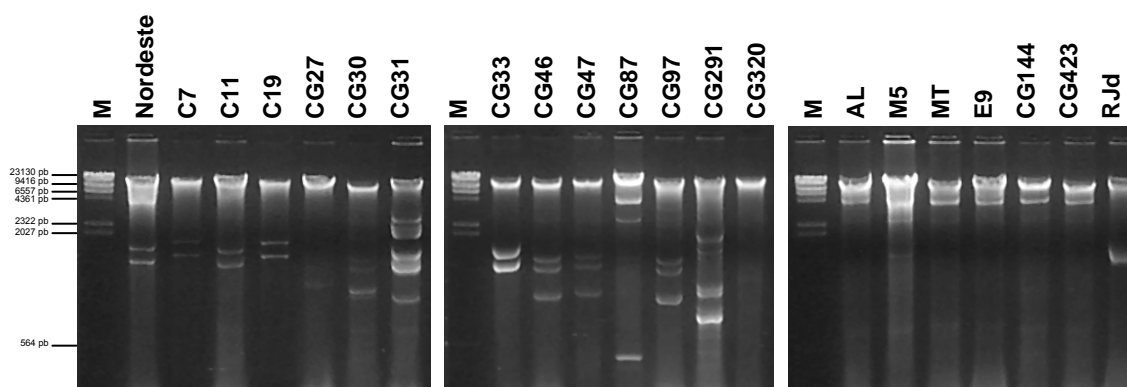


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos ácidos nucleicos totais de *Metarhizium* spp. após tratamento com S1 Nuclease. M:  $\lambda$ DNA/HindIII.

#### 4.3. Análise Morfológica de Colônias e dos Conídios dos Isolados de *Metarhizium*

A Figura 6 mostra as morfologias das colônias dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. quando crescidos em placas de Petri contendo MCc sólido, evidenciando as diferenças na morfologia, no tamanho e na coloração da colônia dos isolados analisados, incluindo as variedades *anisopliae* e *majus*.

A morfologia dos conídios, observada por MEV, é mostrada na Figura 7. Todos os conídios observados apresentaram a forma alongada característica do gênero. A maioria deles aparentemente apresentam o mesmo tamanho, com exceção dos isolados CG27, CG320 e CG374 que apresenta conídios grandes, próprios da var. *majus*, e dos isolados CG144 e CG291, que apresentam conídios aparentemente um pouco menores. Alguns conídios apresentaram uma superfície bastante irregular e aparentemente murcha, como evidenciado para os isolados AL, M5 e E9 e para os isolados CG144 e CG291 diferenciando de outros conídios com aspecto intumescido e superfície mais regular, como evidenciado para os isolados Nordeste, CG31, CG33 e CG97.

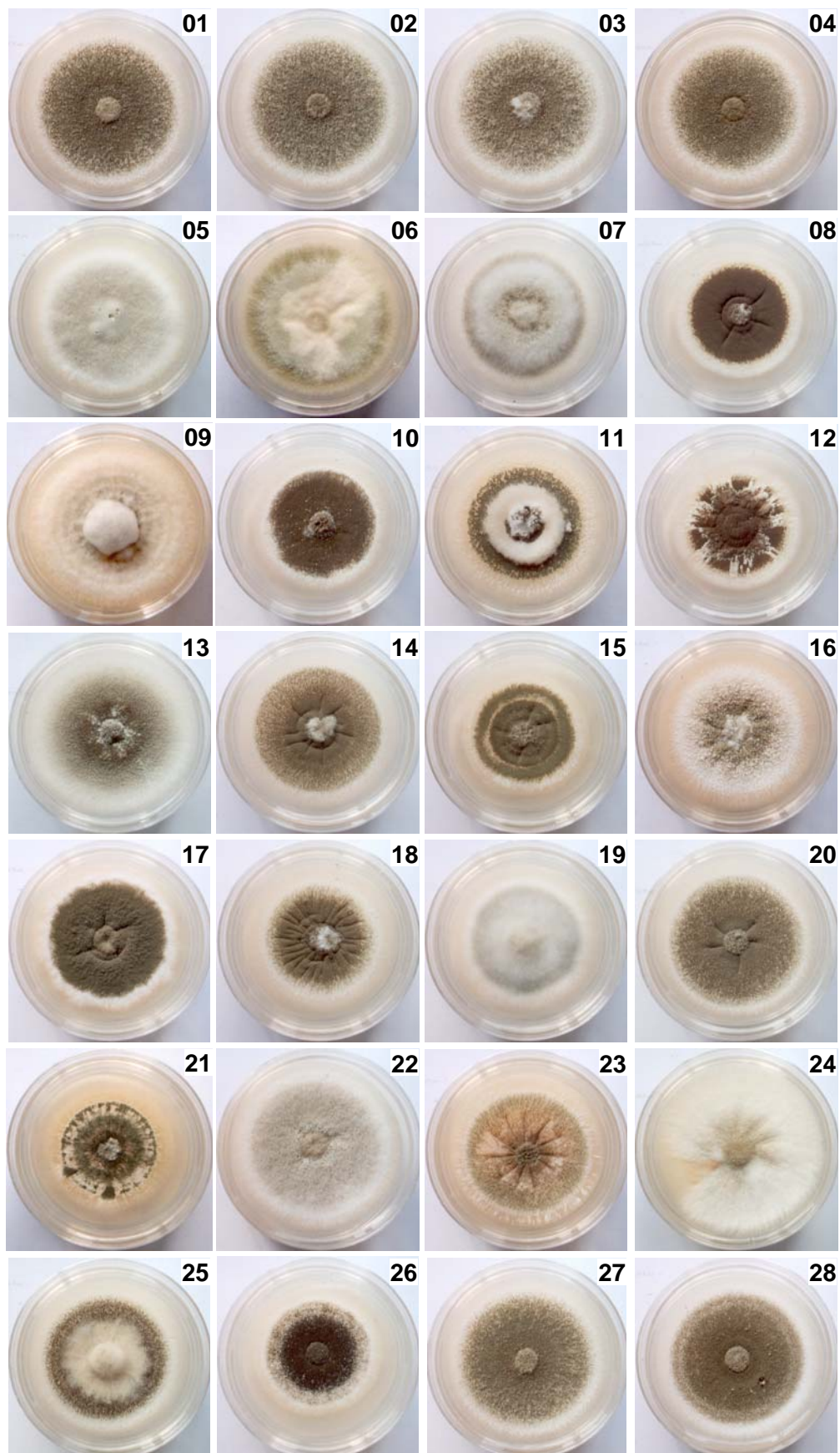


Figura 6. Morfologia da colônia dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. 1) AL; 2) M5; 3) MT; 4) E6; 5) E9; 6) RJd; 7) Nordeste; 8) C7; 9) C11; 10) C12; 11) C14; 12) C19; 13) CG27; 14) CG30; 15) CG31; 16) CG33; 17) CG46; 18) CG47; 19) CG87; 20) CG97; 21) CG125; 22) CG144; 23) CG291; 24) CG320; 25) CG343; 26) CG374; 27) CG423; 28) CG491.

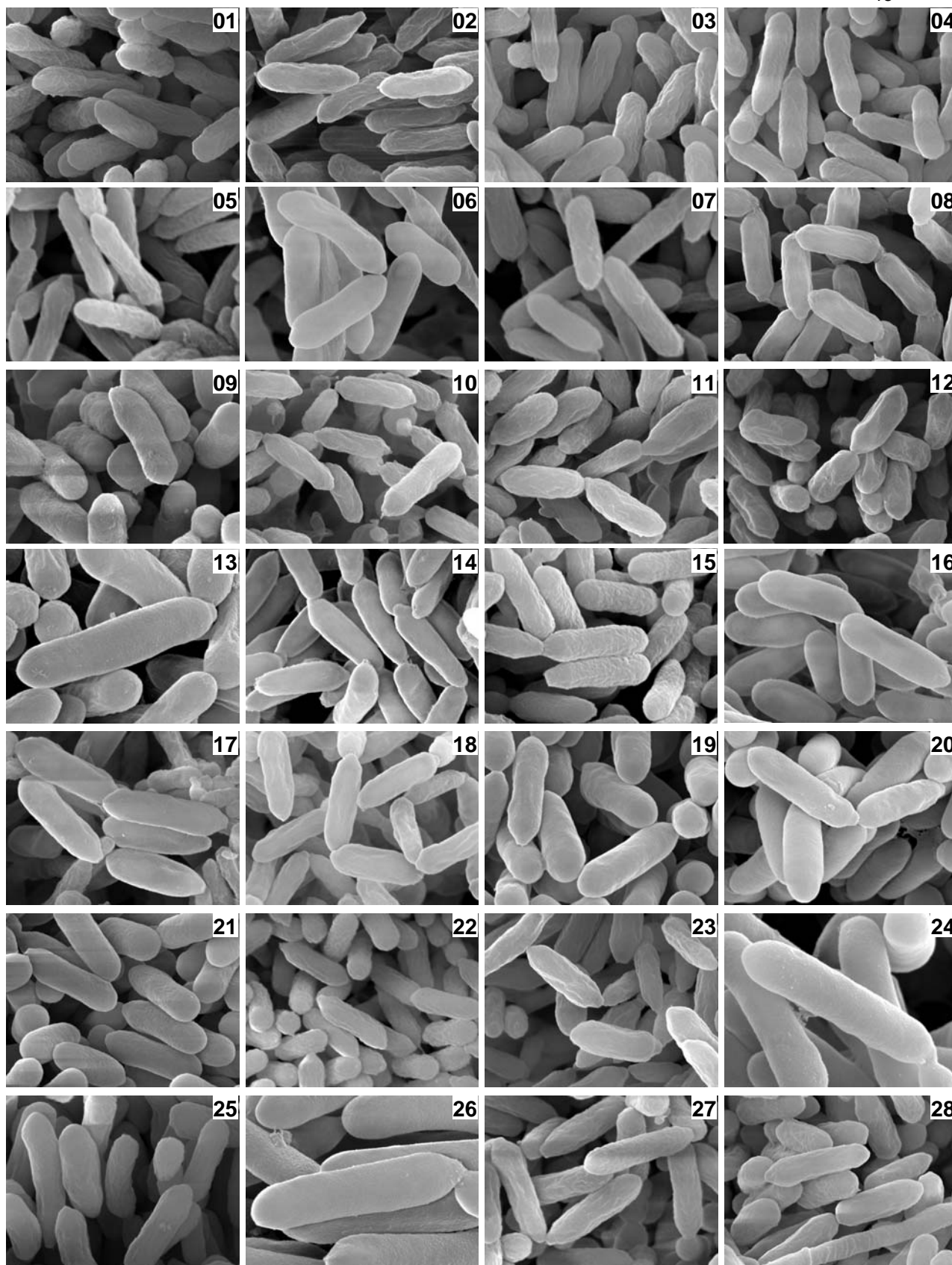


Figura 7. Eletromicrografia de varredura dos conídios dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. 1) AL; 2) M5; 3) MT; 4) E6; 5) E9; 6) Nordeste; 7) RJd; 8) C7; 9) C11; 10) C12; 11) C14; 12) C19; 13) CG27; 14) CG30; 15) CG31; 16) CG33; 17) CG46; 18) CG47; 19) CG87; 20) CG97; 21) CG125; 22) CG144; 23) CG291; 24) CG320; 25) CG343; 26) CG374; 27) CG423; 28) CG491. Bar= 1 $\mu$ m.

#### 4.4. Bioensaios

Os resultados do bioensaio mostraram que três isolados mais virulentos (C14, CG47 e CG97), pertencentes a var. *anisopliae*, para fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* e confirmou a alta eficácia e virulência do isolado E6, utilizado como controle positivo (Figura 8). O isolado E6 é bastante estudado em nosso laboratório por sua eficácia como agente de controle biológico do carrapato *B. microplus*. Os resultados obtidos confirmaram que o isolado E6 é altamente virulento para fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* matando, em média 20,5 carrapatos (82%), ao 2º dia de infecção, e 23,5 carrapatos (94%), ao 3º dia de infecção, sendo o isolado que apresentou maior taxa de mortalidade do carrapato *B. microplus* ao 2º dia de infecção (Figura 9). O isolado C14 foi o segundo mais eficiente, tendo um percentual de mortalidade de 68% (17 carrapatos mortos), aos 2 dias de infecção, e 94,4% (23,6 carrapatos mortos), aos 3 dias de infecção e o isolado CG97 obteve um número de 12,3 carrapatos mortos (49,2%) e 22,6 carrapatos mortos (90,4%) aos 2º e 3º dias de infecção, respectivamente. Aos 4 dias de infecção, obteve-se cerca de 24,5 carrapatos mortos (98%) para o isolado E6 e 24,3 (97,2%), 24,9 (99,6%) e 22,6 (90,4%) de carrapatos mortos para os isolados C14, CG97 e CG47 respectivamente, indicando a alta virulência destes isolados, sendo que estes resultados não foram significativamente diferentes pelo teste de Duncan ( $\alpha=0,05$ ). Os isolados C19 e CG31 foram patogênicos para o carrapato, mas não apresentaram o forte padrão de virulência dos isolados E6, C14, CG97 e CG47. Os isolados C7, CG46 e CG291, também foram patogênicos, mas se mostraram pouco eficientes para o controle do carrapato, visto que mantiveram padrões de mortalidade relativamente baixos ou de um progresso mais lento do processo de infecção. Outros isolados analisados, como Nordeste, C11, C12, CG30, CG33, CG87, CG125, assim como os isolados pertencentes a var. *majus* (CG27, CG320 e CG374) não tiveram qualquer efeito sobre teleóginas de *B. microplus*, sendo estatisticamente semelhantes ao controle negativo e portanto, bastante ineficientes para o controle biológico (Figura 9).

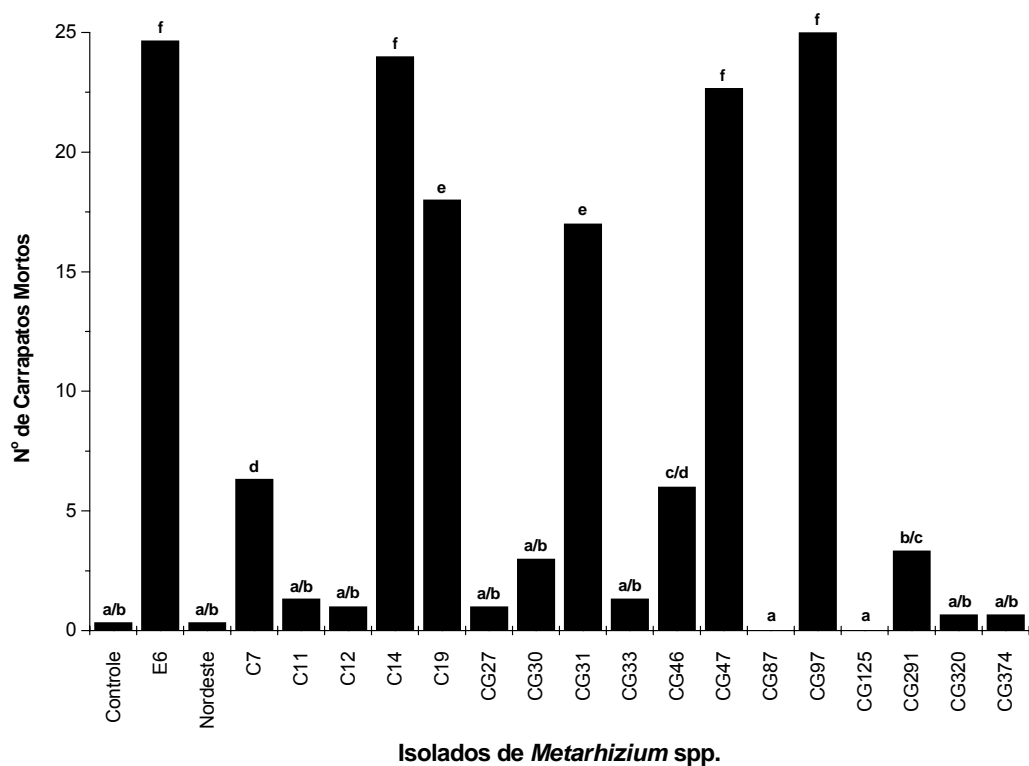


Figura 8. Patogenicidade de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. ( $1 \times 10^8$  conídios.ml<sup>-1</sup>) em teleóginas de *Boophilus microplus* ao 4º dia de infecção.. Mesmas letras nas colunas indicam que as médias não se diferem significativamente ao teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ .

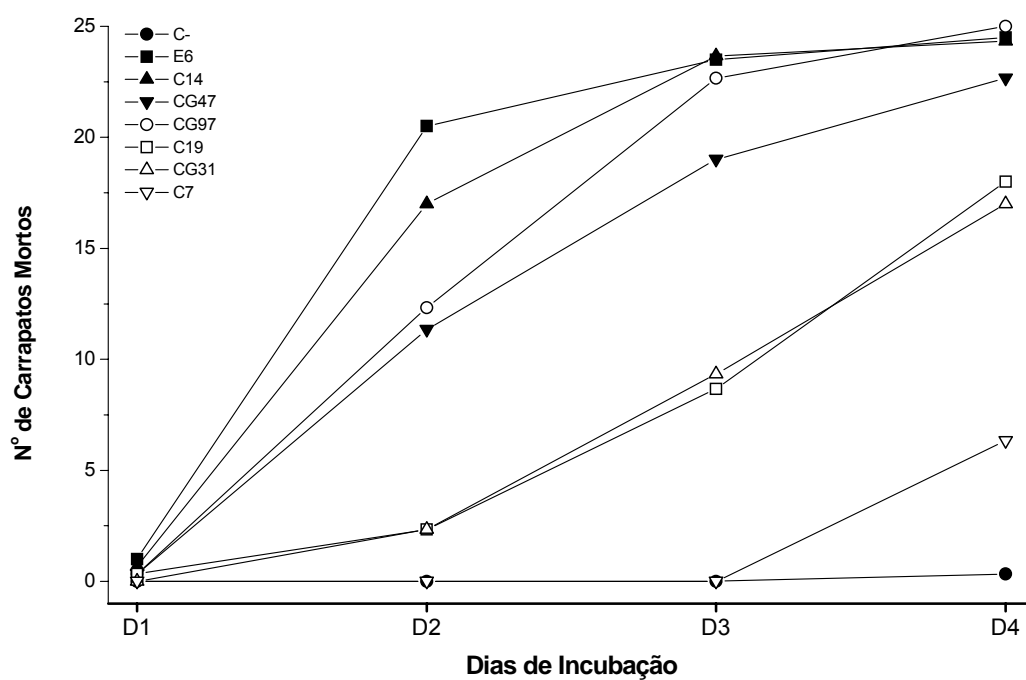


Figura 9. Patogenicidade de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. ( $1 \times 10^8$  conídios.ml<sup>-1</sup>) em teleóginas de *Boophilus microplus* do 1º ao 4º dia de infecção.

Uma comparação entre os isolados CG97, considerado um isolado virulento, e CG30, considerado pouco virulento para *B. microplus*, foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (Figura 10), visando evidenciar padrões distintos do processo de infecção do fungo. O isolado CG97 apresentou intenso crescimento de hifas sobre a cutícula do carrapato desde o 1º dia de infecção. Neste período, se observam as estruturas de penetração como tubo germinativo e apressório. Observou-se que a maioria dos tubos germinativos era curta, mas encontraram-se alguns tubos germinativos longos, sendo que processo de infecção pareceu bastante similar ao visualizado para o isolado E6 (Capítulo 2 desta tese), inclusive com a diferenciação da ponta terminal da hifa, durante o processo de penetração na cutícula (Figura 11). Aos dois dias pós-inoculação, observa-se o processo de germinação do conídio na superfície da cutícula e formação do apressório (curtos ou longos). Semelhante ao isolado E6, as hifas emergiram da cutícula ao 4º dia de infecção. O padrão de infecção do isolado CG30 foi bastante diferenciado dos isolados CG97 e E6, visto que do 1º ao 4º dia de infecção se observa apenas a formação de tubos germinativos curtos que penetram a cutícula do carrapato. Este padrão de infecção provavelmente se deve ao fato deste ser um isolado pouco virulento. Não se observou a formação de longos tubos germinativos nem a emergência de hifas. Como houve a formação de tubos germinativos e apressórios e ainda foi observada a penetração de hifas no isolado CG30, podemos supor que a patogenicidade dos isolados depende não somente da formação do apressório e/ou penetração deste na cutícula, mas também de outros fatores, tais como a produção de enzimas. Provavelmente, a função desempenhada por estas enzimas durante esse processo de penetração é um fator determinante para a patogenicidade do fungo.

Diferentemente dos fungos fitopatogênicos, não observamos qualquer correlação entre a presença de vírus de dsRNA e virulência do isolado para o carrapato *B. microplus*. Constatamos que existem isolados altamente virulentos para o carrapato que apresentam várias bandas de vírus de dsRNA (por exemplo CG97), assim como também existem isolados altamente virulentos que não apresentam vírus (E6). Ainda, existem isolados sem capacidade de virulência detectável que não apresentam vírus, como é o caso dos isolados C12 e CG125, e com a presença de vírus, como os isolados CG30, CG33 e CG87.

Não foi observada qualquer correlação entre a virulência dos isolados analisados e localização geográfica ou tipo de hospedeiro. Observou-se que os três isolados próprios da var. *majus* não foram patogênicos para *B. microplus*. Entretanto, houve grandes diferenças na virulência dos isolados dentro da variedade *anisopliae*; alguns isolados desta variedade não foram virulentos, enquanto que outros foram muito ou pouco virulentos.

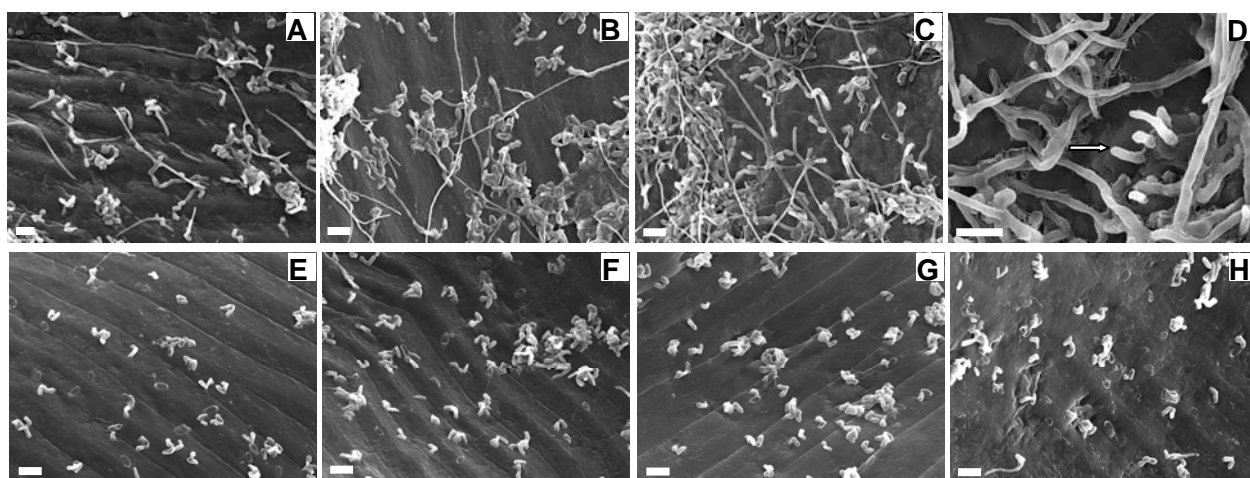


Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura do carrapato *Boophilus microplus* infectado com *Metarhizium anisopliae* os isolados CG97 (Figuras A a D) e CG30 (Figuras E a H). A e E: 1 dia de infecção. B e F: 2 dias de infecção. C e G: 3 dias de infecção. D e H: 4 dias de infecção. A seta indica a emergência da hifa na cutícula de *Boophilus microplus*. Bar=10 $\mu$ m.



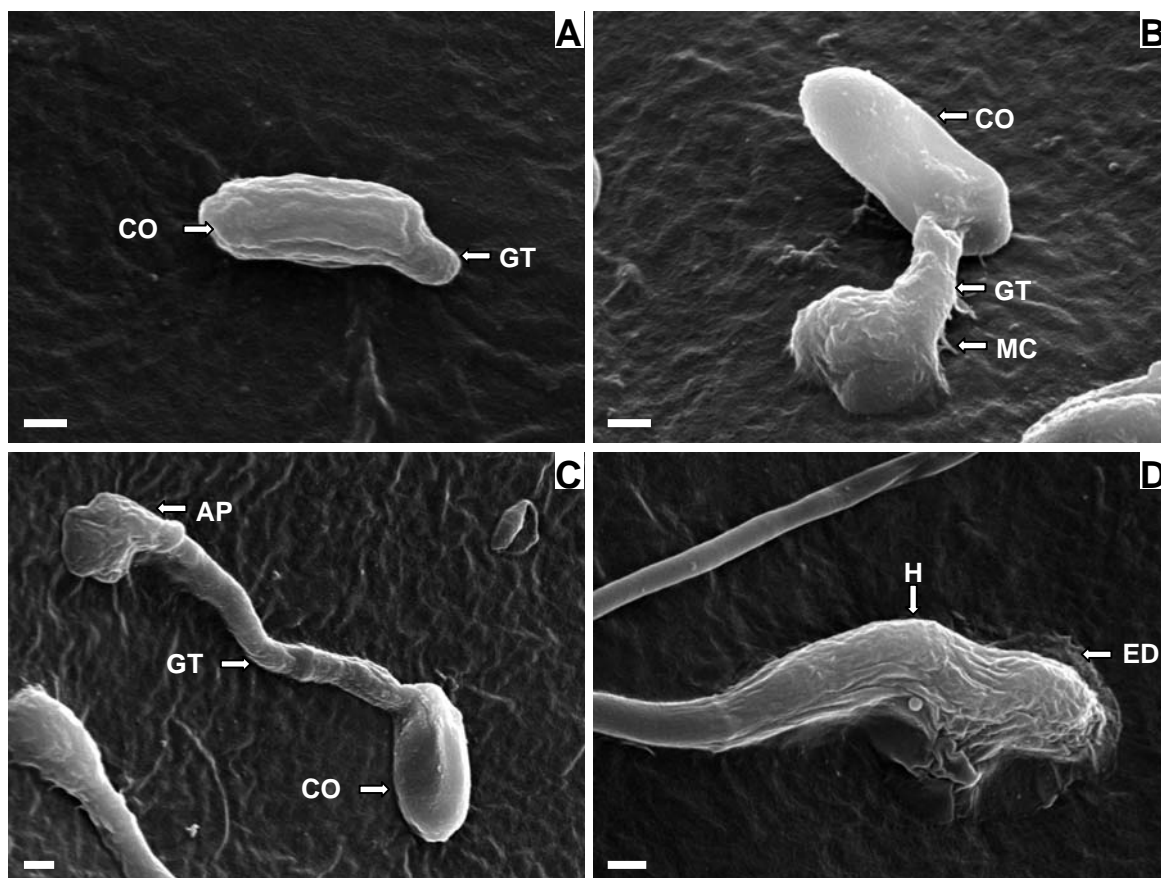


Figura 11. Detalhe do início da germinação (A, seta), tubo germinativo (B e C) e ponta da hifa (D) durante o processo de infecção de *Metarhizium anisopliae* isolado CG97 na superfície da cutícula do carrapato *Boophilus microplus*. Dois dias pós-inoculação. CO: conídio. GT: tubo germinativo. AP: apressório. H: hifa. ML: mucilagem. A e B: Bar=1 $\mu$ m C e D: Bar=2 $\mu$ m.

#### **4.5. Efeito da Temperatura no Crescimento e Esporulação dos Isolados de *Metarhizium* spp.**

Os ensaios da avaliação do efeito da temperatura no crescimento e esporulação dos isolados de *Metarhizium* spp. evidenciaram ótimo crescimento destes isolados nas temperaturas de 24°C e 28°C, quando comparados ao crescimento mesmos dos isolados em outras temperaturas analisadas (Figuras 12 e 13). No entanto, a maioria dos isolados avaliados teve um melhor crescimento na temperatura de 28°C, sendo que esta foi considerada padrão para o crescimento destes. Comparando-se as temperaturas de 24°C e 28°C, notou-se que o diâmetro de esporulação foi relativamente proporcional ao diâmetro de crescimento da colônia nas duas temperaturas e que os isolados CG30, CG33, CG87 e CG291 tiveram uma melhor esporulação na temperatura de 24°C (Figura 13).

O crescimento e, principalmente, a esporulação dos isolados foram consideravelmente diminuídos nas temperaturas de 16°C e 34°C (Figuras 12 e 13). Todos os isolados cresceram na temperatura de 16°C entretanto, os isolados E6, Nordeste, RJd, C11, C12, C14, C19, CG30, CG33, CG46, CG87, CG97, CG320 e CG491 não esporularam. À temperatura de 34°C somente o isolado C19 não cresceu (Figura 12). A esporulação nesta temperatura foi muito comprometida, sendo que apenas 11 isolados esporularam após 10 dias de incubação (RJd, C11, C14, CG27, CG30, CG31, CG47, CG97, CG291, CG374 e CG491).

Observou-se um pequeno crescimento de colônia (1 cm de diâmetro) dos isolados C7, C12 e C14 quando incubadas a 10°C, contudo, nenhum dos outros isolados cresceram nesta temperatura. Após 10 dias de incubação a 10°C, estes isolados foram incubados por mais 10 dias a 28°C e todos tiveram ótimo crescimento de colônia e diâmetro de esporulação, indicando que todos os isolados permaneceram viáveis. Não foi observado crescimento de qualquer isolado a temperatura de 37°C. Entretanto, diferentemente do comportamento dos isolados a 10°C, alguns isolados não cresceram e não esporularam quando foram incubados por mais 10 dias à temperatura de 28°C (C7, C19, CG47, CG87). Provavelmente estes isolados perdem a viabilidade quando incubados em altas

temperaturas (37°C). Todos os outros isolados se desenvolveram e produziram conídios após incubação a 28°C. Temperaturas bastante extremas para o crescimento *Metarhizium* spp. também foram avaliadas, assim os isolados foram incubados a 2°C e 40°C, sendo que nenhum dos isolados cresceu nestas temperaturas. Os isolados incubados a temperatura de 40°C foram novamente incubados por mais 10 dias a 28°C. Após este período observou-se que apenas os isolados pertencentes a var. *majus* (CG27, CG320 e CG374) cresceram e esporularam, demonstrando grande resistência de seus conídios a temperaturas mais altas.

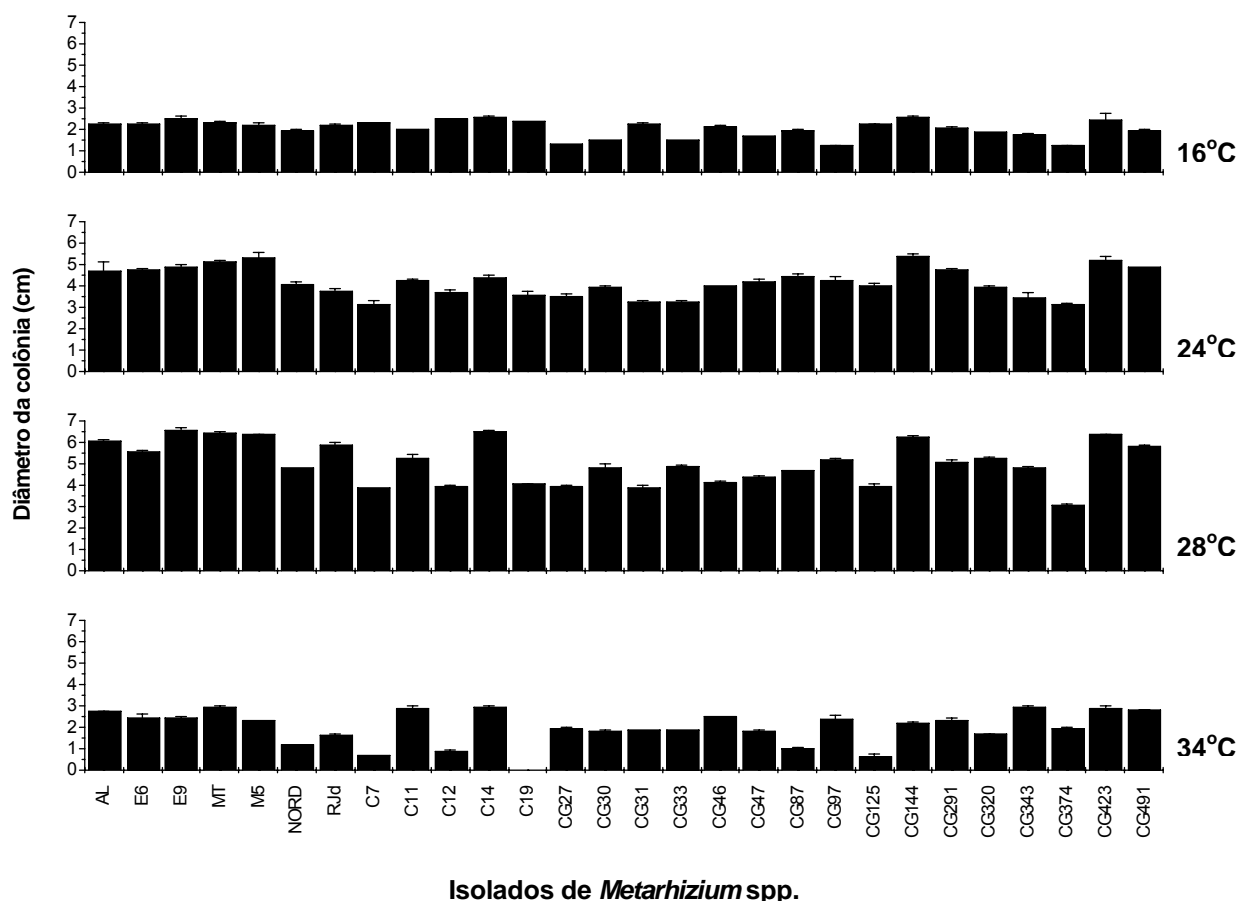


Figura 12. Influência da temperatura no desenvolvimento da colônia de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. . As barras representam o erro padrão.

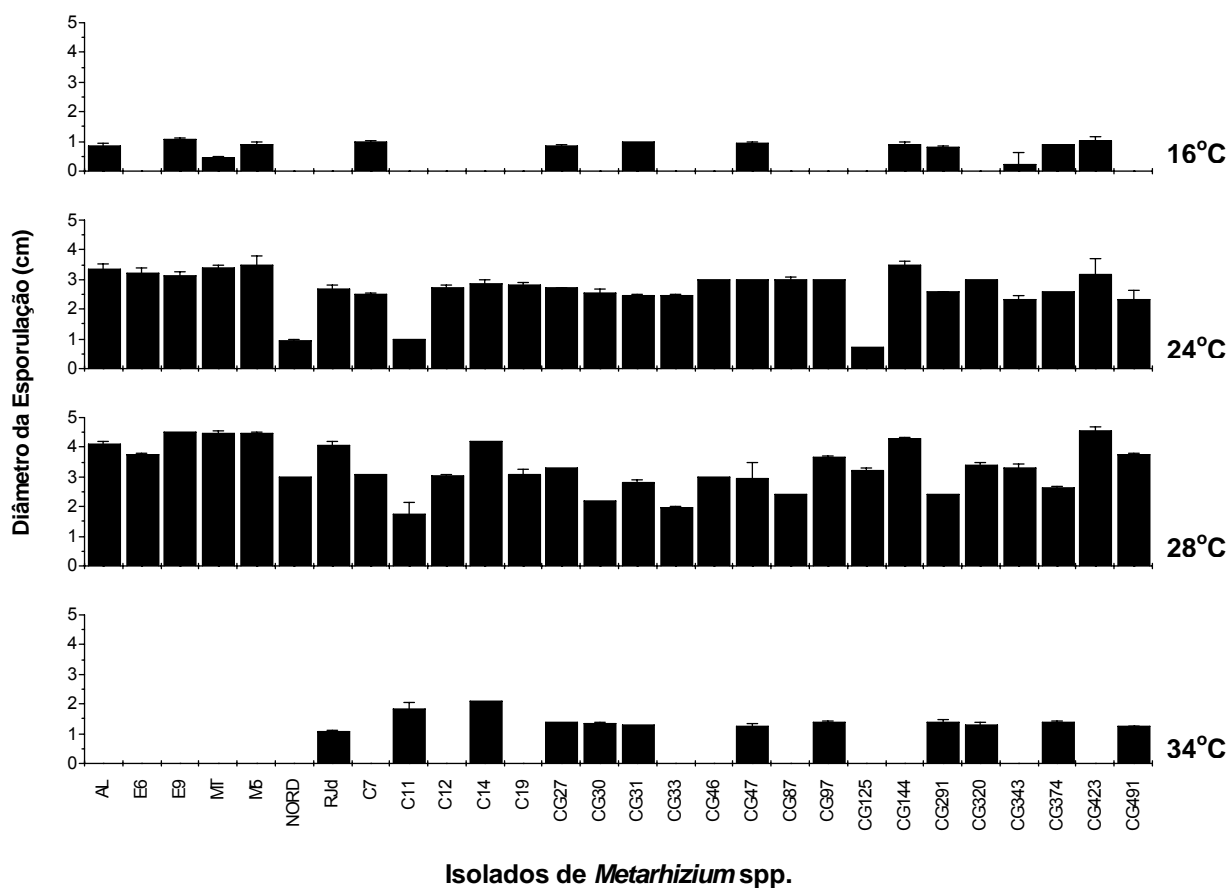


Figura 13. Influência da temperatura na esporulação de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. As barras representam o erro padrão.

#### **4.6. Efeito do pH no Crescimento e Esporulação dos Isolados de *Metarhizium* spp.**

Todos os isolados de *Metarhizium* spp. analisados cresceram bem em todos os pHs testados. Houve variação de crescimento entre os isolados e os que tiveram um maior diâmetro da colônia em todos os pHs testados foram AL, M5, MT, E6, E9, C14, CG144, CG423 e CG491.

A maioria dos isolados não apresentou alterações do desenvolvimento da colônia ou diâmetro da esporulação (ou estas foram mínimas) quando se comparou cada um dos isolados dentro de cada pH. Algumas variações significativas (ao teste de Duncan  $\alpha=0,05$ ) foram observadas no pH 7,0, onde os isolados C11 e CG343 cresceram e esporularam bastante, fazendo parte dos isolados que mais cresceram e esporularam em todos os outros pHs (Figuras 14 a 19). Neste mesmo pH, observou-se o menor crescimento da colônia e diâmetro da esporulação do isolado C14, e o maior diâmetro da esporulação dos isolados Nordeste e CG47. O isolado E6 teve elevação do desenvolvimento da colônia e diâmetro da esporulação quando em pH 8,0, em relação aos outros pHs analisados e o isolado CG30 teve aumento apenas do diâmetro da esporulação. O isolado CG31 aumentou o diâmetro da esporulação em pH 4,0, enquanto que o isolado CG47 teve redução do diâmetro da colônia no mesmo pH. Os isolados CG27, CG320 e CG374 pertencente a var. *majus* tiveram aumento do diâmetro da colônia no pH 9,0 sendo que os isolados CG27 e CG374 apresentaram aumento do diâmetro da esporulação. Estas variações na esporulação podem ser importantes quando se deseja produzir grande quantidade de conídios para o desenvolvimento de formulações.

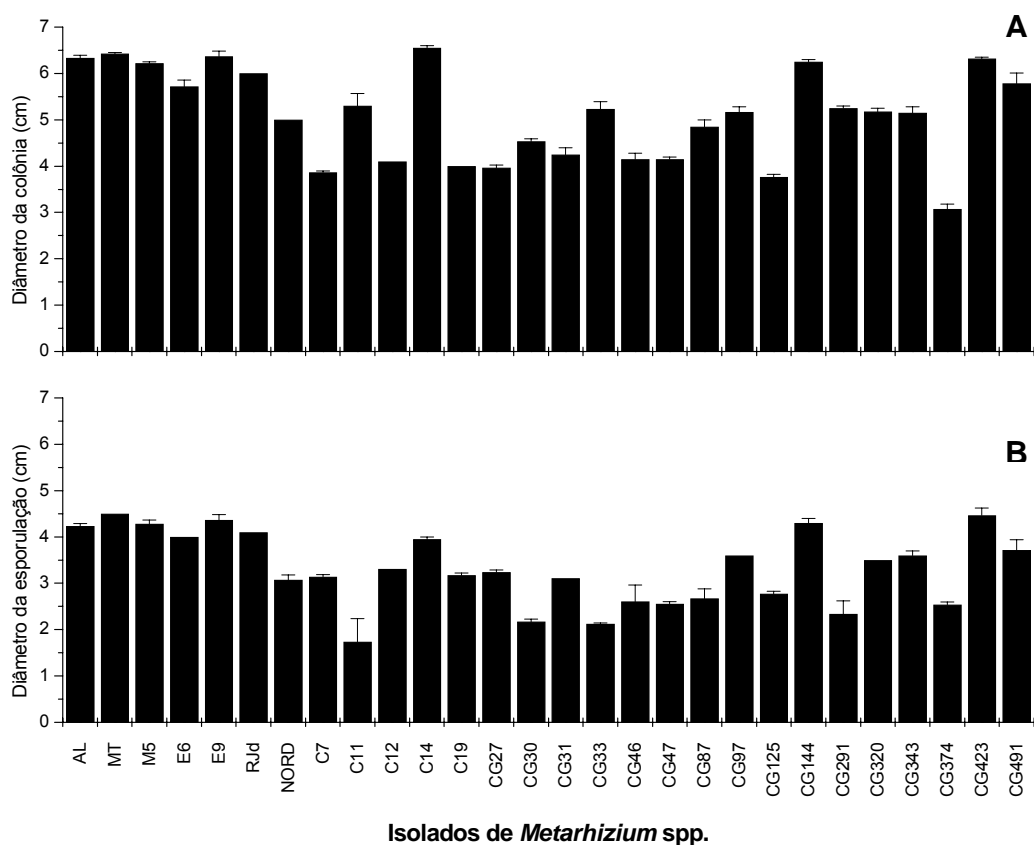


Figura 14. Influência do pH 4,0 no desenvolvimento da colônia (A) e esporulação (B) de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. As barras representam o erro padrão.

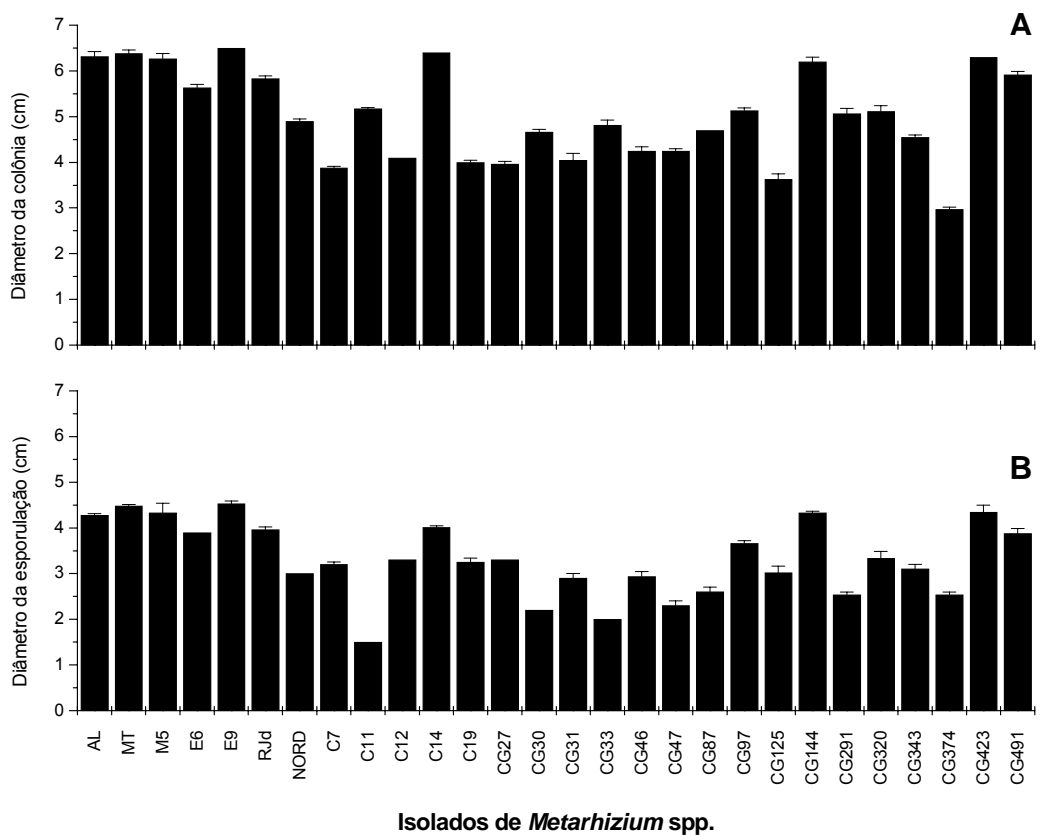


Figura 15. Influência do pH 5,0 no desenvolvimento da colônia (A) e esporulação (B) de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. As barras representam o erro padrão.

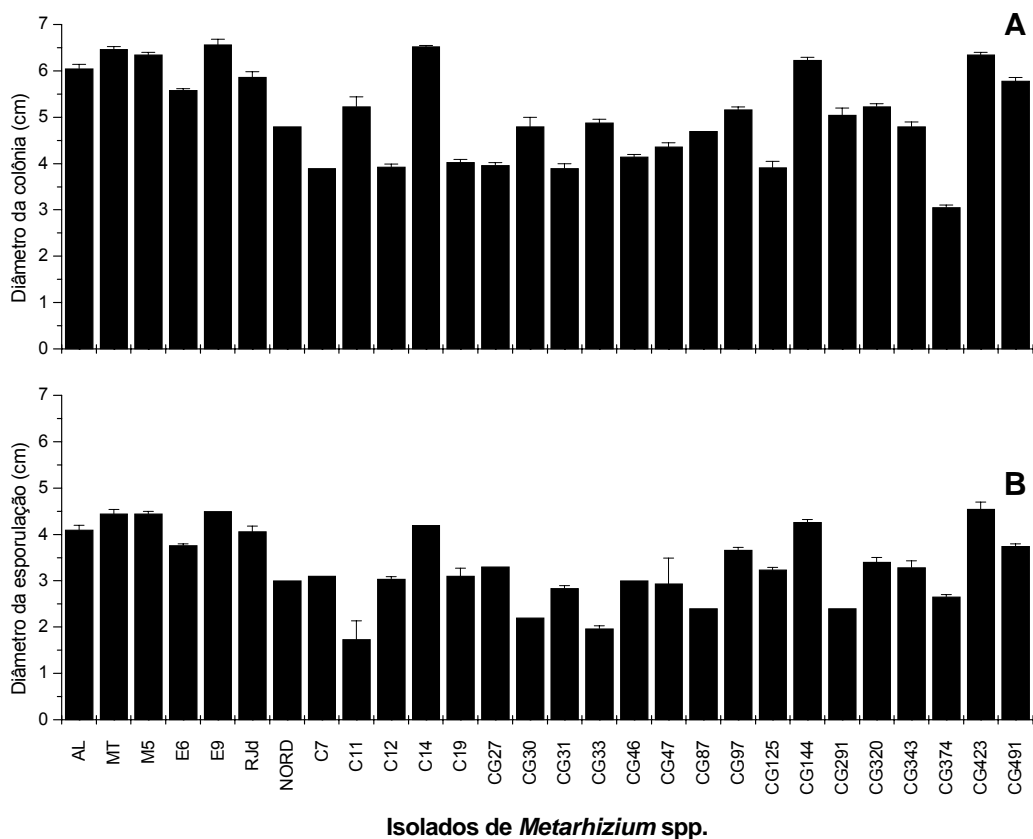


Figura 16. Influência do pH 6,0 no desenvolvimento da colônia (A) e esporulação (B) de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. As barras representam o erro padrão.

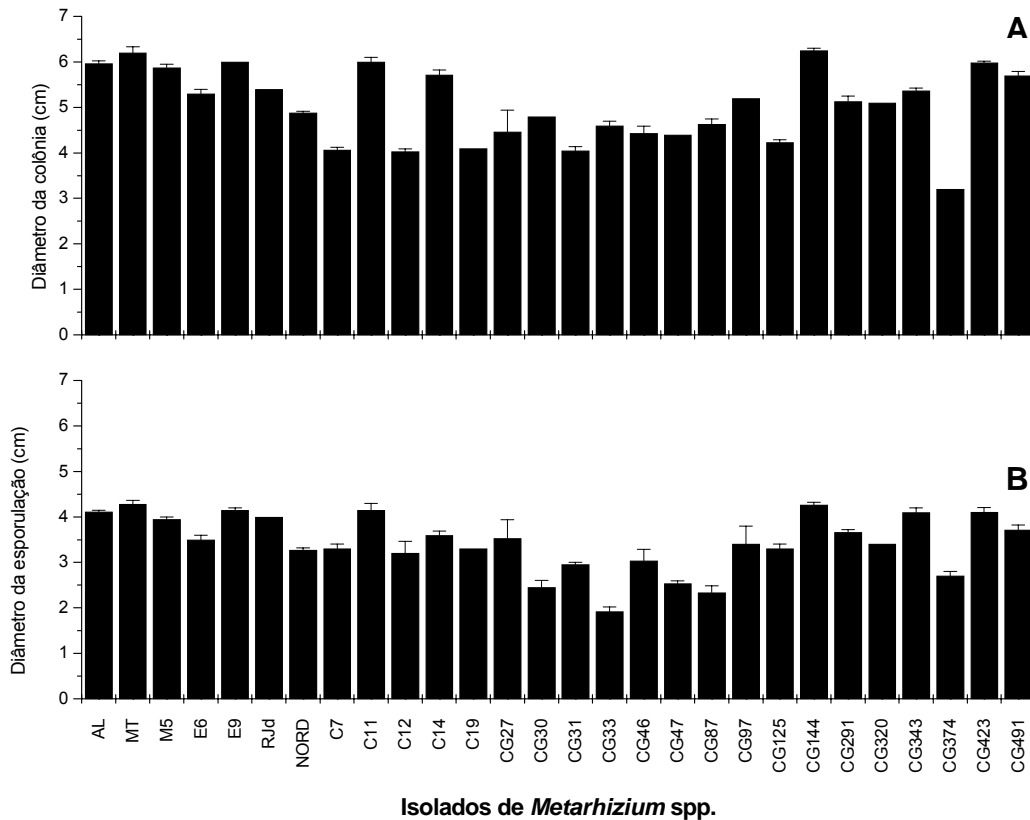


Figura 17. Influência do pH 7,0 no desenvolvimento da colônia (A) e esporulação (B) de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. As barras representam o erro padrão.

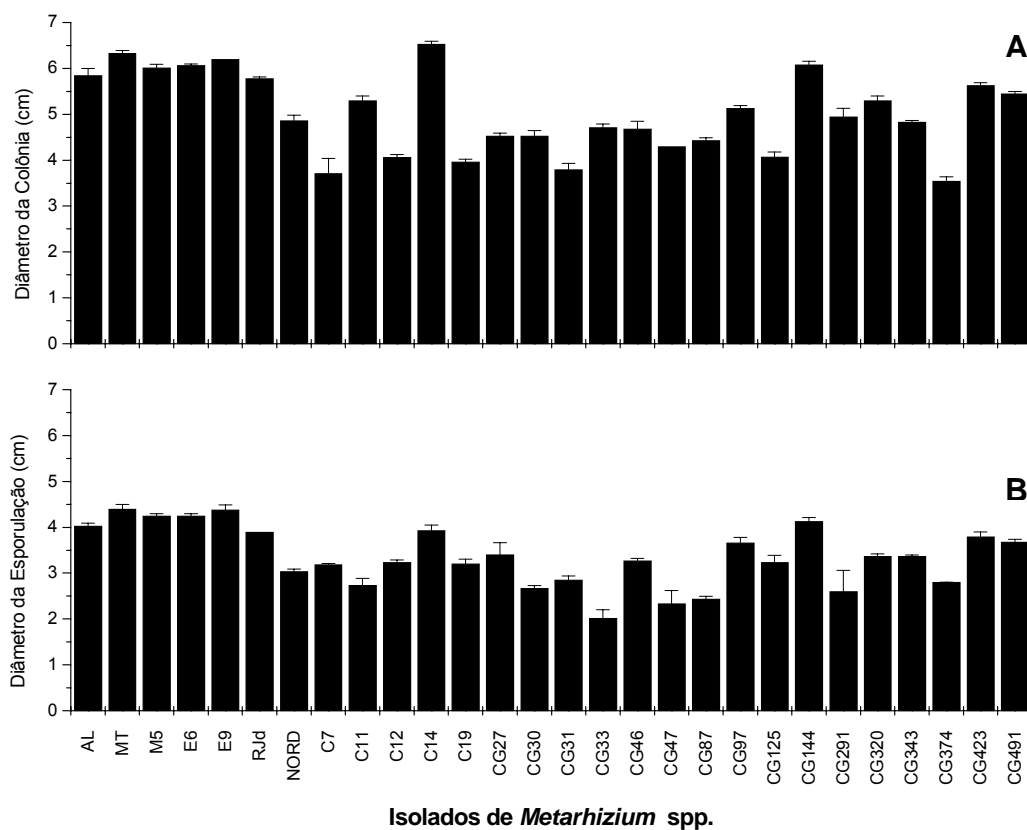


Figura 18. Influência do pH 8,0 no desenvolvimento da colônia (A) e esporulação (B) de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. As barras representam o erro padrão.

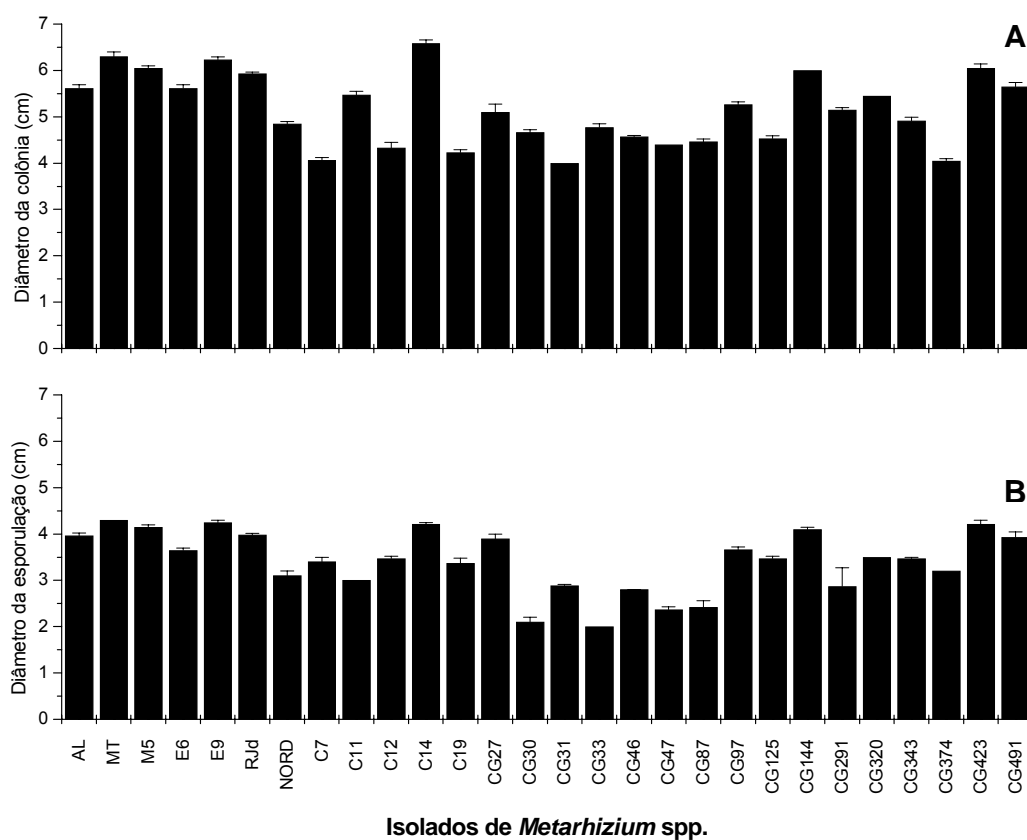


Figura 19. Influência do pH 9,0 no desenvolvimento da colônia (A) e esporulação (B) de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. As barras representam o erro padrão.



## 5. DISCUSSÃO

A taxonomia fúngica é extremamente importante devido ao papel que os fungos desempenham na natureza, particularmente os entomopatogênicos, que são utilizados no controle biológico de insetos-praga da agricultura (LIMA, 1989). Dentre os fungos entomopatogênicos mais utilizados, encontra-se *M. anisopliae*, já existindo formulações comerciais que tem como base conídios desta espécie. A correta identificação de suas variedades é extremamente importante quando se avalia seu potencial como um biocontrolador e quando se utilizam formulações a serem aplicadas a campo, visto que, a precisa identificação dos isolados é um pré-requisito para o registro e uso de um produto comercial que tem como base o fungo (YIP *et al.*, 1992).

A clássica taxonomia do gênero, baseada em critérios morfológicos e descrita por TULLOCH (1976) e ROMBACH *et al.* (1987), tem sido continuamente revista, associando-se métodos moleculares para identificação das espécies e para tentar elucidar possíveis relações entre variedade e espécies do gênero. Técnicas baseadas em RAPD-PCR (LEAL *et al.*, 1994; TIGANO & MILANI, 1995), RFLP (PIPE *et al.*, 1995; LEAL *et al.*, 1997) foram utilizadas e consideradas bastante discriminatórias para diferenciar isolados de *M. anisopliae*. Entretanto, análises filogenéticas, baseadas na seqüência da região ITS, possibilitam uma identificação mais precisa de grupos de variedades (CURRAN *et al.*, 1994). DRIVER *et al.* (2000) reavaliaram a taxonomia de *Metarhizium* spp. baseando-se em análises de seqüências da região ITS e moldes de RAPD. Estes autores encontraram um alto nível de diversidade genética entre os isolados e revelaram novas variedades dentro de *Metarhizium* spp.. Desta forma, 10 grupos distintos são atualmente reconhecidos: *M. anisopliae* var. *anisopliae*; *M. anisopliae* var. *majus*; *M. anisopliae* var. *lepidiotum* e *M. anisopliae* var. *acridum* (as duas últimas são considerados novas variedades de *M. anisopliae*); *M. album*; *M. flavoviride* var. *flavoviridae*; *M. flavoviride* var. *minus*; *M. flavoviride* var. *novazealandicum*; *M. flavoviride* var. *pemphigum* e *M. flavoviride* Type E (sendo que as três últimas representam novas variedades de *M. flavoviridae*).

A região ITS é constituída por 500-800pb sendo bastante utilizada em caracterizações moleculares. De acordo com PANTOU *et al.*, (2003) o rDNA de *M. anisopliae* contém 8118pb, incluindo os genes de rRNA de 18S, 5,8S e 28S.

O seqüenciamento da região do ITS permite uma comparação com seqüências de outras linhagens de *Metarhizium* spp. já conhecidas e o alinhamento e a análise filogenética confirmam a identidade taxonômica do isolado analisado. Nossos resultados mostram claramente que dois dos isolados identificados como *M. flavoviride* ou *M. anisopliae* var. *acridum* (DRIVER *et al.* 2000) (CG291 e CG423) agruparam junto com *M. anisopliae* var. *anisopliae*, divergindo portanto, da sua classificação original. Um dos isolados analisados (CG423) foi previamente identificado como *M. flavoviride*, baseado na técnica de RAPD por MAGALHÃES *et al.* (1997). Segundo estes autores, este isolado brasileiro apresentou um alto padrão de homogeneidade (> 83% similaridade) com o isolado australiano CG291. Estes autores também relataram que estes isolados (CG291 e CG423) foram primeiramente classificados como *M. anisopliae*, levando-se em consideração seus caracteres morfológicos. Nossas análises identificaram estes dois isolados como sendo pertencente à espécie *M. anisopliae* var. *anisopliae* e não a *M. flavoviride* (ou atualmente segundo DRIVER *et al.*, 2000, *M. anisopliae* var. *acridum*). A similaridade encontrada entre as seqüências da região do rDNA destes isolados com *M. anisopliae* var. *anisopliae* foi de 98%, sendo que a análise da árvore filogenética confirmou esta clara separação. Estes resultados estão de acordo com a classificação original destes isolados, ou seja, *M. anisopliae* e não *M. flavoviride*.

Nossas análises confirmaram a identidade taxonômica dos isolados CG27 e CG320, considerados *M. anisopliae* var. *majus*, e determinou a variedade do isolado CG374, classificado apenas como *M. anisopliae*. Esta linhagem, isolada de espécies de Coleóptera: Scarabeidae, nas Ilhas do Sul do Pacífico, é identificada como *M. anisopliae* (ATCC 26471), e ficou claramente agrupada com *M. anisopliae* var. *majus*, confirmando os resultados da análise morfologia de seus conídios, através da MEV.

Estes dados reafirmam que a variabilidade detectada nas seqüências de ITS1 e ITS2 é uma ferramenta muito útil para discriminar diferentes espécies de fungos, incluindo *Metarhizium* spp..

Isolados de *Metarhizium* ssp. têm sido amplamente utilizados para o controle de pragas da agricultura (ALVES, 1998; SHAH & PELL, 2003) e, atualmente, sua patogenicidade tem sido avaliada para carrapatos *B. microplus*, sendo candidatos promissores para seu biocontrole (CORREIA *et al.*, 1998; MONTEIRO *et al.*, 1998; BITTENCOURT *et al.*, 1999; FRAZZON *et al.*, 2000; ONOFRE *et al.*, 2001). Desta forma, neste estudo, 15 isolados deste fungo ainda não testados em bioensaios, foram avaliados quanto à patogenicidade em carrapatos *B. microplus*. O desenvolvimento do fungo sobre a cutícula do carrapato tratado, mas não no controle negativo, sugere que o fungo causou a morte do carrapato. *M. anisopliae* exibiu diferentes graus de especificidade. Assim, alguns isolados, apesar de crescerem sobre a cutícula do carrapato, não provocaram a morte dos mesmos. A patogenicidade do fungo foi demonstrada pela diferença significativa da mortalidade entre os carrapatos controle e tratados. Três isolados classificados como *M. anisopliae* var. *anisopliae* (C14, CG47 e CG97) foram considerados bastante patogênicos para *B. microplus*. Nenhum dos isolados pertencentes à var. *majus* foi patogênico para *B. microplus*, provavelmente devido a sua especificidade de hospedeiro (preferencialmente para larvas de *Oryctes*, Coleoptera) (ROMBACH *et al.* 1987; RAKOTONIRAINY *et al.*, 1994).

O isolado E6, considerado nosso controle positivo, teve sua patogenicidade avaliada anteriormente por FRAZZON *et al.* (2000). Estes autores relataram que a taxa de mortalidade do isolado E6 foi de 50% em 5 dias. Entretanto, nesse estudo, a patogenicidade desse isolado foi aumentada para cerca de 100% dentro de 4 dias, após passagem pelo carrapato, confirmando a hipótese de que a infectividade do isolado é aumentada com seu re-isolamento. Nossos resultados confirmam alta taxa de mortalidade, 98% aos 4 dias de infecção para o isolado E6 e mostram a alta patogenicidade, sem re-isolamento, dos isolados CG97, C14 e CG47, cerca de 99,6%, 97,2% e 90,4%, respectivamente, aos 4 dias de infecção, indicando portanto, que estes isolados são bastante efetivos para controle de *B. microplus*. Outros três isolados, CG30, CG46 e CG291, tiveram sua patogenicidade previamente avaliada por ONOFRE *et al.* (2001) também em fêmeas de *B. microplus*. Estes autores relataram que os isolados CG30 e CG46 foram menos patogênicos do que o isolado CG291, com 57,17%, 60,02% e

75,91% de mortalidade aos 7 dias de infecção com inoculação de  $1 \times 10^8$  conídios.ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Diferentemente destes autores, em nossos experimentos, o isolado CG46 foi estatisticamente mais patogênico do que os outros dois isolados (teste de Duncan, 0,05%), tendo uma taxa de mortalidade de 26,64% (média de 6,66 carrapatos mortos) ao 4º dia de infecção com a mesma concentração de conídios.

*M. anisopliae* invade seu hospedeiro pela direta penetração da cutícula e pela secreção de enzimas tais como proteases, quitinases e lipases que auxiliam o processo de penetração (HEGEDUS & KHACHATOURIANS, 1995; KRIEGER *et al.*, 2003). A penetração mecânica do fungo na cutícula do hospedeiro é iniciada pela formação de estruturas diferenciadas na ponta da hifa denominadas de apressório. Estas estruturas se aderem firmemente à cutícula e fazem pressão sobre esta permitindo a entrada do fungo. Nós observamos, por MEV, a presença do apressório em dois isolados, um patogênico e um não patogênico para *B. microplus* (CG97 e CG30). Estes apressórios penetraram na cutícula do carrapato após 1 dia de infecção. Entretanto, só o processo de penetração do fungo não foi suficiente para causar a morte do hospedeiro, confirmando que outros fatores, tais como as enzimas e/ou toxinas (destruxinas) secretadas pelo fungo, exercem papel fundamental para a patogenicidade do fungo e que, determinados isolados, são realmente espécie-específicos quanto sua patogenicidade.

A presença de vírus de dsRNA é amplamente correlacionada com a diminuição da virulência do fungo, principalmente para fungos fitopatogênicos (CHU *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2003). Entretanto, MARTINS *et al.* (1999) relataram pela primeira vez, que diferentemente dos fungos fitopatogênicos, a presença de dsRNA não causa hipovirulência em fungos entomopatogênicos. Seus experimentos com isolados isogênicos de *M. flavoviride*, com e sem dsRNA, não mostraram hipovirulência dos isolados contendo dsRNA nos testes de patogenicidade contra gafanhotos. Diferentemente, FRAZZON *et al.* (2002) verificaram que isolados livres de dsRNA foram mais infectivos para *B. microplus* do que isolados com dsRNA, porém, não encontraram correlação entre virulência e a presença ou não de dsRNA. Nós avaliamos a patogenicidade de diferentes isolados de *Metarhizium* ssp. que apresentavam ou não dsRNA em carrapatos *B. microplus* e apesar de avaliar diferentes isolados, não observamos correlação

entre a presença de dsRNA e o grau de patogenicidade do fungo. O isolado E6, assim como o isolado CG97 foram altamente virulentos para o carrapato *B. microplus*. Entretanto, o isolado E6 não contém elementos dsRNA, enquanto que o isolado CG97 os contém. Por outro lado, os isolados CG33 e CG87, que contém elementos de dsRNA, não foram virulentos para o carrapato *B. microplus*, assim como os isolados C12 e CG125, livres de dsRNA. Levando em consideração estes resultados, podemos acreditar que a presença de dsRNA em isolados de *Metarhizium* ssp, não interferiu na sua patogenicidade para carrapatos *B. microplus* e que outros fatores, tais como a especificidade do fungo para determinado hospedeiro, possam estar envolvidos no grau de virulência destes isolados.

A alta incidência de elementos dsRNA em populações naturais e pertencentes a coleções de fungos entomopatogênicos como *B. bassiana* e *M. anisopliae*, foi demonstrada por MELZER & BIDOCHKA (1998), relatando que 38,4% dos isolados de *M. anisopliae*, em populações naturais, continham vírus. A presença de dsRNA no fungo sugere infecção por micovírus. RNA dupla fita foi detectado por eletroforese em gel de agarose, após tratamento com a enzima nuclease S1 em 21 de 28 isolados estudados. A presença das bandas após o tratamento com a enzima Nuclease S1 indica que estas são elementos de RNA fita dupla, visto que esta enzima não degrada RNA fita dupla. Além disto, estes elementos foram completamente degradados quando o DNA foi tratado com RNase A. Nossos resultados confirmam os resultados obtidos por BOGO *et al.* (1996), FRAZZON *et al.* (2000) e GIMENEZ-PECCI *et al.* (2002) que verificaram a presença de elementos de dsRNA nos isolados AI, RJd, M5, CG144 e CG423 e por MARTINS *et al.* (1999) que encontraram bandas extras, de dsRNA, nos isolados CG291 e CG423. Entretanto, nossos resultados não confirmam a relatada ausência de dsRNA nos isolados E9 e MT, observada por FRAZZON *et al.* (2000). Em nossas observações por eletroforese em gel de agarose dos ácidos nucléicos dos isolados E9 e MT, nota-se claramente a presença de uma banda extra de ácidos nucléicos, localizada logo abaixo do DNA genômico. Esta banda permaneceu após tratamento com a enzima nuclease S1 e que foi degradada pela RNase A, portanto, considerada um elemento de dsRNA.

Vários tipos de padrões de dsRNA foram observados nos isolados estudados, com ocasional isolados contendo o mesmo padrão. A variabilidade de padrões de dsRNA é uma indicação do número de micoviroses de dsRNA presente em populações naturais (MELZER & BIDOCHKA 1998) e diferentes polimorfismos de dsRNA já foram relatados para fungos entomopatogênicos, incluindo *M. anisopliae* (BOGO *et al.*, 1996; MELZER & BIDOCHKA, 1998; GIMENEZ-PECCI *et al.*, 2002). Segundo MELZER & BIDOCHKA (1998), cerca de 18 diferentes tipos de perfis de dsRNA foram observados em isolados de *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *B. bassiana*, os quais apresentavam considerável variação no número e tamanho das bandas.

Fatores ambientais, como temperatura e umidade relativa, podem diminuir a eficácia de fungos entomopatogênicos utilizados como agentes de controle biológico, pelo simples fato de limitarem o seu desenvolvimento na superfície do inseto (FARGUES *et al.*, 1997; ARTHURS & TOMAS, 2001). A maioria destes fungos requer cerca de 90% de umidade relativa e uma temperatura adequada de crescimento para germinação, formação do tubo germinativo e infecção (INGLIS *et al.*, 2001). Desta maneira, a temperatura é um fator determinante para a taxa de germinação, crescimento, esporulação e sobrevivência de fungos entomopatogênicos (GOETTEL & INGLIS, 1997). Segundo HYWEL-JONES & GILLESPIE (1990), os efeitos da temperatura devem ser considerados quando se escolhe um novo isolado para desenvolvimento de um micoinseticida.

A avaliação do efeito da temperatura no crescimento de fungos entomopatogênicos pode ser facilmente realizada utilizando a medida do diâmetro da colônia em placa de Petri. Estudos a este respeito podem verificar a possível existência de isolados resistentes a condições ambientais extremas e desta forma, selecionar isolados mais eficazes e mais adaptados às condições de campo, que possam vir a serem utilizados como agentes de biocontrole. De acordo com WALSTAD (1970) e ALVES (1998) a temperatura ótima para o desenvolvimento do fungo *Metarhizium* ssp. varia entre 25 e 30°C e, segundo HALLSWORTH & MAGAN (1996), OUEDRAOGO *et al.* (1997) e DIMBI *et al.* (2004), a melhor temperatura para o crescimento de isolados de *Metarhizium* ssp. é 25°C. Diferentemente destes autores, em nossos estudos a melhor temperatura de crescimento da colônia e esporulação, para a maioria dos isolados, foi 28°C. A

resposta de crescimento e esporulação em todas temperaturas avaliadas foi variável entre os isolados analisados, não existindo correlação entre variedades e diâmetro da colônia. Similares resultados foram relatados por DIMBI *et al.* (2004), que mostraram que a taxa de crescimento micelial foi significativamente afetada pela temperatura. YIP *et al.* (1992) propuseram a separação de isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* baseada primariamente no crescimento dos isolados a 5°C (espécie *cold-active*) e 37°C (espécie *heat-active*). HALLSWORTH & MAGAN (1999) relataram pela primeira vez a presença de isolados de *Metarhizium* ssp. capazes de crescer a 40°C em meio SDA. Diferentemente destes resultados, os isolados utilizados neste estudo foram incapazes de se desenvolverem em temperaturas extremas (2°C, 37°C ou 40°C). Entretanto, vários dos isolados permaneceram viáveis quando mantidos a 37°C, sendo esta viabilidade verificada por nova incubação do isolado na temperatura de 28°C. Dois destes isolados (C14 e CG97) foram bastante patogênicos para o carrapato *B. microplus*. Ainda, cabe ressaltar que o isolado C14 foi capaz de se desenvolver à temperatura de 10°C. Estes resultados indicam que estes isolados podem ser mais resistentes em situações extremas, o que pode favorecer sua utilização a campo.

Nenhuma correlação foi observada entre o crescimento da colônia ou esporulação do fungo à temperatura ótima de crescimento (28°C) e a presença de dsRNA entre os isolados. Estes resultados são condizentes com os descritos por MELZER & BIDOCHKA (1998). Estes autores fizeram uma comparação entre isolados de *M. anisopliae* que apresentavam ou não vírus dsRNA com variação do fenótipo, incluindo patogenicidade, e não encontraram correlação entre a presença ou ausência de dsRNA com variações na taxa de crescimento ou variabilidade fenotípica entre os isolados de *Metarhizium* ssp.. Diferentemente, a presença de dsRNA pode alterar o fenótipo de fungos fitopatogênicos como, por exemplo, em *Fusarium graminearum* (CHU *et al.*, 2002). Estes autores detectaram diferenças significativas na taxa de crescimento micelial entre isolados livres ou não de dsRNA, sendo que isolados que apresentavam dsRNA se desenvolviam mais lentamente e, conseqüentemente, apresentavam menor diâmetro da colônia do que isolados livres de vírus. Entretanto, estes autores não verificaram correlação entre isolados que apresentavam ou não vírus com a taxa de esporulação.

Outros fatores, tais como o pH, também podem alterar o desenvolvimento de fungos entomopatogênicos. Para *M. anisopliae* o melhor pH de desenvolvimento segundo ALVES (1998) é pH 6,9. Entretanto, este fungo pode tolerar uma ampla variação de pH (de 2,0 a 8,5) (ALVES, 1998), sugerindo que estes fungos podem regular o pH citosólico mais efetivamente que muitas outras espécies que têm restrita faixa de pH para desenvolvimento (HALLSWORTH & MAGAN, 1996). HALLSWORTH & MAGAN (1996) relataram a grande vantagem da capacidade destes fungos crescerem em pHs abaixo de 7,0, visto que pode facilitar a produção em massa do fungo em condições de pH que reduzam ou inibam a proliferação de outros microrganismos ou contaminantes como bactérias. Estes autores ainda relataram que o ótimo crescimento de isolados de *Metarhizium* ssp. foi alcançado na faixa de pH entre 5,0 e 8,0, sendo que o crescimento declinou acima ou abaixo destes valores. Em nossos estudos, observamos que os diferentes isolados de *Metarhizium* ssp. analisados toleraram bem a variação de pH entre 4,0 e 9,0 e que todos os isolados se desenvolveram em todos os pHs, não havendo grandes declínios de crescimento ou da esporulação dos isolados nos pHs 4,0 ou 9,0.



## REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B. *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiróz, 1998.
- ARTHURS, S.; THOMAS, M. B. Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. *J. Invertebr. Pathol.*, 78:59-65, 2001.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASCARENHAS, A. G.; FACCINI, J. L. H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. *Ciência Rural*, 29:351-354, 1999.
- BOGO, M. R.; QUEIROZ, M. V.; SILVA, D. M.; GIMENEZ, M. P. AZEVEDO, J. L.; SCHRANK, A. Double-stranded RNA and isometric virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.*, 100:1468-1472, 1996.
- BRIDGE, P. D.; ARORA, D. K. Interpretation of PCR methods for species definition. In: BRIDGE, P. D.; ARORA, D. K.; REDDY, C. A.; ELANDER, R. P. (eds.) *Applications in PCR mycology*. CABI Publishing, p. 63-84, 1998.
- BRIDGE, P. D.; PRIOR, C.; SAGBOHAN, J.; LOMER, C. J.; CAREY, M.; BUDDIE, A. Molecular characterization of isolates of *Metarhizium* from locusts and grasshoppers. *Biodiversity and Conservation*, 6:177-189, 1997.
- CASTRO, M.; KRAMER, K.; VALDIVIA, L.; ORTIZ, S.; BENAVENTE, J.; CASTILHO, A. A new double-stranded RNA mycovirus from *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 175:95-99, 1999.
- CASTRO, M.; KRAMER, K.; VALDIVIA, L.; ORTIZ, S.; CASTILHO, A. A double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence-associated traits to *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 228:87-91, 2003.
- CHU, Y. M.; JEON, J. J.; YEA, S. J.; KIM, Y. H.; YUN, S. H.; LEE, Y. W.; KIM, K. H. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:2529-2534, 2002.
- COBB, B. D.; CLARKSON, J. M. Detection of molecular variation in the insect pathogenic fungus *Metarhizium* using RAPD-PCR. *FEMS Microbiol. Lett.*, 112:319-324, 1993.
- CORREIA, A. C. B.; FIORIN, A. C.; MONTEIRO, A. C.; VERÍSSIMO, C. J. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. *J. Invertebr. Pathol.*, 71:189-191, 1998.

- CURRAN, J.; DRIVER, F.; BALLARD, J. W. O.; MILNER, R. J. Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycol. Res.*, 98:547-552, 1994.
- DAY, P. R.; DODDS, J. A.; ELLISTON, J. E.; JAYNES, R. A. Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. *Phytopathology*, 67: 1393-1396, 1977.
- DETROY, R. W.; DEMARINE, D. M.; STILL, P. E. Mycoviruses of *Penicillium stoloniferum*: influence of carbon-nitrogen nutrition upon replication. *Can. J. Microbiol.*, 24:947-953, 1978.
- DIMBI, S.; MANIANIA, N.; 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*, 49:83-94, 2004.
- DRIVER, F.; MILNER, R. J. PCR applications to the taxonomy of entomopathogenic fungi. In: BRIDGE, P. D.; ARORA, D. K.; REDDY, C. A.; ELANDER, R. P. (eds.) *Applications in PCR mycology*. CABI Publishing, p. 153-186, 1998.
- DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol. Res.*, 104:134-150, 2000.
- EDEL, V. Polymerase chain reaction in mycology: an overview. In: BRIDGE, P. D.; ARORA, D. K.; REDDY, C. A.; ELANDER, R. P. (eds.) *Applications in PCR mycology*. CABI Publishing, p. 1-20. 1998.
- 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*, 89:383-392, 1997.
- 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*. *Vet. Parasitol.*, 94:117-125, 2000.
- GILLINGS, M. R.; TESORIERO, L. A.; GUNN, L. V. Detection of double-stranded RNA and virus-like particles in Australian isolates of *Pythium irregulare*. *Plant Pathol.*, 42:6-15, 1993.
- GIMÉNEZ-PECCI, M. P.; BOGO, M. R.; SANTI, L.; MORAES, C. K.; CORRÊA, C. T.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Characterization of mycoviruses and analyses of chitinases secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. *Curr. Microbiol.*, 45:334-339, 2002.
- GLARE, T. R.; INWOOD, A. J. Morphological and genetic characterization of *Beauveria* spp. from New Zealand. *Mycol. Res.*, 102:250-256, 1998.
- GOETTEL, M. S.; INGLIS, D. Fungi: Hyphomycetes. In: LACEY, L. (ed.) *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, p. 213-249, 1997.

- HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41:95-98, 1999.
- HALLSWORTH, J. E.; MAGAN, N. Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:2435-2442, 1996.
- HALLSWORTH, J. E.; MAGAN, N. Water and temperature relations of growth of entomogenous fungus *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 74:261-266, 1999.
- HEGEDUS, D. D.; KHACHATOURIANS, G. G. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotech. Adv.*, 13:455-490, 1995.
- HERMOSA, M. R.; KECK, E.; CHAMORRO, I.; RUBIO, B.; SANZ, L.; VIZCAINO, J. A.; GRONDONA, I.; MONTE, E. Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycol. Res.*, 108:897-906, 2004.
- HYWEL-JONES, N. L.; GILLESPIE, A. T. Effect of temperature on spore germination in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Mycol. Res.*, 94:389-392, 1990.
- INGLIS, G. D.; GOETTEL, M. S.; BUTT, T. M.; STRASSER, H. Use of Hyfomicetous fungi for managing insect pests. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (eds.) *Fungi as Biological Agents: Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing, p. 23-69, 2001.
- KATSU, M.; KIDD, S.; ANDO, A.; MORETTI-BRANCHINI, M. L.; MIKAMI, Y.; NISHIMURA, K.; MEYER, W. The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *FEMS Yeast Res.*, 4:377-388, 2004.
- KRIEGER DE MORAES, C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Curr. Microbiol.*, 46: 205-210, 2003.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. Mega 2: Molecular Evolutionary Genetics Analyses Software, Arizona state University, Tempe, Arizona, USA, 2001.
- LEAL, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; BUTT, T. M.; CARDER, J. H.; BURROWS, P. R.; PEBERDY, J. F. Amplification and restriction endonuclease digestion of the Pr1 gene for the detection and characterization of *Metarhizium* strains. *Mycol. Res.*, 101:257-265, 1997.
- LEAL, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; BUTT, T. M.; PEBERDY, J. F. Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* by RAPD-PCR. *Mycol. Res.*, 98:1077-1081, 1994.

- LIMA, A. L. Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma* spp. isolados de solo do cerrado brasileiro. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2002.
- LIMA, E. A. L. A. Aspectos taxonômicos e citológicos de Hyphomycetes (Deuteromycotina) entomopatogênicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84(sup.III):17-20, 1989.
- LIU, Z. Y.; LIANG, Z. Q.; LIU, A. Y.; YAO, Y. J.; HYDE, K. D.; YU, Z. N. Molecular evidence for teleomorph-anamorph connections in *Cordyceps* based on ITS-5.8S rDNA sequences. *Mycol. Res.*, 106:1100-1108, 2002.
- LIU, Z. Y.; LIANG, Z. Q.; WHALLEY, A. J. S.; YAO, Y. J.; LIU, A. Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *J. Invertebr. Pathol.* 78:178-182, 2001.
- MAGALHÃES, B. P.; FARIA, M.; TIGANO, M.S. Characterization and virulence of a brasilian isolate of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal (Hyphomycetes). *Memoirs Entomol. Soc. Canada*, 171:313-321, 1997.
- MARTINS, M. K.; FURLANETO, M. C.; SOSA-GOMES, D. R.; FARIA, M. R.; FUNGARO, M. H. P. Double-stranded RNA in the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride*. *Curr. Genet.*, 36:94-97, 1999.
- MAVRIDOU, A.; TYPAS, M. A. Intraspecific polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* revealed by analysis of rRNA gene complex and mtDNA RFLPs. *Mycol. Res.*, 102:1233-1241, 1998.
- McCABE, P. M.; PFEIFFER, P.; ALFEN, N.K.V. The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. *Trends Microbiol.*, 7:377-381, 1999.
- McCAMMON, S. A.; RATH, A. C. separation of *Metarhizium anisopliae* strains by temperature dependent germination rates. *Mycol. Res.*, 98:1253-1257, 1994.
- MELZER, M. J.; BIDOCHKA, M. J. Diversity of double-stranded viruses within populations of entomopathogenic fungi and potential implications for fungal growth and virulence. *Mycologia*, 90:586-594, 1998.
- MILNER, R. J. Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. *Biocontrol News Information*, 2:47N-50N, 2000.
- MONTEIRO, A. C.; FIORIN, A. C.; CORREIA, A. C. B. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsh.) sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Rev. Microbiol.*, 29:109-112, 1998.
- ONOFRE, S. B.; MINIUK, C. M.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. *Am. J. Vet. Res.*, 62:1478-1480, 2001

- OUEDRAOGO, A.; FARGUES, J.; GOETTEL, M. S.; LOMER, C. J. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia*, 137:37-43, 1997.
- PANTOU, M. P.; MAVRIDOU, A.; TYPAS, M. A. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. *Fungal Gen. Biol.*, 38:159-174, 2003.
- PIPE, N. D.; CHANDLER, D.; BAINBRIDGE, B. W.; HEALE, J. B. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal RNA gene complex of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.*, 99:485-491, 1995.
- RANGEL, D. N. E.; BRAGA, G. U. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographical regions. *J. Invertebr. Pathol.*, 88:116-125, 2005.
- RAKOTONIRAINY, M. S.; CARIOU, M. L.; BRYGOO, Y.; RIBA, G. Phylogenetic relationships within the genus *Metarhizium* based on 28S rRNA sequences and isozyme comparison. *Mycol. Res.*, 98:225-230, 1994.
- ROBINSON, H. L.; DEACON, J. W. Double-stranded RNA elements in *Rhizoctonia solani* AG 3. *Mycol. Res.*, 106:12-22, 2002.
- ROMBACH, M. C.; HUMBER, R. A.; EVANS, H. C. *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leaf and planthopper of rice. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 88:451-459, 1987.
- SAUFRAMANIEN, I.; JOSHI, A.; GAPLOKRISHNA, T. Intraspecific variation in the internal transcribed spacer region of rDNA in black gram (*Vigna mungo* (L.) Hepper). *Cur. Sci.*, 85:798-802, 2003.
- SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 61:413-423, 2003.
- ST LEGER, R. J.; MAY, B.; ALLEE, L. L.; FRANK, D. C.; SATAPLES, R. C. ROBERTS, D. W. Genetic differences in allozymes and formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 60:407-411, 1992.
- TAUZ, D.; RENZ, M. Na optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Analytical Bioch.*, 132:14-19, 1983.
- TIGANO-MILANI, M. S.; GOMES, A. C. M. M.; SOBRAL, B. W. S. Genetic variability among Brazilian isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 65:206-210, 1995.
- TSAI, P. F.; PEARSON, M. N.; BEEVER, R. E. Mycoviruses in *Monilinia fructicola*. *Mycol. Res.*, 108:907-912, 2004.

- TULLOCH, M. The genus *Metarhizium anisopliae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 66:407-411, 1976.
- VARGA, J.; KEVEI, F.; VÁGVÖLGYI, C. Double-stranded RNA mycoviruses in section Nigri of the *Aspergillus* genus. *Can. J. Microbiol.*, 40:325-329, 1994.
- VARGA, J.; RINYU, E.; KEVEI, E.; TÓTH, B.; KOZAKIEWICZ, Z. Double-stranded RNA mycoviruses in species of *Aspergillus* sections Circumdati and Fumigati. *Can. J. Microbiol.*, 44:569-574., 1998.
- VILCHES, S.; CASTILHO, A. A double-stranded RNA mycovirus in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 155:125-130, 1997.
- WALSTAD, J. D.; ANDERSON, R. F.; STAMBAUGH, W. J.; Effects of environmental conditions on to species of muscardini fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). *J. Invertebr. Pathol.*, 16:221-226, 1970.
- WICKNER, R. B. Double-stranded RNA viruses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.*, 60:250-265, 1996.
- YIP, H. Y.; RATH, C.; KOEN, T. B. Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabaeidae: Adoryphorus couloni). *Mycol. Res.*, 96:92-96, 1992.
- ZHANG, D.; YANG, Y.; CASTLEBURY, L. A.; CERNIGLIA, C. E. A method for the large scale isolation of high transformation efficiency fungal genomic DNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, 145:261-265, 1996.

## **CAPÍTULO II: ANÁLISE MORFOLÓGICA DO PROCESSO DE INFECÇÃO DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *METARHIZIUM ANISOPLIAE* SOBRE O CARRAPATO *BOOPHILUS MICROPLUS***

### **1. INTRODUÇÃO**

#### **1.1. Controle Biológico**

O controle biológico de pragas e patógenos agrícolas por microrganismos vem sendo considerado como uma importante alternativa ao controle químico. Este método oferece algumas vantagens em relação ao uso de produtos químicos como: a) especificidade e seletividade, evitando desequilíbrios biológicos de importância no agroecossistema, por não afetarem parasitas, predadores e polinizadores e impedindo a contaminação do meio ambiente com produtos químicos tóxicos; b) atoxicidade e não poluentes do meio ambiente, se manuseados e selecionados corretamente; c) raro desenvolvimento de resistência dos insetos aos patógenos utilizados no controle; d) custo relativamente mais baixo; e) capacidade de multiplicação e dispersão no meio ambiente. Entre as desvantagens encontradas estão: a) necessidade de condições ambientais favoráveis como temperatura, umidade e luminosidade para que determinados patógenos sejam eficientes; b) desenvolvimento de técnicas de formulação viáveis; c) ação mais lenta; e) maiores cuidados no armazenamento, para que não ocorra perda de viabilidade (MESSIAS, 1989; ALVES, 1998). Vários fatores têm contribuído para a utilização de patógenos como agentes de controle biológico, sendo o principal deles, a conscientização da população sobre os problemas e riscos do uso indiscriminado de produtos químicos, incluindo a qualidade ambiental.

O controle biológico, portanto, é uma estratégia de emprego de organismos vivos para reduzir a população de determinada praga. Produtos a base de fungos podem desempenhar um importante papel na agricultura sustentável, visto que o

controle por agrotóxicos fatura em todo o mundo mais de US\$ 27 bilhões/ano e, no Brasil, cerca de US\$ 2 bilhões/ano (ROMERO, 2003).

Vários microrganismos podem ser utilizados para o controle de pragas agrícolas, como fungos, vírus e bactérias (AZEVEDO, 1998). Os fungos filamentosos são os microrganismos mais importantes para o controle biológico de insetos-praga, tendo em vista que praticamente todas as ordens de inseto, são susceptíveis ao ataque de fungos entomopatogênicos. Entre os fungos mais importantes utilizados para o controle biológico no Brasil encontram-se *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp., *Nomurea rileyi*, *Aschersonia* e *Entomophora*, *Verticillium lecanii* e *Cladosporium* ssp. (LIMA, 1989; ALVES, 1998).

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é bastante utilizado no controle biológico, sendo conhecido por infectar naturalmente mais de 300 espécies de insetos de diferentes ordens (ALVES, 1998). Apesar de vários fatores ambientais afetarem a eficácia de fungos entomopatógenos contra insetos-praga e na sua sobrevivência quando aplicado a campo, como radiação solar, temperatura, umidade relativa e ventos (INGLIS *et al.*, 2001), vários fungos já são utilizados para aplicação a campo. Formulações à base de *Metarhizium* ssp. já são utilizadas comercialmente no mundo todo para o controle de várias pestes, como cupins (Bioblast<sup>®</sup>, Biostop<sup>®</sup> e MetaGuard<sup>®</sup>) e gafanhotos (Green-Muscle<sup>®</sup>), que freqüentemente causam sérios danos para plantações na África e na Ásia (MILNER, 2000; WRAIGHT *et al.*, 2001; KASSA *et al.*, 2004). No Brasil, Metabiol<sup>®</sup> e Metarril<sup>®</sup> são os bioinseticidas formulados com conídios de *Metarhizium* ssp. disponíveis no mercado (WRAIGHT *et al.*, 2001) (Tabela 1). A maioria dessas formulações é apresentada como pó, grânulo ou concentrado em óleo. Por outro lado, BATTA (2003) relata que conídios de *M. anisopliae*, quando formulados em uma emulsão invertida (água-óleo), são mais eficientes do que quando aplicados em simples suspensão de conídios. Este tipo de mistura reduz a área de superfície da água que está diretamente em contato com o ar e disponível para evaporação, permitindo que o conídio germine e penetre no hospedeiro. Este autor demonstrou que os conídios formulados em emulsão invertida e utilizados para controle de *Bemisia tabaci* e *Tetranychus cinnabarinus* aumentaram a taxa de mortalidade das duas espécies, tanto em condições laboratoriais como a



campo, ressaltando que nestas condições, o fungo mantém sua eficácia e virulência.

No Brasil, *Metarhizium* ssp. tem sido usado em grande escala para o controle de algumas pragas da agricultura, como a cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*), a cigarrinha das pastagens (*Deois flavopicta* e *Zulia enteriana*), o percevejo da soja (espécies dos gêneros *Nezara* e *Piezodorus*) e a broca da cana (*Diatraea saccharalis*) (MESSIAS, 1989; ALVES, 1998). O primeiro relato de controle de cigarrinhas utilizando *M. anisopliae* no Brasil data do final dos anos 60, na região Nordeste, sendo que, até hoje, se utiliza *M. anisopliae* para o controle desta praga nessa região. Desde então, a produção do fungo em larga escala para controle de pragas agrícolas vem crescendo a cada ano. Em 2003 a BIOCANA produziu 25 toneladas do fungo *M. anisopliae*, para atender produtores da cana que utilizam este tipo de bioinseticida para o controle da cigarrinha, sendo a previsão para 2004 de cerca de 50 toneladas para suprir a demanda (MELLO, 2004).

Além de infectar insetos pragas agrícolas como *M. posticata*, *D. flavopicta* e *Z. enteriana* (ALVES, 1998), *Glossina* ssp. (KAAYA & MUNYINYI, 1995), *Frankliniella occidentalis* (LOPES *et al.*, 2000) e *Hoplia philanthus* (ANSARI *et al.*, 2004), vários estudos mostram a capacidade de *Metarhizium* infectar outros artrópodes, como cupins (*Coptotermes acinaciformis*) (MILNER *et al.*, 1998), carrapatos *Boophilus microplus* (CORREIA *et al.*, 1998; MONTEIRO *et al.*, 1998a, BITTENCOURT *et al.*, 1999a; FRAZZON *et al.*, 2000; ONOFRE *et al.*, 2001), *Ixodes scapularis* (ZHIOUA *et al.*, 1997), *Rhipicephalus sanguineus* (MONTEIRO *et al.*, 1998b) e *Amblyomma maculatum* (KIRKILAND *et al.*, 2004) e, ainda, vetores de doenças humanas, como *Culex quinquefasciatus* (RIBA *et al.*, 1986; LACEY *et al.*, 1988), *Aedes aegypti* (DAOUST & ROBERTS, 1982), *Anopheles gambiae* (SCHOLTE *et al.*, 2003), *Triatoma* ssp. e *Rhodnius* ssp. (LUZ *et al.*, 1998).

Tabela 1. Produtos a base de *Metarhizium* ssp. registrados ou em desenvolvimento comercial.

<b>Produto</b>	<b>Empresa</b>	<b>Alvo principal</b>	<b>Patógeno</b>
Bio-Blast	EcoScience, USA	Cupins	<i>M. anisopliae</i>
BioGreen	Bio-Care Technology, Austrália	Besouros	<i>M. anisopliae</i>
Bio-Path	EcoScience, USA	Besouros	<i>M. anisopliae</i>
Bio 1020	Bayer AG, Alemanha	Gorgulho (da videira)	<i>M. anisopliae</i>
Cobican	Probioagro, Venezuela	Cigarrinha da cana de açúcar	<i>M. anisopliae</i>
Metabiol	Plan Terra, Brasil	Cigarrinha das pastagens	<i>M. anisopliae</i>
Metarril	Plan Terra, Brasil	Cigarrinha da cana de açúcar	<i>M. anisopliae</i>
Metarhizium Schweizer	Eric Schweizer Seeds, Suíça	Lagarta branca	<i>M. anisopliae</i>
Meta-Sin	Agrobionsa, México	Broca da cana de açúcar	<i>M. anisopliae</i>
Green Muscle	Biological Control Products, África do Sul	Gafanhotos	<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i>
Metaquino	Brasil	Cigarrinha da cana de açúcar	<i>M. anisopliae</i>
BioCane	BioCane Technology Pty Ltd, Queensland	Lagarta da cana	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>

Adaptado de MILNER (2000), BUTT *et al.* (2001) e WRAIGHT *et al.* (2001).

## 1.2. O Processo de Infecção

Os fungos, inclusive *M. anisopliae*, são em sua maioria, patógenos altamente especializados na penetração via tegumento, sendo esta uma grande vantagem deste grupo, quando comparados a outros sistemas utilizados em controle biológico, como vírus e bactérias produtoras de toxinas, que só penetram no hospedeiro por via oral (AZEVEDO, 1998). Desta maneira, os fungos apresentam como vantagem um mecanismo especializado de infecção independente da ingestão, que ocorre pela penetração ativa nos hospedeiros, sendo capazes de infectar diferentes estágios de desenvolvimento destes hospedeiros, geralmente por penetração direta da cutícula. Esse mecanismo de penetração é uma combinação de pressão mecânica e degradação enzimática.

A cutícula dos artrópodes é, portanto, uma barreira química e fisicamente complexa para os fungos penetrarem, sendo a principal barreira para parasitismo e doença (VINCENT & WEGST, 2004). A cutícula é secretada por uma única camada de células epidérmicas e é composta por duas camadas, a epicutícula e a procutícula. A epicutícula é uma camada fina, não-quitinosa, localizada sobre a procutícula, recoberta por uma camada de cera composta por ácidos graxos, lipídios e esteróis. A procutícula compreende a maior parte da cutícula e é composta principalmente de quitina e proteínas, sendo que toda quitina se apresenta ligada às proteínas, não existindo quitina isolada no tegumento dos artrópodes. Usualmente a procutícula é sub-dividida em exocutícula e endocutícula (HADLEY, 1982; GALLO, 1988; CLARKSON & CHARNLEY, 1996) (Figura 1). Exceto pela camada epicuticular, a cutícula dos artrópodes é, portanto, uma camada de material composto por quitina cristalina embebida em uma matriz de proteínas, polifenóis e água, com pequena quantidade de lipídios (HACKMAN, 1973, VINCENT & WEGST, 2004), sendo que a maioria das propriedades da cutícula depende da quantidade, organização e interações destes componentes (ANDERSEN, 1979). Nos carrapatos, assim como nos insetos, a procutícula é composta por proteína e quitina, entretanto, diferentemente dos insetos, a proporção de quitina é muito menor (HACKMAN & FILSHIE, 1982). A quantidade usual de quitina presente na procutícula dos insetos varia entre 20 e 50%, sendo relatada a presença de 30,1% em gafanhotos (BIDOCHKA *et al*, 1997). Por outro

lado, na cutícula abdominal de *Boophilus* é descrito a presença de apenas 3,8% de quitina (ANDERSEN, 1979).

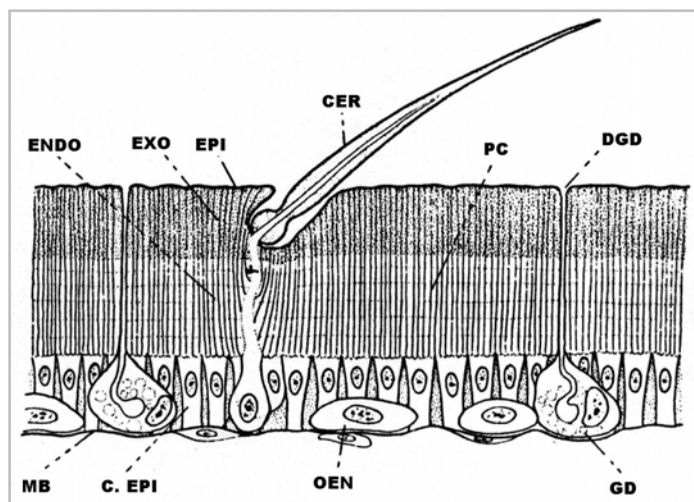


Figura 1. Esquema da cutícula dos artrópodes. ENDO: endocutícula. EXO: exocutícula. EPI: epicutícula. CER: cerda. PC: canal do poro. DGB: ducto da glândula dérmica. MB: membrana basal. CEPI: célula epidérmica. OEN: oenócitos. GD: glândula dérmica (WIGGLESWORTH, 1972).

Devido à complexidade da cutícula dos artrópodes, os patógenos que penetram via tegumento, como os fungos entomopatogênicos, produzem enzimas hidrolíticas como lipases, proteases e quitinases que possibilitam a abertura de orifícios de penetração nas cutículas dos hospedeiros (ST LEGER *et al.*, 1986a, 1986b; KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2003).

As proteases têm um papel importante na degradação da cutícula. Estudos com *M. anisopliae* demonstram que as proteases são as primeiras enzimas produzidas pelo fungo no momento da penetração, sendo as responsáveis pela penetração do fungo na cutícula de insetos (ST LEGER *et al.*, 1988). Já foram descritas três proteases produzidas por *M. anisopliae*, denominadas PR1, PR2 e PR4 (SAMUELS & PATERSON, 1995; BRAGA *et al.*, 1999). A PR1 é a principal protease, por ser capaz de degradar as proteínas da cutícula e por ser produzida em grande quantidade pelas estruturas de penetração, sendo indicada como um dos fatores responsáveis pela virulência do fungo (ST LEGER *et al.*, 1988;

BRAGA *et al.*, 1999). Desta forma, a PR1 assume um papel importante na degradação da cutícula durante o processo de penetração (ST LEGER *et al.*, 1987; PATERSON *et al.*, 1994). Por outro lado, o papel da PR2 na patogenicidade do fungo ainda não está bem esclarecido, sendo esta protease relacionada com mecanismos de controle celular, podendo, junto com a PR4, exercer um papel regulador da PR1, facilitando assim a sua rápida ativação (SAMUELS & PATERSON, 1995).

Assim como as proteases, as quitinases também são produzidas pelo fungo, visto que as microfibrilas de quitina também são componentes estruturais da cutícula do inseto e, portanto, uma barreira para a penetração do fungo. Entretanto, as quitinases não são detectadas nos estágios iniciais da penetração, mas sim após a secreção das enzimas proteolíticas. Em meio de cultura contendo quitina, as proteases são sintetizadas rapidamente e em grande quantidade quando comparadas com as quitinases, sendo que nenhuma produção de endoquitinase é observada antes ou durante a penetração da hifa na cutícula dos hospedeiros (ST LEGER *et al.*, 1987). Obviamente, o fato da cutícula dos insetos apresentar uma predominância de proteínas (cerca de 70%), aliado ao fato da quitina existente na cutícula estar embebida na matriz de proteínas, é necessário haver inicialmente a degradação das proteínas para haver liberação e posterior degradação da quitina (ST LEGER *et al.*, 1986c). *M. anisopliae* produz várias enzimas quitinolíticas, dentre elas a CHIT1 (ST LEGER *et al.*, 2001) e a CHIT30 (PINTO *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2005). Assim como as proteases, as quitinases são determinantes de patogenicidade, entretanto, diferentemente das proteases onde a superprodução da PR1 exibiu 25% de redução no tempo de morte de *M. sexta* (ST LEGER *et al.*, 1996c), a superprodução de quitinases parece não alterar a virulência do fungo atacando o mesmo inseto (SCREEN *et al.*, 2001). Outras enzimas como lipases (HEGEDUS & KHACHATOURIANS, 1995) e  $\beta$ -glicanases (LÜBECK, 2004) também têm sido relacionadas com o mecanismo de penetração de *M. anisopliae*.

Associada às enzimas hidrolíticas, a produção de toxinas, denominadas de destruxinas é apontada como um fator de virulência de *Metarhizium* ssp., visto que estas toxinas são conhecidas por acelerarem a morte dos insetos (ROBERTS, 1969; WANG *et al.*, 2004). Os efeitos das destruxinas incluem

paralisa de músculos e inibição das funções dos hemócitos e túbulos de Malpighi (KERSHAW *et al.*, 1999). Desta forma, os fatores apontados como possíveis determinantes de virulência de *M. anisopliae* são: a produção e secreção de enzimas hidrolíticas como quitinases, proteases e lipases que auxiliam o mecanismo de penetração mecânica do fungo (CLARKSON & CHARNLEY, 1996) e a produção de toxinas (KERSHAW *et al.*, 1999).

### 1.2.1. Ciclo Patógeno-Hospedeiro

O processo de infecção do inseto por fungos entomopatogênicos é dependente das condições ambientais, como temperatura, umidade, luz, radiação UV, assim como das condições nutricionais e da susceptibilidade do hospedeiro. Este processo é bem estudado para *M. anisopliae* infectando a cutícula de insetos e apresenta as seguintes fases: adesão, germinação, formação de apressório, formação do grampo de penetração, penetração, colonização, reprodução de patógeno e disseminação do fungo (ST LEGER *et al.*, 1991; ALVES, 1998; CLARKSON *et al.*, 1998).

A adesão representa um evento complexo, que ocorre após a deposição do fungo sobre o hospedeiro, visando à preparação do local para a fase de penetração. Esta etapa é dependente da presença de enzimas como esterases e proteases, que ocorrem na superfície dos conídios não-germinados e alteram a superfície do tegumento do hospedeiro, favorecendo a nutrição e a germinação do fungo (ST LEGER *et al.*, 1991). Alguns autores sugerem que forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e ligações específicas a lectinas possam auxiliar o processo de adesão do conídio à superfície da cutícula (HEGEDEUS & KHACHATOURIANS, 1995; BIDOCHKA *et al.*, 1997).

Após a adesão, inicia-se o processo de germinação, onde, em condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, O<sub>2</sub> e nutrição, o fungo germina sobre o inseto, produzindo o tubo germinativo. A germinação pode ser beneficiada pela presença de nutrientes, como aminoácidos, esterol e hexoses, e ser afetada por substâncias químicas existentes na superfície do hospedeiro, como ácidos graxos, lipídios, fenóis e pela microflora saprofítica. O apressório, considerado uma dilatação da hifa, ocorre na extremidade do tubo germinativo. Neste ponto, o

conteúdo citoplasmático migra para o tubo germinativo, transformando este local em um centro de elevada atividade metabólica, caracterizado pela presença de mitocôndrias e ribossomos (ZACHARUK, 1970b). Na parte inferior do apressório, forma-se uma saliência denominada de grampo de penetração, que inicia o processo de penetração na cutícula.

A fase de penetração envolve um processo físico, onde há pressão mecânica da hifa terminal, e um químico, referente à produção de enzimas hidrolíticas (proteases, lipases e quitinases) pelo tubo germinativo, facilitando a penetração mecânica do fungo. Desta forma, proteases estão envolvidas nos processos de formação e germinação dos conídios e hidrólise das cadeias polipeptídicas em moléculas menores, que serão absorvidas pelas células; lipases fracionam os lipídios existentes na superfície dos artrópodes, para posterior metabolização pelos microrganismos; e quitinases hidrolizam a quitina presente na cutícula.

Assim que o fungo penetra a cutícula do hospedeiro, inicia-se a etapa de colonização, onde a hifa penetrante se espessa e se ramifica no tegumento e hemocele. Durante este processo os fungos podem secretar toxinas na hemocele, que afetam a resposta imune ou causam distúrbios nas células e reações do hospedeiro (ROBERTS, 1989). Não ocorre grande crescimento da hifa antes da morte do hospedeiro, entretanto, após sua morte, o fungo se desenvolve penetrando todos os tecidos. Em seguida, as hifas emergem através do tegumento, ocorrendo o início do processo de esporulação do fungo na superfície da cutícula, onde, em condições favoráveis, novamente é reiniciado o ciclo de infecção patógeno-hospedeiro (ROBERTS, 1989; CLARKSON *et al.*, 1998).

### **1.3. O Carrapato *Boophilus microplus***

O carrapato *B. microplus* (Canestrini, 1887) é um artrópode pertencente à ordem Acarina, subordem Ixodides, família Ixodidae, subfamília Rhipicephalinae. São ectoparasitas hematófagos obrigatórios de vertebrados, preferencialmente de bovinos, sendo comumente conhecidos como “carrapatos do boi”, embora possam parasitar outros animais domésticos e selvagens.

Os carrapatos do gênero *Boophilus* passam por quatro estádios de desenvolvimento (ovo, larva, ninfa e adulto), exigindo apenas um único hospedeiro para o seu desenvolvimento. Seu ciclo de vida pode ser dividido em duas fases, uma de vida livre e uma de vida parasitária. Na fase de vida livre, as fêmeas depois de fecundadas e ingurgitadas (teleóginas), desprendem-se do corpo do hospedeiro, caem no solo e procuram um local para a postura. A duração do período entre a queda e a postura do primeiro ovo é de cerca de 3 a 40 dias, dependendo das condições de temperatura e umidade. O período de postura dura cerca de 15 a 20 dias e cada fêmea pode produzir cerca de 3000 a 4000 ovos. Quando estão pondo seus ovos, as fêmeas são chamadas de quenóginas.

Os ovos são pequenos, ovais e de cor âmbar e são recobertos por uma secreção que os mantém unidos e protegidos da dessecação (BITTENCOURT, 2000). Passam por um período de incubação de cerca de 25 dias, no verão, ou 80 dias, no inverno, antes de eclodirem as larvas, denominadas hexápodas. As primeiras larvas são chamadas de neolarvas e estas se tornam infestantes após 4 a 6 dias quando migram para as extremidades da vegetação para localizar um hospedeiro. Encontrando seu hospedeiro, as larvas fixam-se nas regiões de pele mais fina e realizam hematofagia para iniciar o processo de ecdise, transformando-se em ninfas octópodas. Em seguida, realizam nova hematofagia e desenvolvem-se em adultos machos (gonandros) ou fêmeas (neóginas). Os machos adultos nunca permanecem no mesmo local e podem ser encontrados próximos às fêmeas. Estas, depois de fecundadas, continuam se alimentando de sangue (sendo chamadas de partenóginas) até se tornarem completamente ingurgitadas, recomeçando o ciclo (Figura 2) (NUNES *et al.*, 1972; FORTES, 1987). Todas as fases do ciclo de desenvolvimento do carrapato são dependentes de condições climáticas, como temperatura e umidade, inclusive o período de tempo que as larvas sobrevivem sem se alimentarem na vegetação, o qual pode chegar até 6 meses.



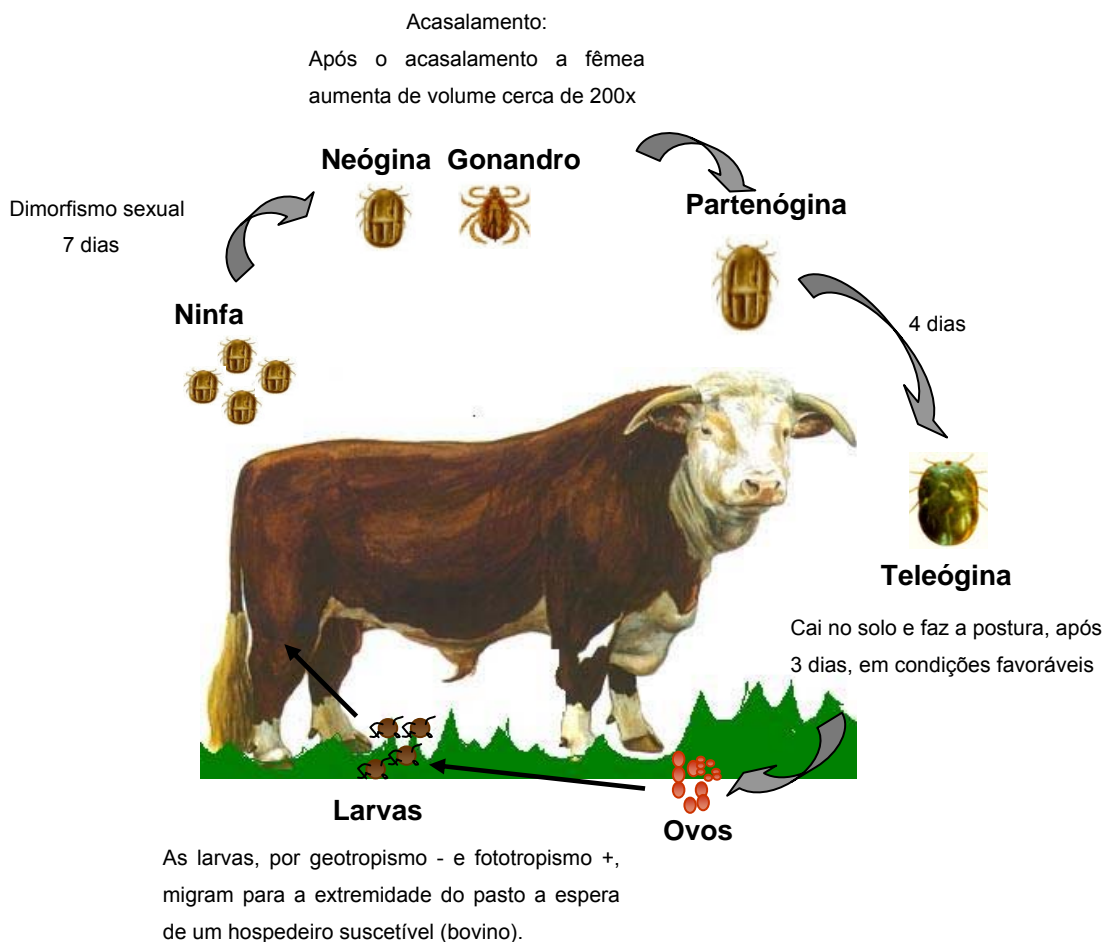


Figura 2. Ciclo de vida do carrapato *Boophilus microplus* (LÜBECK, 2004).

Carrapatos da espécie *B. microplus* são de grande importância econômica para a pecuária nacional (GONZALES, 1993), pois, devido ao seu alto hematofagismo (cada fêmea pode sugar cerca de 2ml de sangue do seu hospedeiro), grandes infestações podem provocar anemia, levando a perda de peso, baixa produtividade de carne e leite e até à morte. O efeito de *B. microplus* na perda de peso corporal dos bovinos da região de Bagé/RS foi verificado por ALVES-BRANCO *et al.* (1987), ressaltando que há um aumento de peso corporal de cerca de 27,2 Kg em animais Hereford banhados em relação aos animais não-banhados com carrapaticidas, confirmando os prejuízos provocados aos bovinos pelo carrapato. Além da perda de peso, infestações intensas causam outras injúrias como, irritação da pele e ainda provocar inquietação e desvalorização do

couro. O carrapato também pode atuar como vetor de agentes patogênicos, como *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale*, agentes causadores da tristeza parasitária bovina, babesiose e anaplasmoses, doenças que causam alta taxa de mortalidade nos rebanhos bovinos e são fatores limitantes para a comercialização dos animais.

*B. microplus* é originário da Ásia e é encontrado em torno dos paralelos 32° Norte (que passa ao sul dos Estados Unidos) e 32° Sul (próximo ao município de Rio Grande/RS). No Brasil, é encontrado em quase todos os estados com exceção de algumas regiões do Rio Grande do Sul e do sertão nordestino, visto que as condições climáticas do Brasil são bem favoráveis ao desenvolvimento de *B. microplus* durante a maior parte do ano (REVISTA ANGUS, 2004). O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com cerca de 170 milhões de cabeças, sendo 140 milhões exploradas para a produção de carne e 30 milhões para a produção de leite (MARTINEZ *et al.*, 2004). O Rio Grande do Sul contribui com aproximadamente 11 milhões de cabeças de gado destinadas a bovinocultura de corte (ALVES-BRANCO, 2000). As perdas provocadas pelos ectoparasitas provocam reduções drásticas nas produções de carne e leite. O Brasil deixa de produzir 26 milhões de arrobas de carne/ano e 4 milhões de litros de leite/ano, refletindo prejuízos da ordem de R\$ 2,24 bilhões (MARTINEZ *et al.*, 2004). Além disso, a infestação por carrapatos e bernes contribui significativamente para a perda de qualidade do couro, sendo que somente 8% do couro é comercializado como de primeira qualidade. Além destas perdas, estima-se que os gastos anuais com produtos químicos para combate aos parasitas sejam da ordem de R\$ 800 milhões (MARTINEZ *et al.*, 2004). A estimativa é de que, no Brasil, o *B. microplus* provoque um prejuízo de aproximadamente US\$ 1 a 2 bilhões anuais, incluindo consumo com acaricidas, instalações e equipamentos para tratamentos, perdas da produção de carne e leite, mortalidade e investimentos para controle de doenças como babesiose e tristeza parasitária bovina (REVISTA ANGUS, 2004).

### 1.3.1. Métodos de Controle

Atualmente, o controle de *B. microplus* se dá por aplicação de produtos químicos injetáveis ou por banhos. Entretanto, o uso intenso e desordenado destes produtos químicos pelos produtores rurais, algumas vezes sem orientação técnica, faz surgir cepas de carrapatos resistentes aos acaricidas, além de provocar poluição do meio ambiente. O desenvolvimento de resistência aos acaricidas pelos carrapatos é um grande problema mundial, visto que o desenvolvimento de resistência a uma classe de acaricida leva a introdução de uma nova classe para minimizar o problema. Os carrapaticidas podem ser de contato ou sistêmicos e os grupos químicos estão listados na Tabela 2.

Os primeiros grupos de carrapaticidas químicos utilizados foram os compostos clorados, na década de 40. Em seguida, com o surgimento de cepas resistentes, surgiram os compostos organofosforados que também, devido ao seu uso intenso, culminou com o aparecimento de resistência, e foram substituídos por outros compostos, como os piretróides e formamidinas. A detecção de cepas de *B. microplus* resistentes a organofosforados foi comprovada por testes bioquímicos (BAXTER *et al.*, 1999; VILLARINO *et al.*, 2002) e a resistência de cepas a piretróides foi relatada por MENDES *et al.* (2001). Atualmente, os mais recentes grupos de produtos químicos disponíveis para controle do carrapato são formamidinas e avermectinas (LEAL *et al.*, 2003). Além do desenvolvimento de resistência aos acaricidas pelos carrapatos, métodos químicos de controle estão relacionados com eventuais danos causados pela contaminação residual da carne e do leite e poluição do meio ambiente, além do alto custo (CASTRO & NEWSON, 1993).

A procura por novas alternativas de controle do carrapato *B. microplus* se torna uma necessidade crescente devido à exigência do mercado de consumo por alimentos cada vez mais livres de resíduos químicos e por produtos que não contaminem o meio ambiente, além dos altos custos gerados pelo controle químico. Dentre os métodos alternativos promissores para o controle de carrapatos, podemos citar o controle imunológico pelo desenvolvimento de vacinas (BOUE *et al.*, 1999; JONSSON *et al.*, 2000; LEAL *et al.*, 2003) e o controle biológico por fungos entomopatogênicos (KAAYA & HASSAN, 2000; GINDIN *et al.*, 2002). Possivelmente, as desvantagens do controle químico

poderão ser minimizadas com o uso de novas estratégias de controle como o controle biológico.

Tabela 2. Produtos químicos utilizados para o controle do carrapato *Boophilus microplus*.

<b>Grupo Químico</b>	<b>Princípio ativo</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Classificação</b>
Organofosforados	Clorpiriflós, Diclorvós, Malation, Diazinon	Inibição da acetilcolinesterase	De contato
Carbamatos	Carbaril	Inibição da acetilcolinesterase	De contato
Piretróides	Flumetrina, Cipermetrina, Deltametrina	Inibição de sódio e potássio no SN*	De contato
Diamidinicos e Formamidinas	Imidazinas (Amitraz)	Inibição da monoamino oxidase (MAO)	De contato
Fenilpiralozona	Fipronil	Em nível do GABA**	De contato
Benzonilfenilurea	Fluaruzon	Inibidores de crescimento	Sistêmico
Avermectinas	Abamectin, Ivermectin, Doramectin, Moxidectin	Em nível do GABA	Sistêmico

Dados compilados de GONZALES (1993); BALDINI *et al.* (1999); FURLONG & PRATA (2003).

\*SN: sistema nervoso; \*\*GABA: ácido gama amino butírico.

### 1.3.1.2. Controle Biológico

Apesar de existirem muitos predadores de carrapatos, como algumas espécies de formigas, aranhas e aves (BITTENCOURT, 2000; SAMISH & REHACEK, 1999), pesquisas com o uso de microrganismos para o controle biológico de carrapatos ainda são incipientes (SAMISH & REHACEK, 1999). São relatados casos de infecção de espécies de carrapatos por nematóides, vírus, bactérias e protozoários (BITTENCOURT, 2000; SAMISH & REHACEK, 1999), no entanto, os fungos entomopatogênicos são os principais patógenos de carrapatos na natureza e são os organismos mais freqüentemente utilizados para seu controle biológico (KAAYA & HASSAN, 2000; GINDIN *et al.*, 2002). Entre os

fungos entomopatogênicos avaliados para controle de carrapatos, encontra-se *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana*, como os mais patogênicos, causando mortalidade para *B. microplus* (FRAZZON *et al.*, 2000), *B. annulatus*, *Hyalomma excavatum* e *Rhipcephalus sanguineos* (SAMISH *et al.*, 2001; GINDIN *et al.*, 2002) e *Amblyomma maculatum* e *A. americanum* (KIRKLAND *et al.*, 2004).

*M. anisopliae* tem sido bastante utilizado no controle biológico de insetos-praga da agricultura e, nos últimos tempos, são freqüentes as pesquisas que avaliam seu potencial para uso no controle biológico de vetores de doenças animais, como o carrapato. Estudos laboratoriais sugerem que *M. anisopliae* apresenta grande potencial para o controle do carrapato *B. microplus*, se tornando uma potencial alternativa ao controle químico. A redução da eclosão de ovos e aumento de mortalidade foram dependentes da concentração de conídios nos resultados da avaliação da patogenicidade de *M. anisopliae* sobre ovos e larvas de *B. microplus* realizados por BITTENCOURT *et al.* (1994), onde a mais alta taxa de mortalidade (94,67%) e menor taxa de eclosão dos ovos (6%), foram encontradas quando os carrapatos foram infectados com uma suspensão de conídios de  $5,8 \times 10^9$  (conídios/ml). Da mesma forma, os efeitos de *M. anisopliae* sobre fêmeas e ovos de *R. appendiculatus* e *A. variegatum* evidenciaram alta taxa de mortalidade e redução da fecundidade e eclosão das larvas (KAAYA *et al.*, 1996) e também induziram 100% de mortalidade de larvas de *Ixodes scapulares*, diretamente relacionada com concentração de conídios (ZHIOUA *et al.*, 1997). Os efeitos de *M. anisopliae* sobre *B. microplus in vitro* e a campo resultaram em alta taxa de mortalidade de fêmeas infectadas, desenvolvimento e esporulação do fungo sobre os carrapatos e redução na taxa de oviposição, mas infelizmente, pouca redução da população de carrapato a campo (CORREIA *et al.*, 1998; MONTEIRO *et al.*, 1998a). Alta infectividade e eficácia da patogenicidade de diferentes isolados de *M. anisopliae* foram observadas em fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, comprovando assim a eficiência deste fungo (FRAZZON *et al.*, 2000; ONOFRE *et al.*, 2001).

A rota de invasão de *M. anisopliae*, estudada por técnicas de microscopia, tem sido amplamente descrita para insetos e pouco relatada para carrapatos. Assim, ZACHARUK (1970b, c) descreveu a fina estrutura da invasão de *M. anisopliae* em larvas de uma espécie de Coleoptera, sugerindo que a penetração

da epicutícula apesar de ser facilitada por pressão mecânica, é um evento primariamente enzimático, diferentemente da penetração da procutícula que é ocasionada por separação mecânica da lâmina cuticular e fibrilas e, apenas facilitada por ação enzimática. Análises por microscopia óptica, microscopia de varredura e de transmissão evidenciaram uma extensa invasão de *M. anisopliae* em *Culex quinquefasciatus* com formação de apressório e subsequente reação de melanização pelo hospedeiro (LACEY *et al.*, 1988). O uso de imunocitoquímica ultraestrutural revelou que proteases e quitinases são produzidas pelo apressório durante o processo de penetração de *M. anisopliae* na cutícula de *Manduca sexta* (ST LEGER *et al.*, 1996a, 1996b). Técnicas de microscopia de fluorescência e eletrônica identificaram que a infecção ocorre por germinação, formação do apressório, penetração e consequente colonização da hemocele do inseto pelo fungo (VESTERGAARD *et al.*, 1999). Entretanto, detalhes morfológicos sobre o mecanismo de ação e da rota de invasão do fungo *Metarhizium* ssp. no carrapato *B. microplus* são bastante incipientes. O único relato data de 1999, quando BITTENCOURT *et al.* (1999a), observaram pela primeira vez, utilizando microscopia eletrônica de varredura, a formação de apressório em *B. microplus*, revelando que o mecanismo de penetração na cutícula de *B. microplus* é bastante semelhante ao relatado para os insetos. A visualização de interações entre *M. anisopliae*-*B. microplus* é importante para conhecer seu mecanismo e desta forma possibilitar seu uso como agente de biocontrole.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

- Caracterizar o processo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* isolado E6 em carrapatos *Boophilus microplus*.

### 2.2. Específicos

- Analisar o processo de infecção por microscopia óptica;
- Analisar as etapas do processo mecânico de infecção por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão;
- Caracterizar alterações morfológicas das estruturas de *Metarhizium anisopliae* isolado E6 durante a penetração por microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar a patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* isolado E6 em ovos do carrapato *Boophilus microplus*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material Biológico

O isolado E6 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* foi obtido da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz (ESALQ). A suspensão de conídios foi obtida de culturas esporuladas em placas de Petri com Meio de Cove completo (0,6% NaNO<sub>3</sub>, 1% glicose, 0,2% peptona, 0,05% extrato de levedura, 0,15% caseína, 2% ágar), acrescido de 2% de solução de sais (2,6% KCl, 2,6% MgSO<sub>4</sub>, 7,6% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e 0,04% de elementos traços (0,04% Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,4% CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,01% FeSO<sub>4</sub>, 0,8% MnSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,8% NaMnO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,8% ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O). Os conídios foram coletados das placas de Petri com solução de 0,01% Tween 80, transferidos para tubos e centrifugados a 5000 rpm (centrífuga CENTRA MP4 *International Equipment Company*) por 10 min. O sobrenadante foi descartado e os conídios foram lavados com água destilada esterilizada, novamente centrifugados e então mantidos em solução de glicerol 10%. A contagem dos conídios foi realizada em câmara de Neubauer. Antes do bioensaio, a suspensão de conídios foi ajustada para a concentração de 1x10<sup>8</sup> conídios.ml<sup>-1</sup> com água destilada esterilizada.

Fêmeas ingurgitadas do carrapato *B. microplus* foram obtidas da criação de bovinos da Faculdade de Veterinária da UFRGS. Para obtenção dos ovos, fêmeas ingurgitadas foram acondicionadas em placas de Petri e incubadas em câmara de germinação (TE-401 TECNAL) a 28°C, com cerca de 90% umidade durante 14 dias, para completa oviposição.

#### 3.2. Bioensaios

Fêmeas de *B. microplus* ou 0,5 g de ovos de *B. microplus* foram lavados em série de banhos em solução de hipoclorito de sódio, solução salina 0,87% esterilizada e água destilada esterilizada. Para o bioensaio, as teleóginas ou os ovos foram mergulhados em suspensão de conídios (1x10<sup>8</sup> conídios. ml<sup>-1</sup>) por 30 s, posteriormente acondicionados em câmara úmida (> 90% umidade) e



incubados em câmara de germinação (TE-401 TECNAL) a 28°C, para observação do desenvolvimento do fungo (Figura 3). Os carrapatos foram coletados com 1, 2, 3 e 4 dias (24, 28, 72 e 96 horas) após a inoculação do fungo e os ovos foram coletados 2, 3, 4, 10, 15 e 20 dias após a inoculação. Posteriormente, as amostras foram processadas para as análises microscópicas. O grupo controle foi imerso apenas em solução de hipoclorito de sódio, solução salina e água destilada esterilizada e mantido nas mesmas condições do grupo tratado.

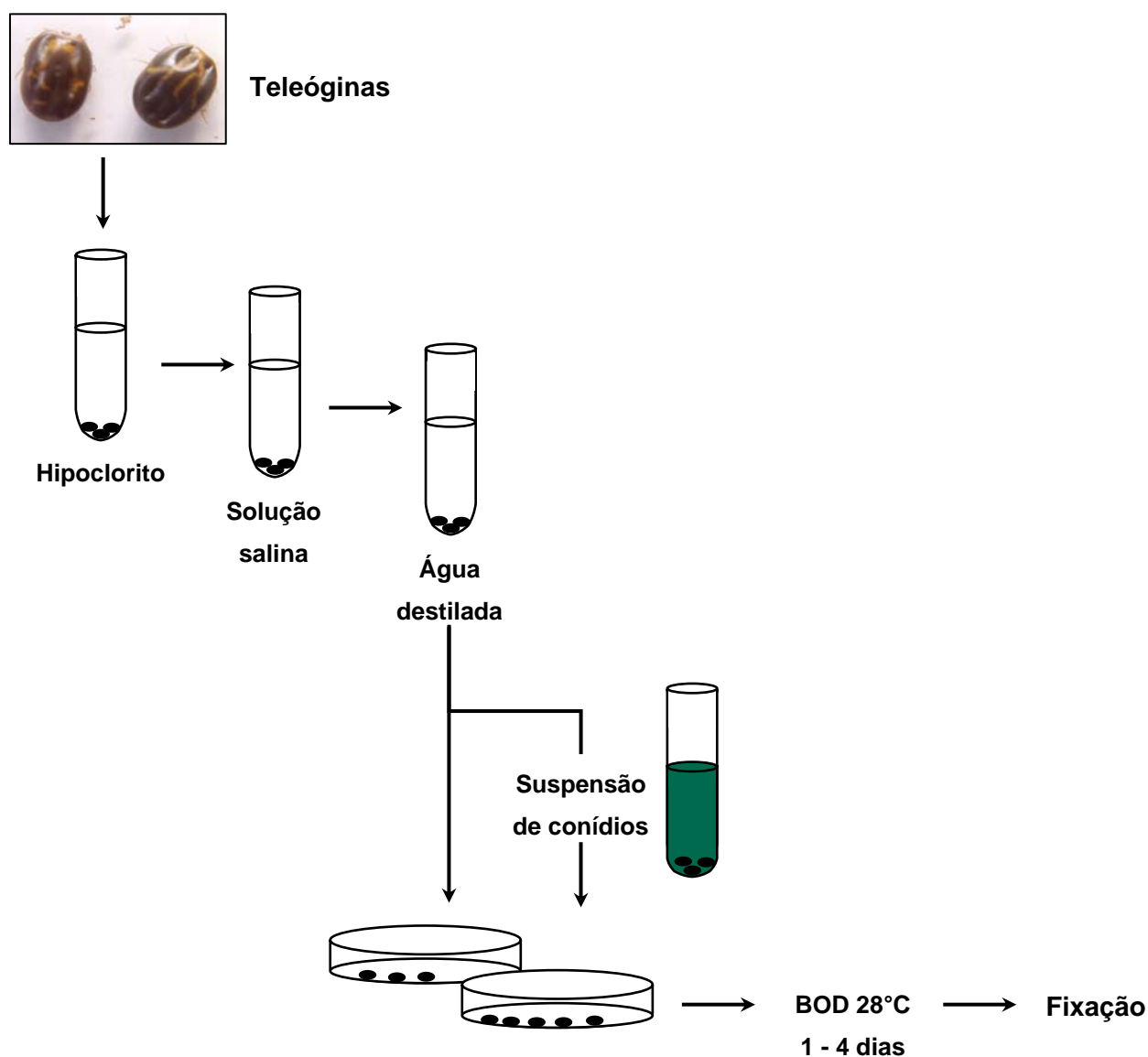


Figura 3. Metodologia utilizada para o bioensaio.

### 3.3. Análises Microscópicas

Todo material processado, tanto para microscopia óptica quanto para microscopia eletrônica, foi fixado *overnight* em 2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 acrescido de 3% de sacarose.

#### 3.3.1. Microscopia Óptica (MO)

Os carrapatos infectados e controles foram fixados inteiros, desidratados em gradiente de etanol (50 a 95%), embebidos e incluídos em resina (*Leica Histo-resin Embedding Kit*). Os cortes foram feitos com espessura de 3  $\mu\text{m}$  e corados com PAS (ácido periódico-Schiff)-verde luz. O PAS é um tipo de corante gradativo, utilizado como método histoquímico para detecção de polissacarídeos neutros e glicoproteínas corando bem nitidamente a parede celular do fungo, enquanto o verde-luz é apenas utilizado como contra-coloração. A reação de PAS foi realizada seguindo a seguinte técnica:

Técnica do PAS-Verde Luz (PEARSE, 1961).

- Oxidar o material com ácido periódico 1% por 20 min
- Lavar rapidamente com água destilada
- Tratar com Reativo de Schiff por 3 a 5 min
- Lavar por 10 min em água corrente
- Contra corar com verde luz por 30 seg
- Lavar em água corrente
- Secar e montar com entellan

#### 3.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Carrapatos inteiros e ovos, infectados e controles, foram fixados *overnight*, lavados por 4 vezes, 15 min cada, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e

submetidos a desidratação em série gradual de acetona (30, 50, 70, 90% por 30 min cada e 2 vezes 100% por 30 min cada para amostras de carrapatos e 30, 50, 70, 90%, por 15 min cada, e 2 vezes 100% por 10 min cada, para amostras de ovos). Após este procedimento, as amostras foram secas ao ponto crítico, utilizando-se o aparelho *Critical Point Dryer* (CPD 030 Baltec), coladas em suportes de alumínio (*stubs*) e levadas ao aparelho *Sputter Coater* (SCD 050 Baltec), para serem cobertas com uma película de ouro e em seguida analisadas ao microscópio de varredura Jeol JSM 5800, pertencente ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS a uma voltagem de 20 kV.

### 3.3.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As cutículas dos carrapatos infectados e controles foram dissecadas sob estereomicroscópio (STEMI 2000C Zeiss) e em seguida fixadas em solução fixadora (2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 acrescido de 3% de sacarose). Após fixação, as cutículas foram pós-fixadas por 1 h em tetróxido de ósmio 1% , lavadas por 4 vezes de 15 min em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 e contrastadas *overnight* com 0,5% acetato de uranila aquoso. Posteriormente, as amostras foram lavadas por 2 vezes de 5 min em água destilada e desidratadas em série gradual de acetona (30, 50, 70, 90%, por 15 min cada, e 100% por 2 vezes, 10 min cada). A infiltração das amostras foi efetuada gradualmente, utilizando a resina Spurr com baixa viscosidade (SPURR, 1969). Desta forma, as amostras foram embebidas em série gradual de acetona 100%:resina nas concentrações de 1:2, 1:1 e 2:1 (v/v) por cerca de 6 h cada, à temperatura ambiente, seguindo-se 2 banhos de resina pura. Após a infiltração, as amostras foram incluídas em resina pura e os blocos foram polimerizados por cerca de 16 h a 70°C. Os blocos preparados foram cortados em ultramicrótomo (Leica Ultracut UCT). Cortes semifinos de 800 a 1000 nm foram realizados utilizando navalha de vidro, colocados sobre lâmina de vidro e corados com azul de toluidina 1% e fucsina básica 1% - borato de sódio 1:1 (v/v), para rastreamento do material ao microscópio óptico. Em seguida, foram feitos cortes ultrafinos de 70 nm que foram colocados em telas de cobre de 200 mesh,

contrastados com acetato de uranila aquoso 2% por 20 min e citrato de chumbo por 30 min. Depois de secos os cortes foram analisados no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 2010, do Centro de Microscopia da UFRGS.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Infecção do Carrapato *Boophilus microplus*

#### 4.1.1. Microscopia Óptica (MO)

A observação macroscópica dos carrapatos-controle e tratados mostrou a intensa capacidade de infecção do isolado E6 de *M. anisopliae* sobre o carrapato *B. microplus* (Figura 4). Após 72 h de infecção, a superfície da cutícula do carrapato apresentou vários conídios em fase de germinação e colônias desenvolvidas com projeções de hifas bem visualizadas sob estereomicroscópio (Figuras 4B e C). Com a evolução da infecção, o fungo se desenvolveu no interior do hospedeiro até a completa colonização e conseqüente exteriorização. Aos 16 dias pós-infecção, o fungo que penetrou na cutícula do hospedeiro emergiu para a superfície do tegumento do carrapato, resultando em um processo chamado de “mumificação”. Este processo é caracterizado pela completa invasão do fungo na superfície do carrapato e subseqüente produção de conídios pelo fungo. Estes conídios, quando no meio ambiente, poderão ser disseminados e reiniciar um novo ciclo de infecção (Figura 4D).

Análises em nível de MO de carrapatos-controle identificaram as camadas constituintes da cutícula. O tegumento do carrapato *B. microplus* é constituído pela cutícula, células epidérmicas e membrana basal. A cutícula apresentou três camadas bastante evidenciadas nos cortes de MO, a epicutícula, a exocutícula e a endocutícula (Figura 5). A epicutícula é uma camada delgada, destituída de quitina, que recobre externamente a exocutícula e a endocutícula. A exocutícula e a endocutícula formam a procutícula e são constituídas principalmente de proteínas e quitina. Na endocutícula, os polissacarídeos (provavelmente quitina) são evidenciados pela cor majenta pela reação histoquímica de PAS. Normalmente as fibras de quitina e proteína estão arranjadas em camadas repetidas mostrando uma estrutura elaborada e orientada denominada de lamela.

Várias células epidérmicas são visualizadas abaixo da cutícula e sustentadas pela membrana basal.

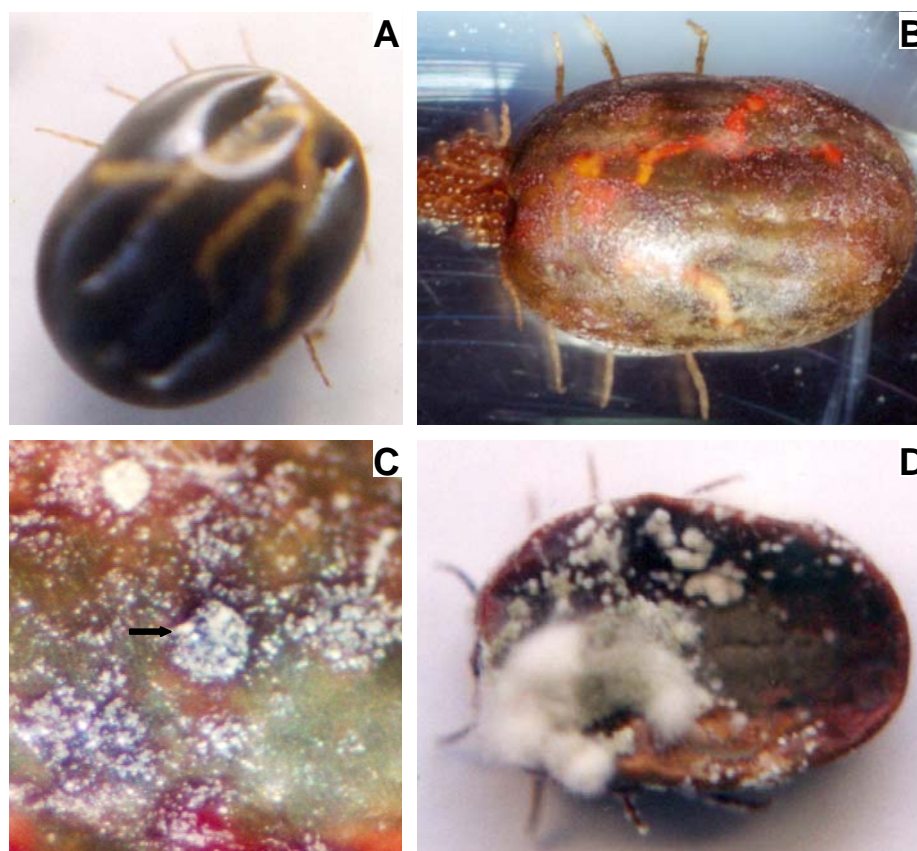


Figura 4. Infecção de teleóginas do carrapato *Boophilus microplus* com *Metarhizium anisopliae*. A) Controle negativo. B) Após 3 dias de infecção com *Metarhizium anisopliae* isolado E6. C) Detalhe da cutícula do carrapato após 3 dias de infecção mostrando a presença de colônias (seta). 8X. D) Após 16 dias de infecção, evidenciando a exteriorização do fungo, mumificação do carrapato e produção de esporos.

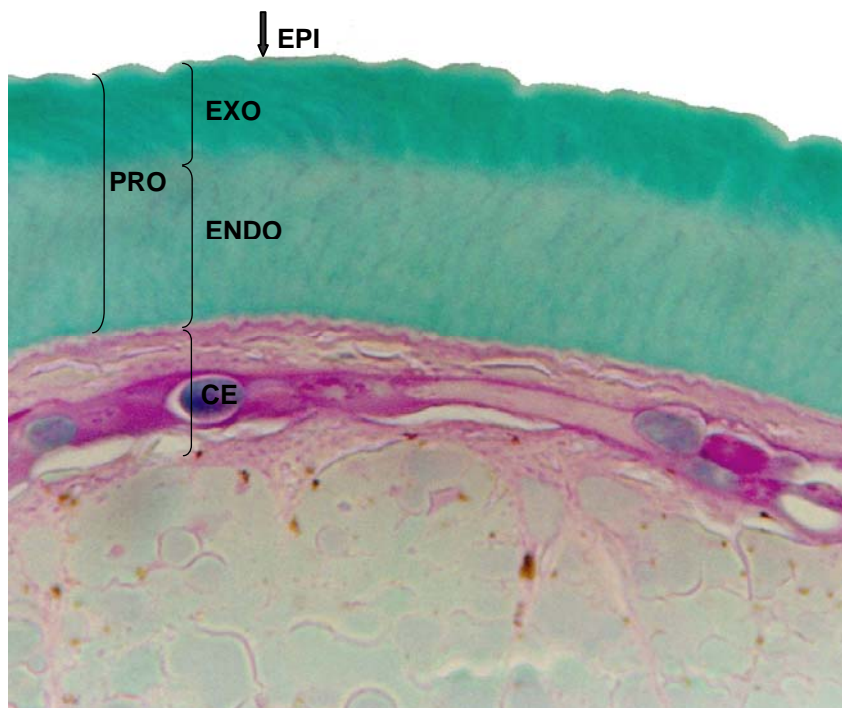


Figura 5. Fotomicrografia do tegumento do carrapato *Boophilus microplus* controle evidenciando as camadas da cutícula. 640X. EPI: epicutícula. EXO: exocutícula. ENDO: endocutícula. PRO: procutícula. CE: células epidérmicas. PAS-verde luz.

O intenso processo de infecção do carrapato *B. microplus* pelo fungo *M. anisopliae* nas amostras tratadas evidencia que o fungo invade seu hospedeiro pela penetração direta da cutícula (Figura 6). Após a formação da estrutura de penetração o fungo penetrou a epicutícula e se desenvolveu abaixo desta (Figura 6A). As hifas continuaram seu alongamento através das camadas sucessivas da procutícula e invadiram a hemocele e tecidos adjacentes. Os cortes de carrapatos tratados mostraram grande quantidade de hifas penetrando na cutícula e cavidades do corpo. A parede celular do fungo foi intensamente positiva pela reação de PAS e foi identificada na cutícula pela coloração magenta. Em geral, os fungos apresentam a parede das hifas rica em polissacarídeos, tal como a quitina, que apresentam uma intensa reação com o ácido periódico-Schiff. Reação PAS positiva foi observada nas Figuras 6B, C e D, onde se visualiza intensa quantidade e desenvolvimento de hifas de *M. anisopliae* sobre o tegumento do

carrapato (Figura 6B), inclusive penetrando através deste e invadindo o tecido subjacente (Figuras 6C, D). Algumas vezes, a intensa quantidade de hifas no interior da procutícula e entre a pro e a epicutícula, promoveu a formação de uma projeção na superfície da cutícula (Figura 6A) e uma desordem de toda estrutura das suas camadas (Figuras 6C, D). O extenso desenvolvimento das hifas de *M. anisopliae* entre a epi e a procutícula e a intensa invasão destas hifas em todo o tecido subjacente e cavidades do corpo de *B. microplus* podem ser visualizados na Figura 6D.

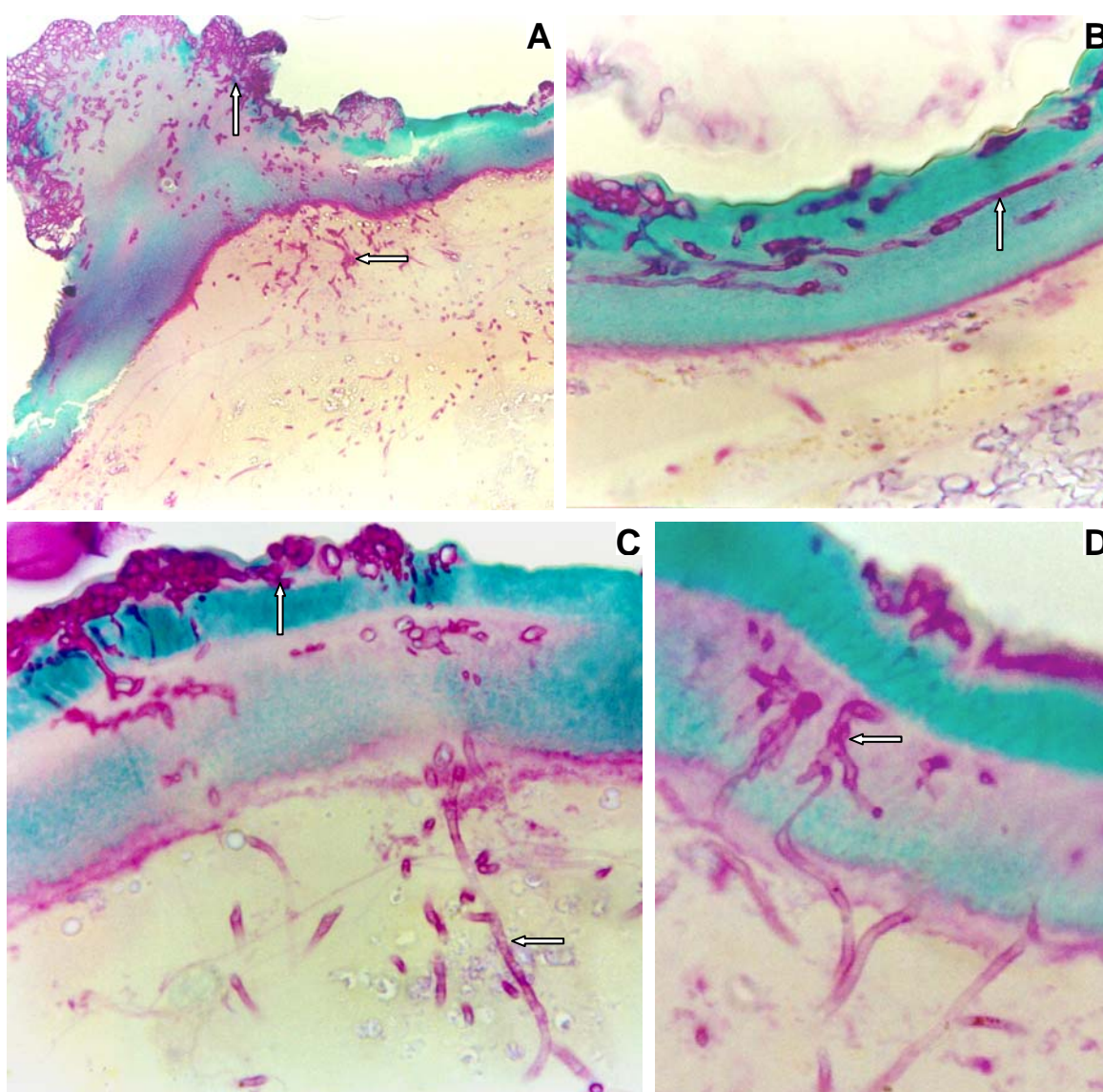


Figura 6. Fotomicrografia da cutícula do carrapato *Boophilus microplus* infectado com *Metarhizium anisopliae*. A) 200X. B, C e D) 640X. Setas: hifas de *Metarhizium anisopliae*. PAS-verde luz.



#### 4.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Uma visão geral dos carrapatos-controle e tratados na Figura 7. A preservação da estrutura do tegumento do carrapato controle é mostrada na Figura 7A e a presença de várias ondas irregulares na superfície da cutícula é evidenciada na Figura 7C. Diferentemente, os carrapatos inoculados com *M. anisopliae* apresentaram-se murchos (Figura 7B) e com intenso desenvolvimento de hifas na superfície da cutícula infectada, freqüentemente formando um micélio denso na superfície do hospedeiro (Figuras 7D e 8A).

As análises de MEV mostraram que os conídios de *M. anisopliae* isolado E6 foram capazes de se aderir e germinar em qualquer local na cutícula de *B. microplus* (Figura 8A) e que, algumas vezes, estes conídios aderiram em locais diferentes do tegumento, tais como as patas (Figura 8B). O primeiro sinal de germinação foi o aparecimento de um tubo germinativo em um dos pólos do conídio. Cada conídio produziu um único tubo germinativo, sendo que houve variação do seu comprimento antes da formação do apressório. Desta forma, alguns conídios produziram um pequeno tubo germinativo (Figura 9A), enquanto outros conídios produziram um tubo germinativo moderadamente longo, que se desenvolveu sobre a superfície da cutícula (Figura 9B). O apressório, com forma globosa foi produzido na extremidade distal do tubo germinativo e seu tamanho foi similar ao do conídio (Figura 9B). Alguns apressórios apresentaram-se cobertos por uma fina e amorfa camada de mucilagem que aderiu firmemente o apressório ao tegumento do carrapato (Figuras 9C, D e E). Algumas vezes, alguns tubos germinativos penetraram diretamente na cutícula sem se diferenciar em apressório (Figura 9F).

Os conídios germinaram e iniciaram seu crescimento na superfície da cutícula do hospedeiro com cerca de 24 h após a inoculação, sendo que o processo de germinação continuou até 48 h após a inoculação com o fungo. Após 48 h de infecção, os conídios apresentaram-se aderidos à superfície do hospedeiro (Figura 10A) e o processo de infecção foi continuado pela germinação dos conídios e formação do apressório (Figura 10B). Algumas vezes neste período, observaram-se alguns apressórios penetrando na cutícula do

hospedeiro. O apressório penetrou através da cutícula por um processo mecânico (pressão do apressório sobre a cutícula) e por um processo enzimático (produção de enzimas que digerem a cutícula do hospedeiro e facilitam a penetração). Este processo enzimático pode ser evidenciado por um halo de degradação ao redor do apressório presente na cutícula do hospedeiro (Figuras 9A e 10B). Apesar da penetração ter iniciado após 24 h da inoculação do fungo, a penetração mais intensa foi observada após 72 h de infecção, quando a maioria dos conídios germinou na superfície do hospedeiro e formou longos tubos germinativos que colonizaram toda a cutícula (Figura 10D). Após penetrar a cutícula, as hifas invadiram as cavidades do corpo do carrapato, onde proliferaram. A superfície interna da cutícula do carrapato após 48 h de infecção, mostrando a penetração das hifas, pode ser visualizada na Figura 10C. Após 96 h de infecção, se observou extenso crescimento de hifas sobre a superfície da cutícula (Figura 10E). Neste mesmo tempo, as hifas iniciaram o crescimento de volta para a superfície, emergindo da hemocele do carrapato para a superfície da cutícula (Figura 10F). Não se observou um ponto específico de emergência do fungo na cutícula do hospedeiro.

Os processos mecânicos e enzimáticos que promovem a penetração direta do fungo na cutícula do carrapato são detalhados nas Figuras 11A a D. Em vários locais se observou uma suave depressão na cutícula do hospedeiro na região de penetração do apressório (Figuras 11A e B). Além do processo físico de pressão mecânica da hifa, a fase de penetração é acompanhada por um processo de degradação enzimática referente à produção de enzimas hidrolíticas, que podem ser proteases, lipases e quitinases, liberadas pelo tubo germinativo durante a penetração da hifa. Desta forma, a porção terminal das hifas do fungo mostrou um aspecto diferenciado, apresentando-se mais espessa e com aspecto mais rugoso do que a porção terminal das outras hifas presentes na cutícula infectada (Figuras 11C e D). Provavelmente, esta morfologia reflete a presença de enzimas que são secretadas pela hifa ou, ainda, representa a elevada atividade metabólica deste local, após a formação do apressório. Este evento nunca foi descrito antes por técnicas de microscopia eletrônica de varredura.

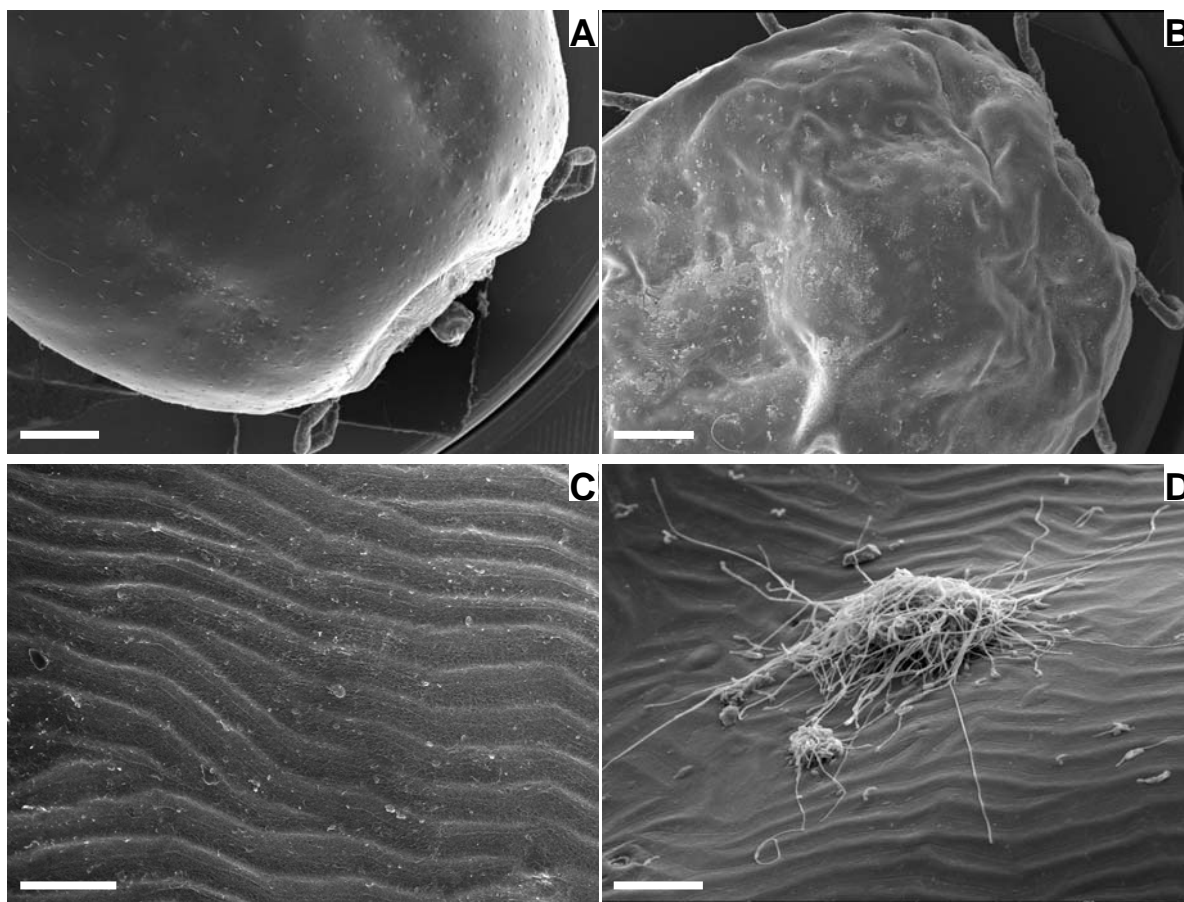


Figura 7. Eletromicrografia de varredura de carrapatos *Boophilus microplus* controle e tratado com *Metarhizium anisopliae*. A e C: controle. B e D: após 24 h de infecção. A e B: Bar=800 $\mu$ m: C e D: Bar= 50 $\mu$ m.

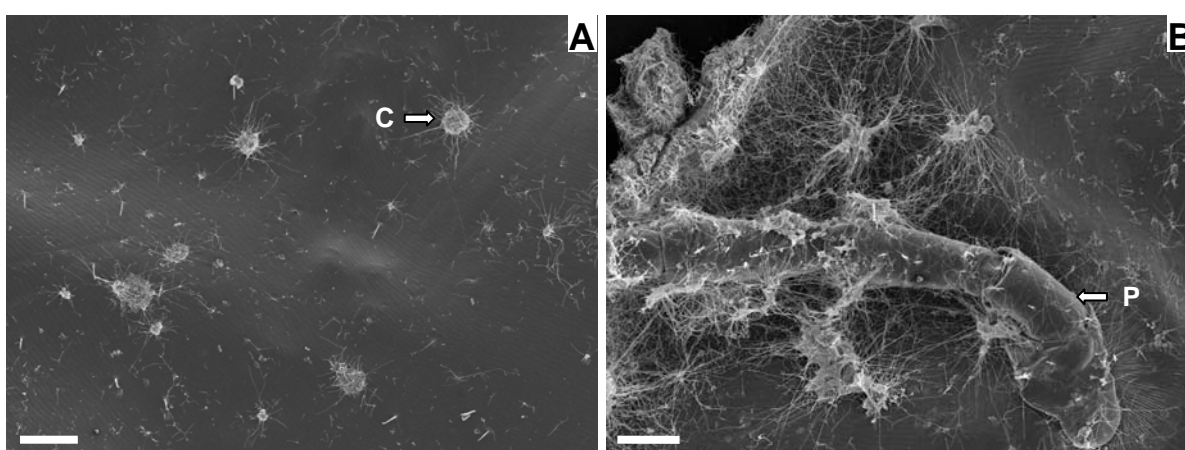


Figura 8. Eletromicrografia de varredura da cutícula dissecada do carrapato *Boophilus microplus* após 48 h de infecção com *Metarhizium anisopliae*. A) Região dorsal evidenciando várias colônias de *Metarhizium* (C). B) Região ventral evidenciando o desenvolvimento do fungo na perna (P) do carrapato. Bar=200 $\mu$ m.

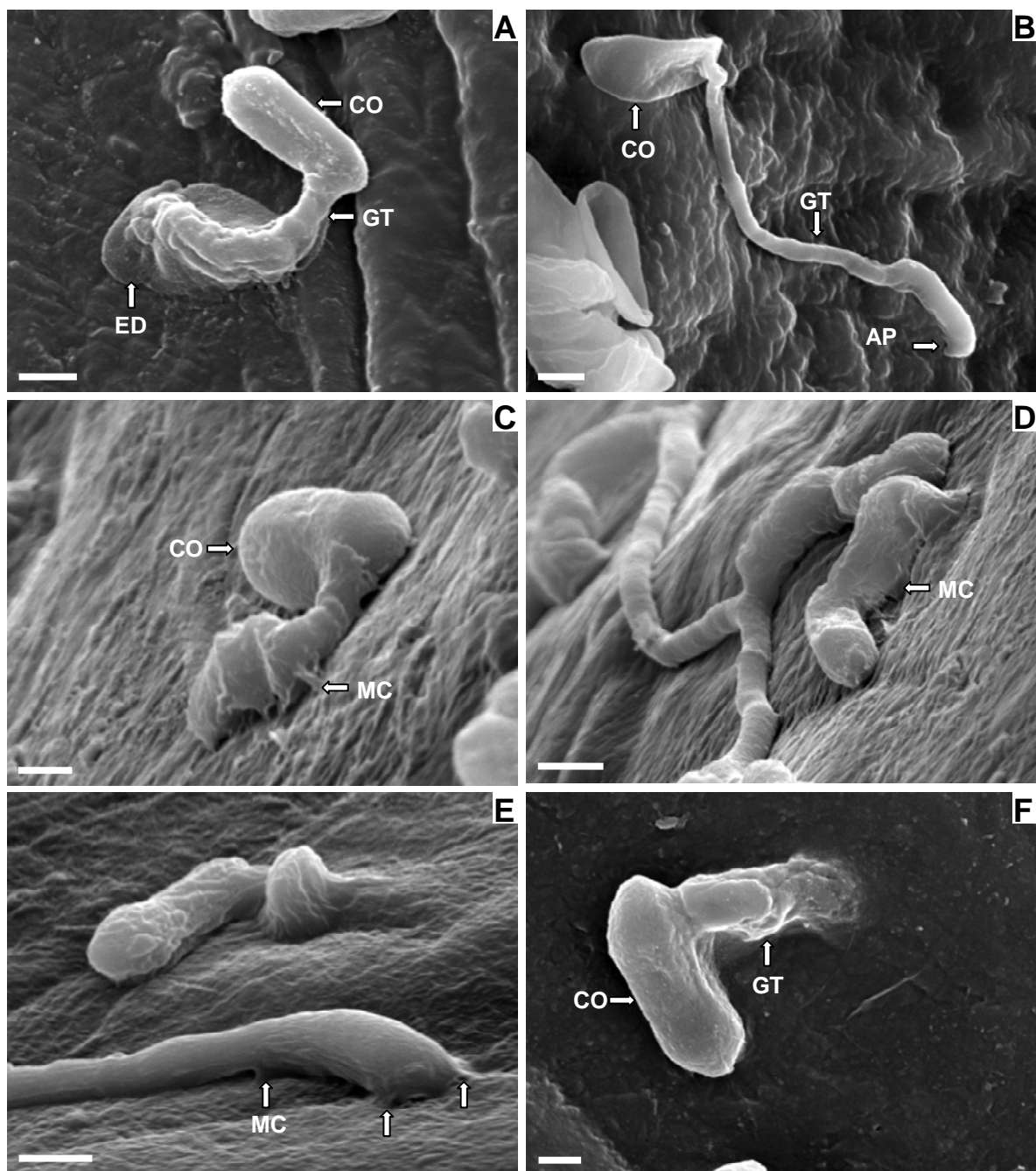


Figura 9. Detalhe da formação do tubo germinativo, apressório e penetração das hifas de *Metarhizium anisopliae* na superfície do carrapato *Boophilus microplus*. A) Curto tubo germinativo (GT) e degradação enzimática (ED). Bar=2μm. B) Longo tubo germinativo. Bar=2μm. C, D E e F) Processo de penetração. C e F: Bar= 1μm. D e E: Bar=2μm. MC: camada de mucilagem. AP: apressório. CO: conídio.

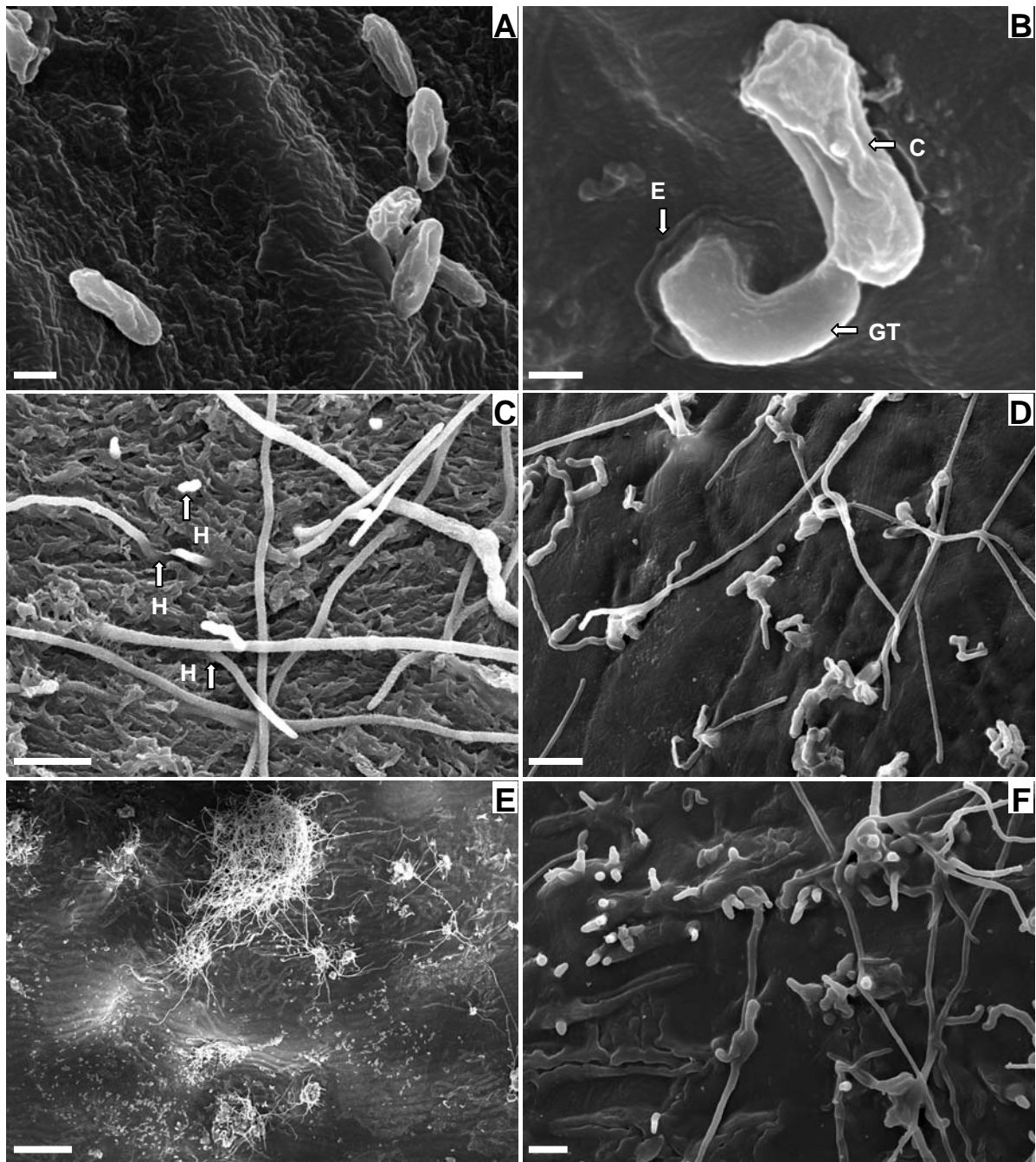


Figura 10. Eletromicrografia de varredura de carrapatos *Boophilus microplus* infectados com *Metarhizium anisopliae*. A e B) 24 h pós-infecção. Bar= 2 $\mu$ m e 1 $\mu$ m respectivamente. C) Parte interna da cutícula 48 h pós-infecção, evidenciando a penetração das hifas. Bar=10 $\mu$ m. D) 72 h pós-infecção. Bar=10 $\mu$ m. E e F) 96 h pós-infecção. Bar=100 $\mu$ m e 10 $\mu$ m respectivamente. CO: conídio. ED: degradação enzimática. GT: tubo germinativo. H: hifa.

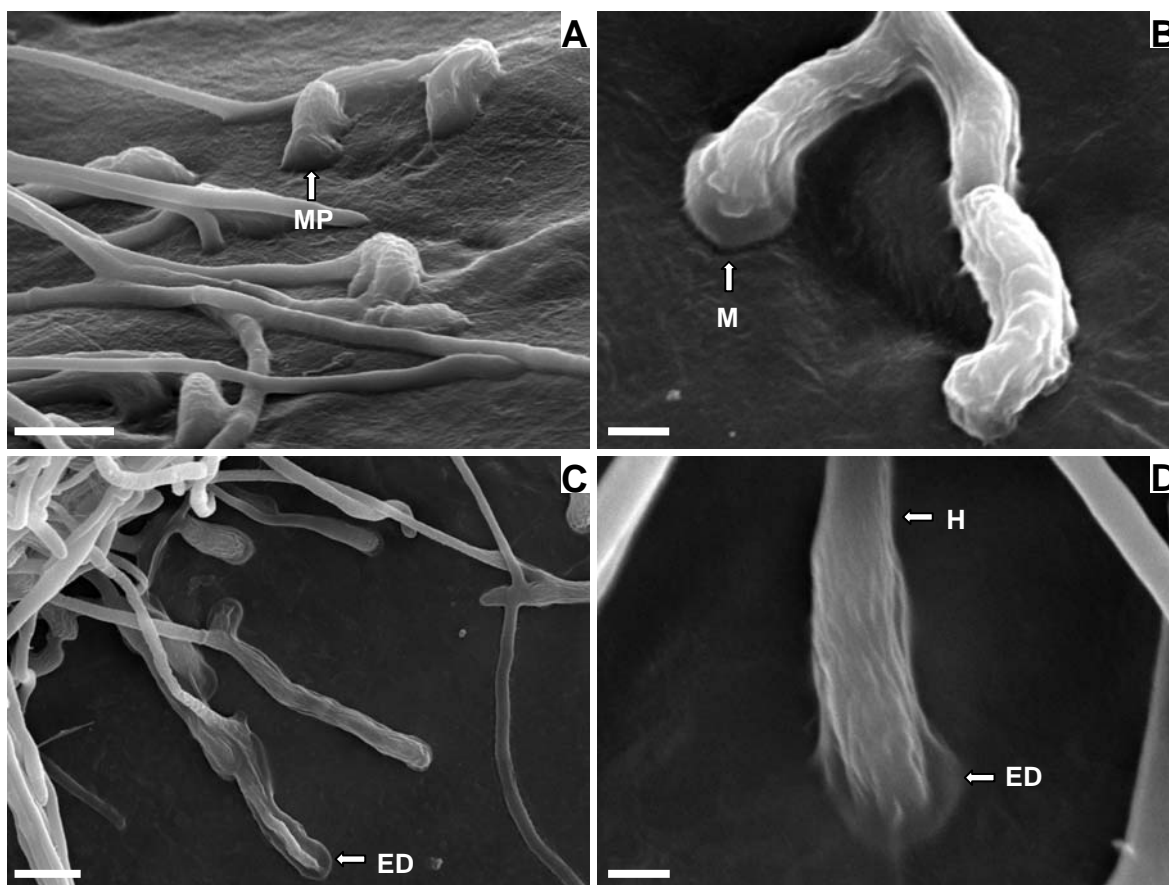


Figura 11. Detalhe da penetração direta por pressão mecânica (MP) e degradação enzimática (ED) da hifa de *Metarhizium anisopliae* na cutícula de *Boophilus microplus*. A: Bar= 5 $\mu$ m. B e C: Bar= 2 $\mu$ m. D: Bar= 1 $\mu$ m. H: hifa.

#### 4.1.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os cortes ultrafinos de amostras controle evidenciaram algumas das camadas do tegumento do carrapato, como mostrado por microscopia óptica. Foram distinguidas duas camadas, a exocutícula e a endocutícula (Figura 12). A exocutícula apareceu como uma camada não-lamelar, constituída de material amorfo em toda a sua espessura (Figura 12A), enquanto a endocutícula apresentou-se constituída por lamelas, que foram visualizadas como regiões pouco eletrondensas, envolvidas por um denso material granular (Figura 12). Estas lamelas são formadas pela estrutura quitina-proteína e as regiões não eletrondensas são consideradas regiões onde existem microfibrilas de quitina,

enquanto as regiões mais eletrondensas, semelhantes a um material granular, são consideradas regiões da matriz protéica. O limite entre a endocutícula e a camada de células epidérmicas foi visualizado na região basal, sendo que as células epidérmicas mostraram mais eletrondensidade do que a região da endocutícula (Figura 12B).

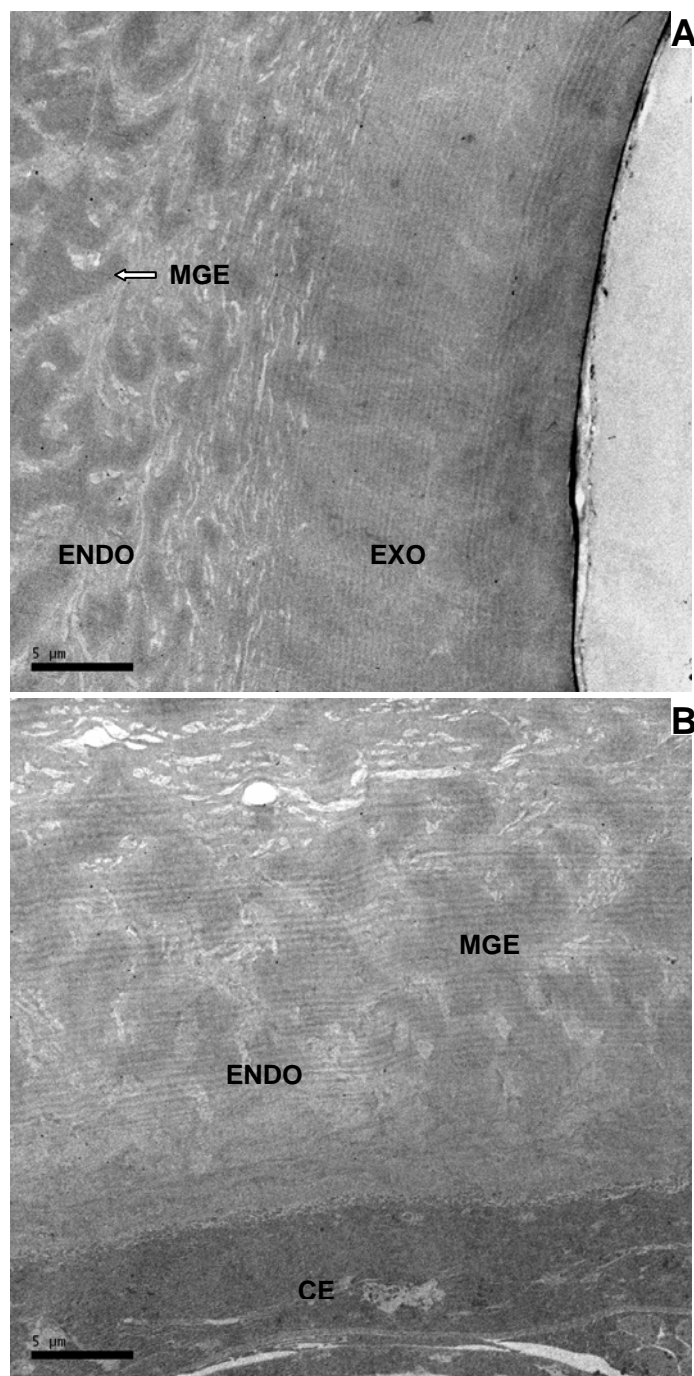


Figura 12. Eletromicrografia de transmissão da cutícula do carrapato *Boophilus microplus* controle. A) região apical e B) região basal. EXO: Exocutícula. ENDO: Endocutícula. CE: Células epidérmicas. MGE: material granular eletrondenso.

A presença do fungo aderido à epicutícula do carrapato pôde ser visualizada em todos os tempos de tratamento avaliados (Figuras 14, 15, 16, 18 e 23A).

Estruturas semelhantes aos conídios puderam ser visualizadas na superfície da cutícula do carrapato (Figura 13). Estas estruturas apresentaram diferenças na sua morfologia, provavelmente devido aos vários estágios de desenvolvimento (germinação e formação do apressório) durante o processo de infecção. Alguns conídios apresentaram parede celular composta por duas camadas, denominadas de parede primária do esporo e parede secundária do esporo (Figura 13A). A parede primária do esporo apresentou-se como uma camada mais interna, aparentemente amorfa e eletrtransparente. Externamente a esta camada nota-se a parede secundária do esporo, como uma fina camada bastante eletrondensa e irregular. Segundo ZACHARUK (1970a), a maioria dos conídios apresenta uma terceira camada, fina, transparente e coberta por lipídios, e esta não foi bem visualizada nos conídios observados na Figura 12A. O citoplasma destes conídios apresentou grande quantidade de mitocôndrias com numerosas cristas (Figuras 13A, B). O núcleo esférico foi bem evidenciado, embora este não tenha apresentado membrana nuclear visível (Figura 13A). Aparentemente, estes conídios não estão dormentes, mas sim em fase de germinação. Conídios dormentes apresentam no seu citoplasma núcleos esféricos e centrais, várias pequenas mitocôndrias e dois grânulos de lipídios grandes e eletrondensos em cada lado do núcleo. À medida que a germinação transcorreu, apareceram no citoplasma do conídio grandes vacúolos contendo grânulos grosseiros (Figura 13C), sendo que, ao final do processo de germinação, o vacúolo preencheu completamente o conídio e este se tornou vazio (Figura 13D). Em alguns conídios, observou-se um leve desprendimento da membrana plasmática da parede do conídio em consequência do processo de germinação e a presença de estruturas membranosas (semelhantes aos lomassomos descritos por ZACHARUK, 1970a), observadas entre a membrana plasmática e a parede da hifa (Figura 14). Outros conídios localizados na superfície da cutícula apresentaram estruturas vesiculadas semelhantes aos dictiossomos (Figura 15).



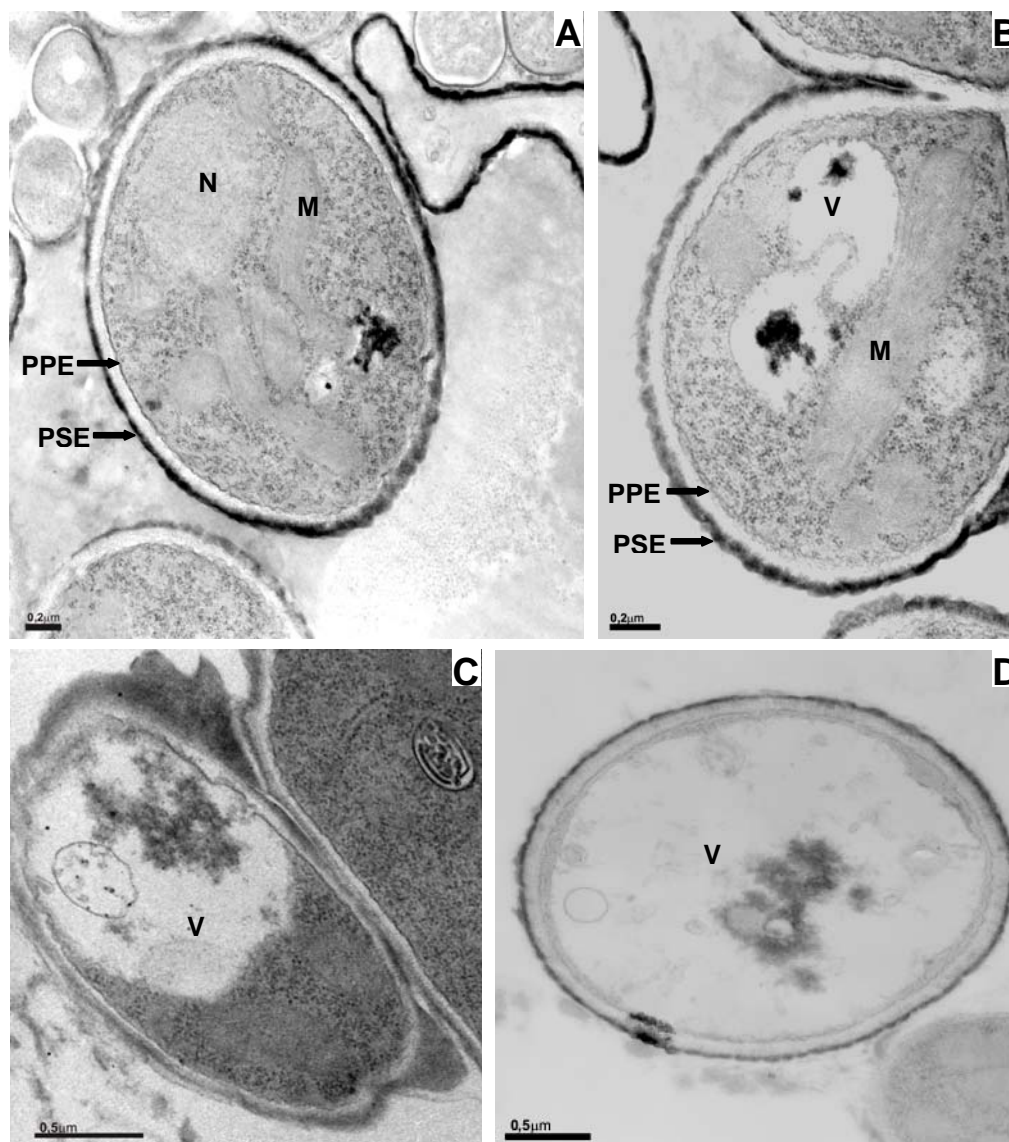


Figura 13. Ultraestrutura de diferentes estágios de desenvolvimento (germinação) dos conídios de *Metarhizium anisopliae* presentes na superfície da cutícula de *Boophilus microplus*. A e B) Detalhes do conídio evidenciando as camadas que formam a sua parede : parede primária do esporo (PPE) e parede secundária do esporo (PSE).. A presença de grande vacúolo contendo material eletrondenso pode ser visualizado em C e, um conídio vazio, após o término da germinação pode ser visualizado em D. M: mitocôndria. N: núcleo. V: vacúolo.

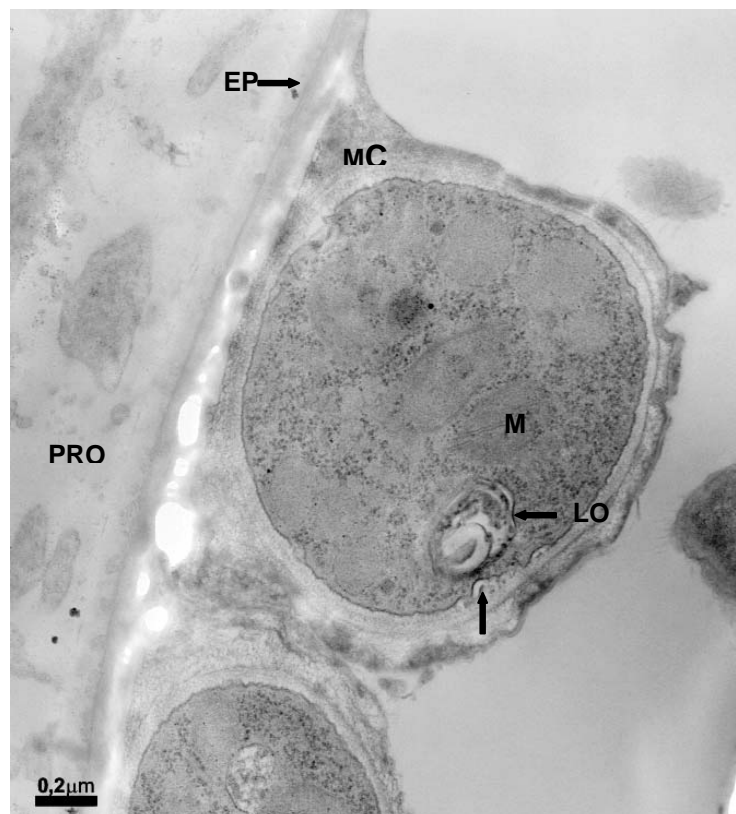


Figura 14. Ultraestrutura das células apressoriais de *Metarhizium anisopliae* na superfície da cutícula de *Boophilus microplus* com 24 h de infecção. Notar o desprendimento da membrana plasmática da parede do conídio em consequência da germinação (seta) e a presença de estruturas membranosas (semelhantes aos lamossomos) (LO) formadas entre a membrana plasmática e a parede da hifa. M: mitocôndria. MC: camada de mucilagem. PRO: procutícula. EPI: epicutícula.

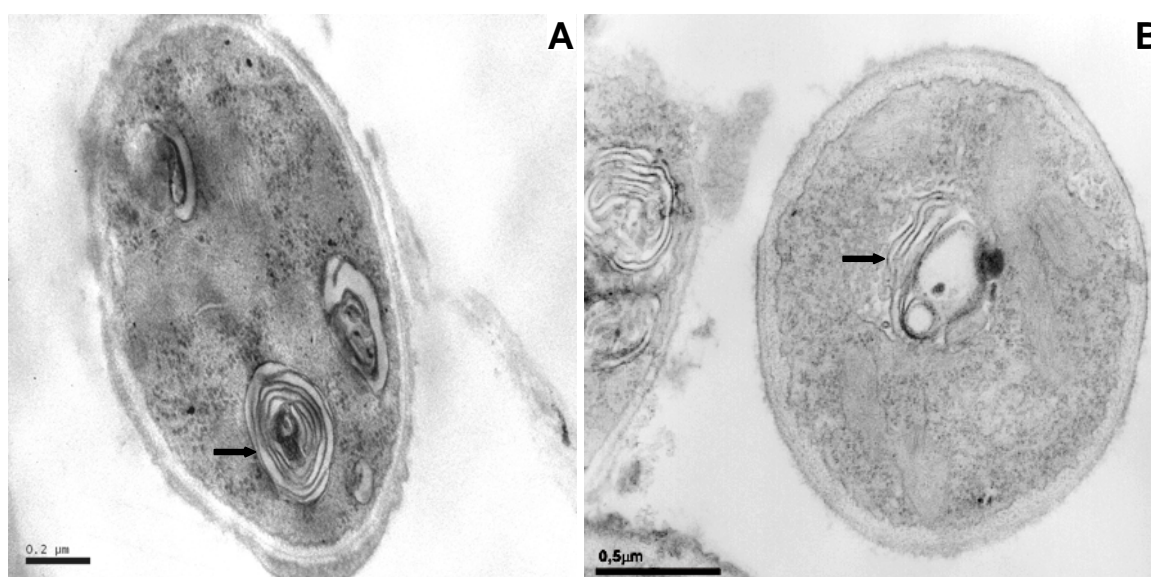


Figura 15. Eletromicrografia de transmissão dos conídios de *Metarhizium anisopliae* na superfície da cutícula de *Boophilus microplus* com 24 h de infecção. Evidenciar a presença de estruturas semelhantes aos dictiossomas (setas) que aparecem como estruturas lamelares em A e B.

A presença de uma estrutura mucóide, amorfa e bastante eletrondensa foi observada na região de adesão do fungo próximo a epicutícula (Figura 16). Entretanto, em outras regiões, essa camada de mucilagem apresentou-se menos eletrondensa e o fungo apareceu completamente envolvido por uma intensa quantidade de mucilagem (Figuras 14 e 17). Ainda, o citoplasma do fungo, nestes cortes, apresentou várias mitocôndrias, contendo cristas esparsas, e grande quantidade de ribossomos. Como o apressório é caracterizado por apresentar uma espessa camada de mucilagem, que facilita a adesão do fungo, e certa quantidade de mitocôndrias, pode-se sugerir que esta região faça parte do apressório (Figuras 14 e 17). Em outros locais, pode-se evidenciar o espaço existente no ponto de união entre o fungo (região da célula apressorial) e endocutícula (Figura 18).

Estas estruturas semelhantes ao apressório (Figuras 14 e 17) e as diferentes morfologias do conídio, inclusive mostrando seu esvaziamento, foram observadas nos cortes com 24 h de infecção. Neste mesmo tempo, observou-se a presença de alguns corpos de hifas no interior da procutícula, indicando que, a partir de 24 h de infecção, ocorre a penetração das hifas no hospedeiro (Figuras 16C, D, E), desta forma, comprovando o que foi mostrado anteriormente com as análises por microscopia de varredura. Estas pequenas hifas apresentaram-se bem distintas do restante da cutícula, sendo distinguidas pela evidente parede celular. O citoplasma apresentou grande quantidade de ribossomos e a presença de uma estrutura semelhante ao dictiossoma, não sendo visualizadas mitocôndrias nestes cortes (Figura 16E).

Com o transcorrer do processo de infecção o fungo invadiu completamente a cutícula, sendo que, após 48 h de infecção, observou-se o desenvolvimento de várias hifas (corpos hifais) na procutícula do carrapato (Figura 19). Estas hifas, com forma alongada estavam, em sua maior parte, localizadas próximas à epicutícula e aparentemente distribuídas em camadas. Algumas hifas apresentaram-se bem desenvolvidas dentro da procutícula, inclusive com a presença de septos (Figura 19). Os septos das hifas são formados quando uma nova hifa é formada. Um septo completo foi visualizado em um corpo de hifa recém desenvolvido na procutícula (Figura 20A). Pequenas estruturas eletrondensas, semelhantes a grânulos de lipídios (ou grânulos de Woronin),

foram observadas em cada um dos lados do septo e próximo ao poro septal (Figura 20B, C). Em corte transversal de outros corpos de hifas, evidencia-se a presença de estruturas semelhantes aos dictiossomas no seu citoplasma, rico em ribossomos (Figura 21), que também foram evidenciadas no citoplasma do fungo localizado na superfície da cutícula (Figura 15).

Como esperado, com o aumento do tempo de infecção houve um considerável desenvolvimento do fungo no interior da cutícula e, com 96 h de infecção, observou-se uma intensa quantidade de corpos de hifas que penetraram e se desenvolveram na procutícula, invadindo esta região (Figura 22) semelhantemente ao observado anteriormente por microscopia óptica (Figura 6A). As hifas localizadas na procutícula, neste tempo de infecção, apresentaram-se em diferentes estágios de desenvolvimento. Somente um núcleo foi observado nos corpos de hifa e este foi normalmente menos denso que o citoplasma. Entretanto, algumas hifas apresentaram o núcleo bastante granular, mais eletrondenso, podendo indicar a alta atividade metabólica da célula (Figura 23A). Outras hifas mostraram-se aparentemente destituídas de conteúdo citoplasmático, evidenciado pela pouca eletrondensidade observada no citoplasma. Entretanto, nestas hifas, ainda observa-se a presença de mitocôndrias (Figura 23B). Detalhes dos corpos de hifas podem ser visualizados na Figura 24. Em alguns destes pode-se observar a divisão nuclear, que provavelmente ocorre por constrição do envoltório nuclear (Figura 24A) e a presença de mitocôndrias, retículo endoplasmático, vacúolos e estruturas semelhantes aos dictiossomas (Figuras 24B,C, D). Devido à invasão e desenvolvimento do fungo no interior da cutícula do carrapato, uma aparência diferente da procutícula, quando comparada com o controle, pode ser evidenciada em alguns locais e essa diferença é marcada pela presença de grande quantidade de vacúolos (Figura 25).

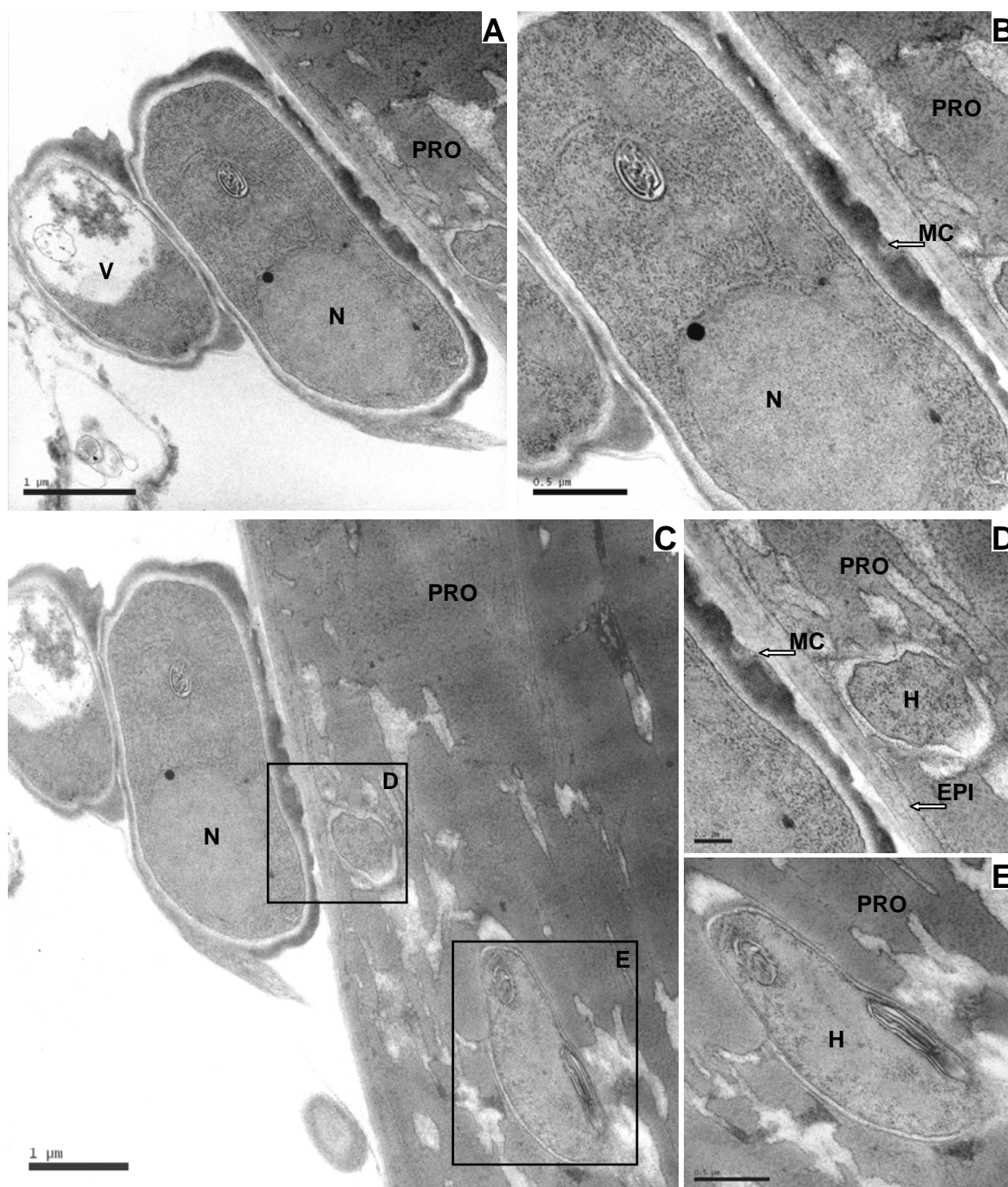


Figura 16. Eletromicrografia de transmissão da cutícula do carrapato *Boophilus microplus* após 24 h de infecção com *Metarhizium anisopliae*. Notar em A e B, a aderência das hifas na cutícula do carrapato e a presença de uma camada de mucilagem (MC). Em C, D e E, notar a presença de hifas (H) que penetraram na procutícula (PRO) do carrapato. EPI: epicutícula. N: núcleo. V: vacúolo.

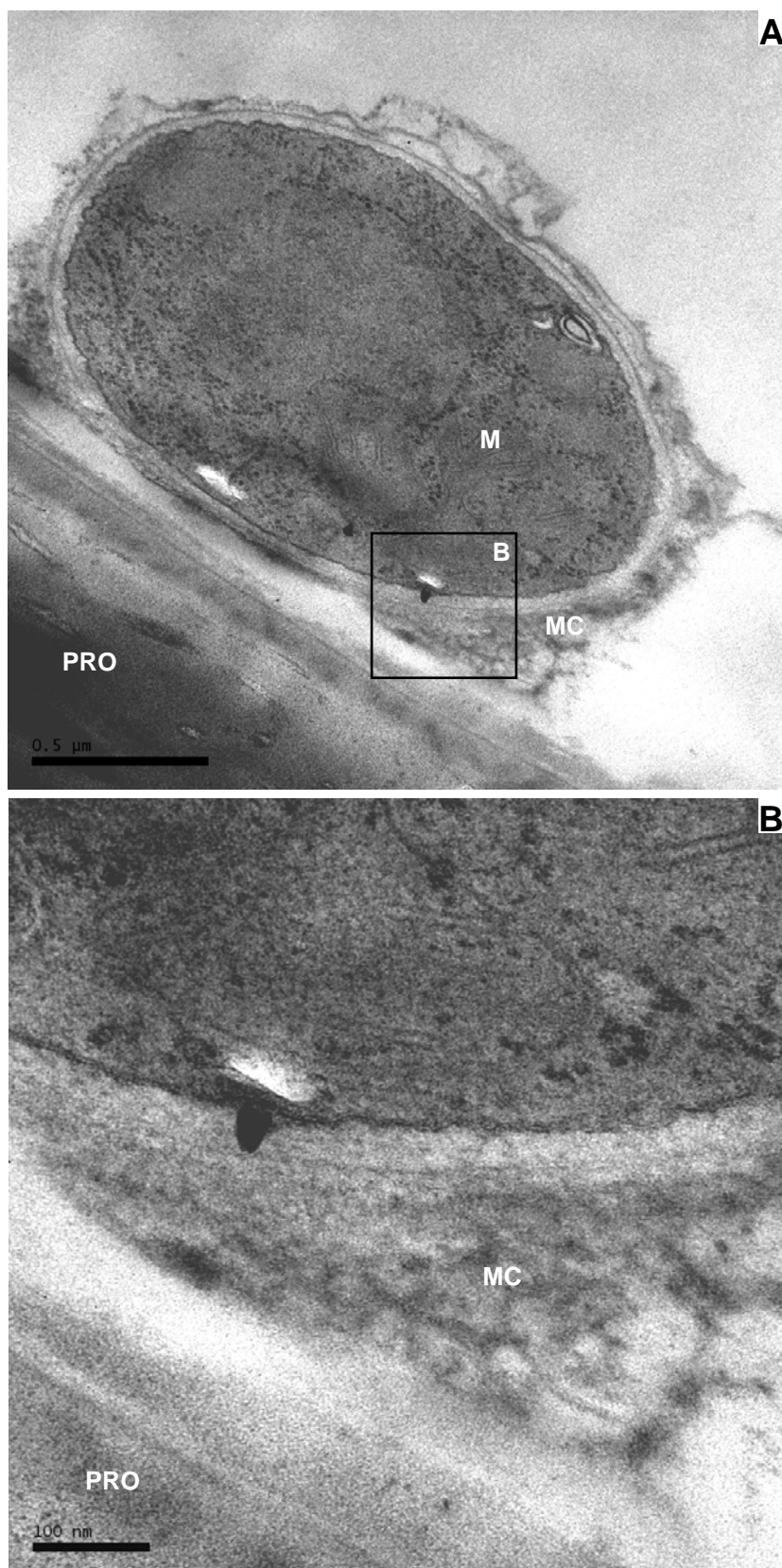


Figura 17. Eletromicrografia de transmissão do fungo *Metarhizium anisopliae* (isolado E6) na cutícula do carrapato *Boophilus microplus* após 24 h de infecção. Em A, *M. anisopliae* aderido a cutícula do carrapato. Em B, detalhe da camada de mucilagem (MC) que adere o fungo à cutícula. PRO: procutícula. M: mitocôndria.

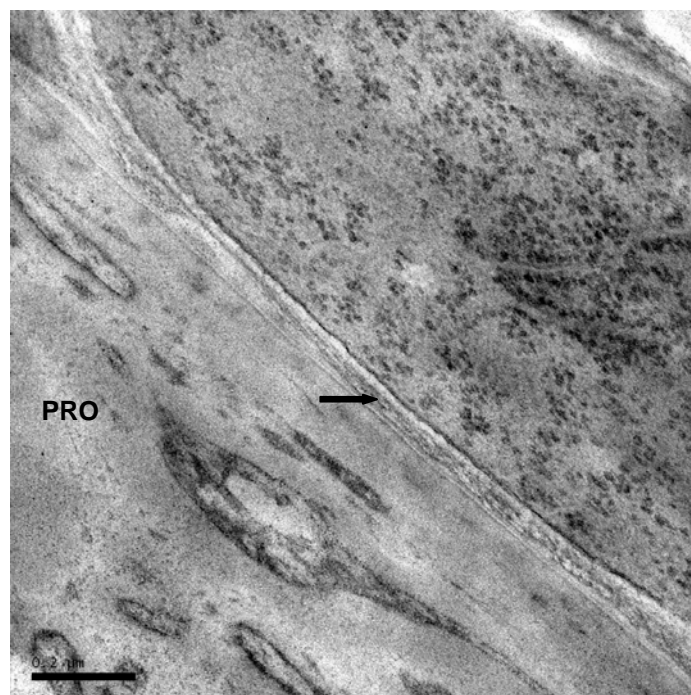


Figura 18. Eletromicrografia da cutícula de *Boophilus microplus* com 24 h de infecção com *Metarhizium anisopliae* evidenciando o regular espaço existente no ponto de união entre o fungo (região da provável célula apressorial) e endocutícula (seta). PRO: procutícula.

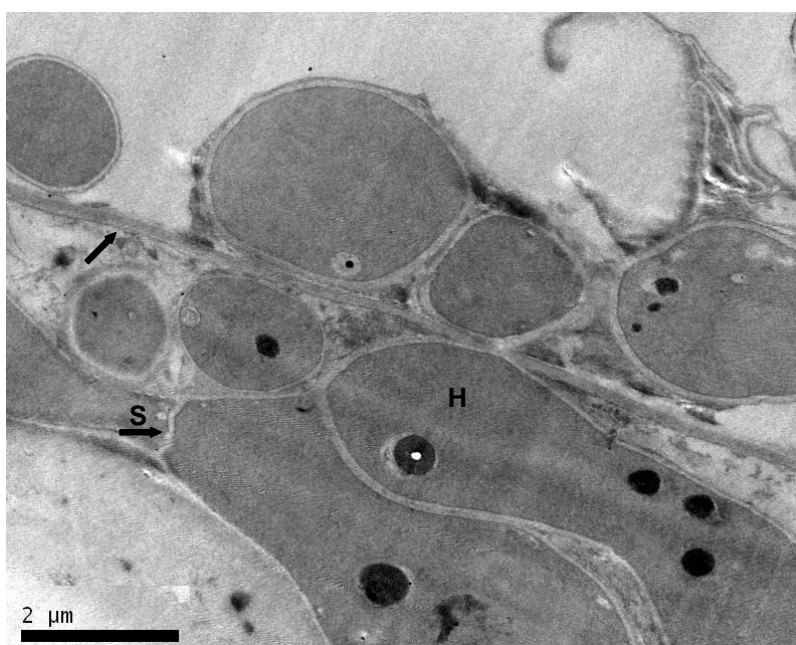


Figura 19. Eletromicrografia de transmissão da cutícula de *Boophilus microplus* com 48 h de infecção com *Metarhizium anisopliae* isolado E6. Notar a grande quantidade de hifas (H) na procutícula (PRO) devido ao intenso processo de infecção do fungo. A seta indica a epicutícula. S: septo.

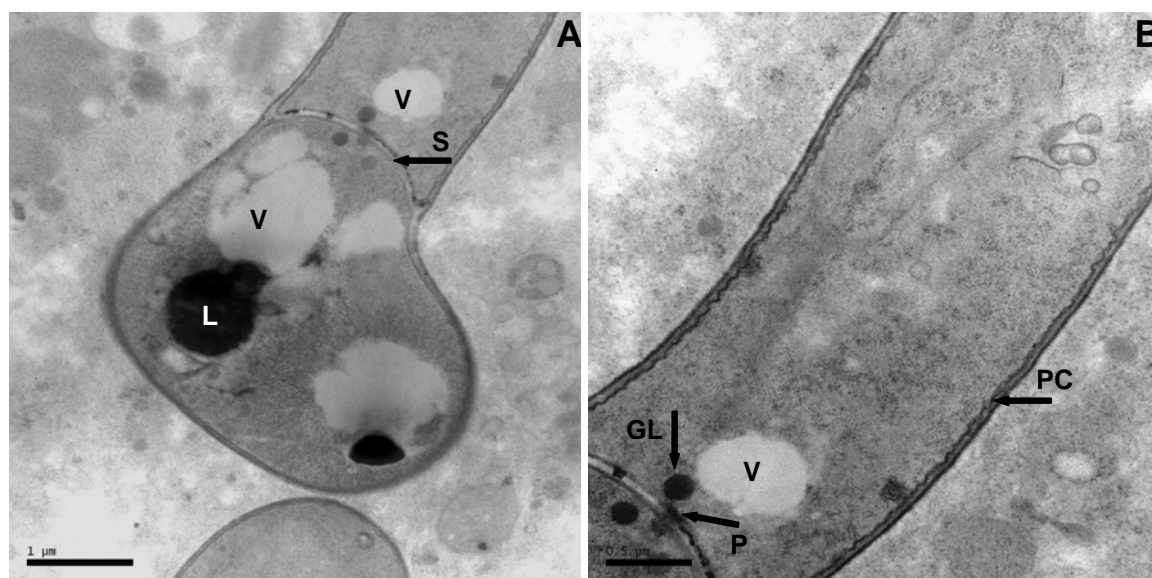


Figura 20. Eletromicrografia de transmissão de um corpo de hifa presente na procutícula do carrapato *Boophilus microplus* com 24 h de infecção com *Metarhizium anisopliae*. Em A e B, evidenciar a presença de septos (S), vacúolos (V) e grânulos lipídicos (L). Em C, um detalhe do septo, evidenciando a presença do poro septal (P) e grânulos com características lipídicas semelhantes aos grânulos de Woronin (GL). PC: parede celular.

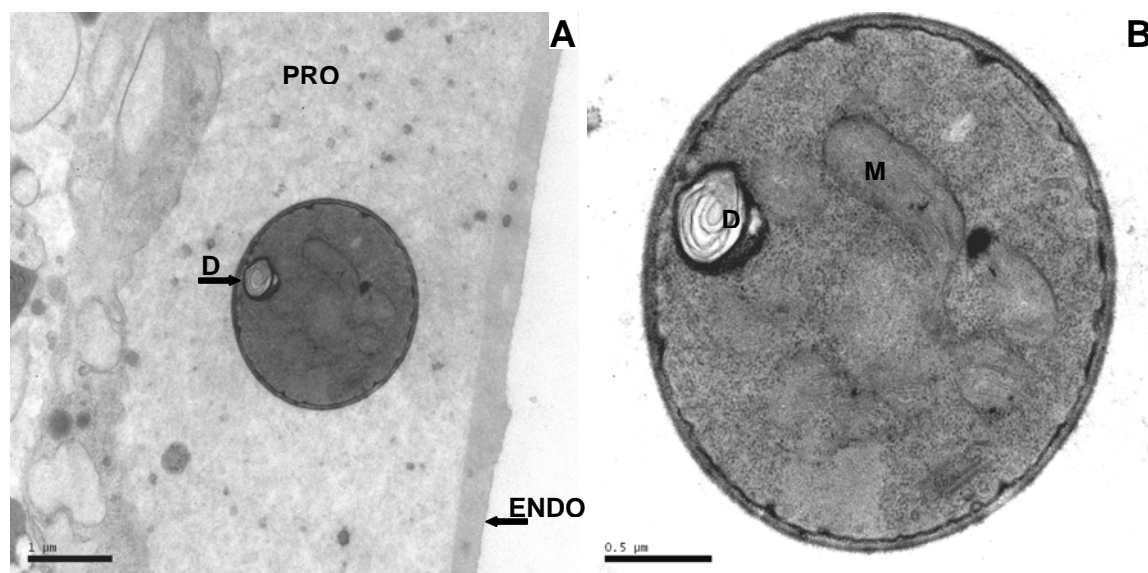


Figura 21. Eletromicrografia de transmissão de um corpo de hifa presente na cutícula de *Boophilus microplus* após 48 h de infecção com *Metarhizium anisopliae*. Em A, nota-se a presença de hifas (corpos hifais) no interior da procutícula (PRO). Em B, detalhe da hifa evidenciando a presença de estruturas semelhantes aos dictiossomas (D) e mitocôndrias (M) no citoplasma. ENDO: endocutícula.



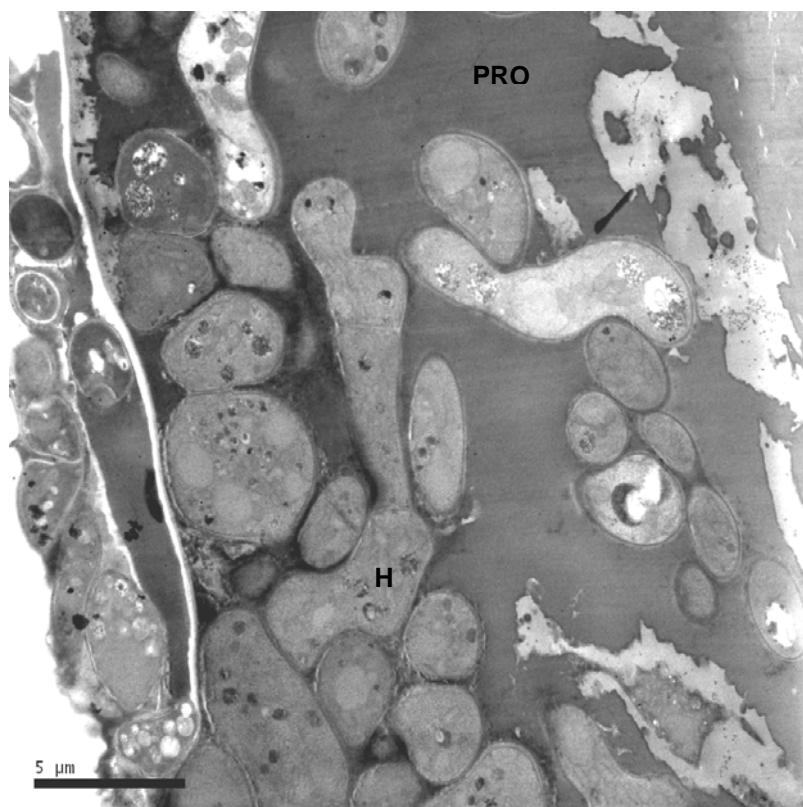


Figura 22. Eletromicrografia de transmissão da cutícula do carrapato *Boophilus microplus* com 96 h de infecção com *Metarhizium anisopliae* isolado E6 evidenciando o intenso desenvolvimento de hifas (H) na procutícula (PRO).

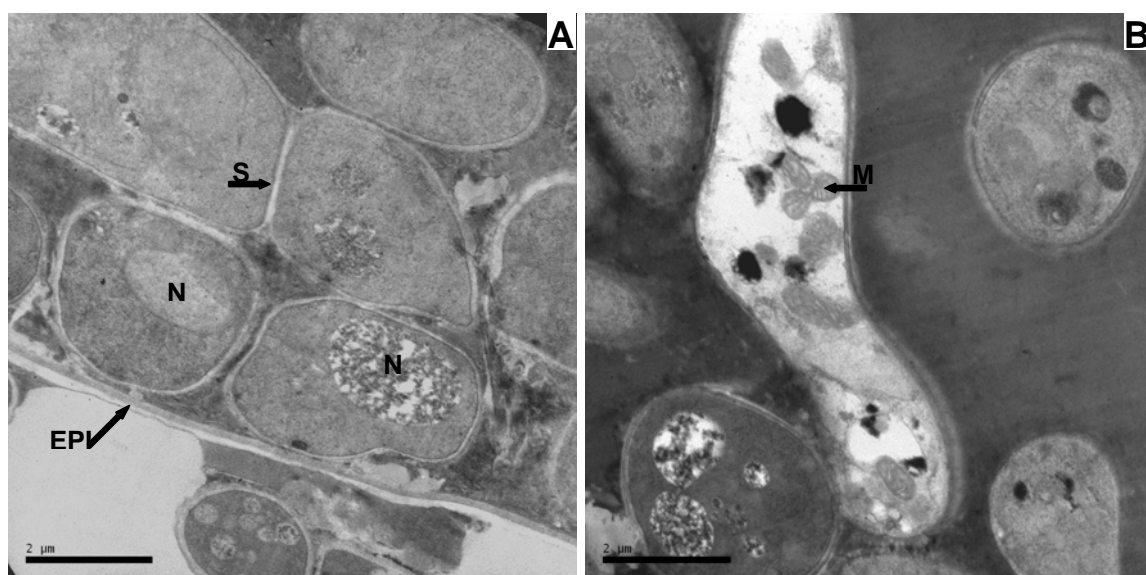


Figura 23. Eletromicrografia de transmissão dos corpos de hifas *Metarhizium anisopliae* na cutícula de *Boophilus microplus* com 96 h de infecção. Em A, notar a intensa atividade de alguns núcleos (N) das hifas que aparecem mais eletrondensos. Em B, evidenciar a degradação citoplasmática de algumas hifas neste período de infecção. M: mitocôndria. S: septo. EPI: epicutícula.

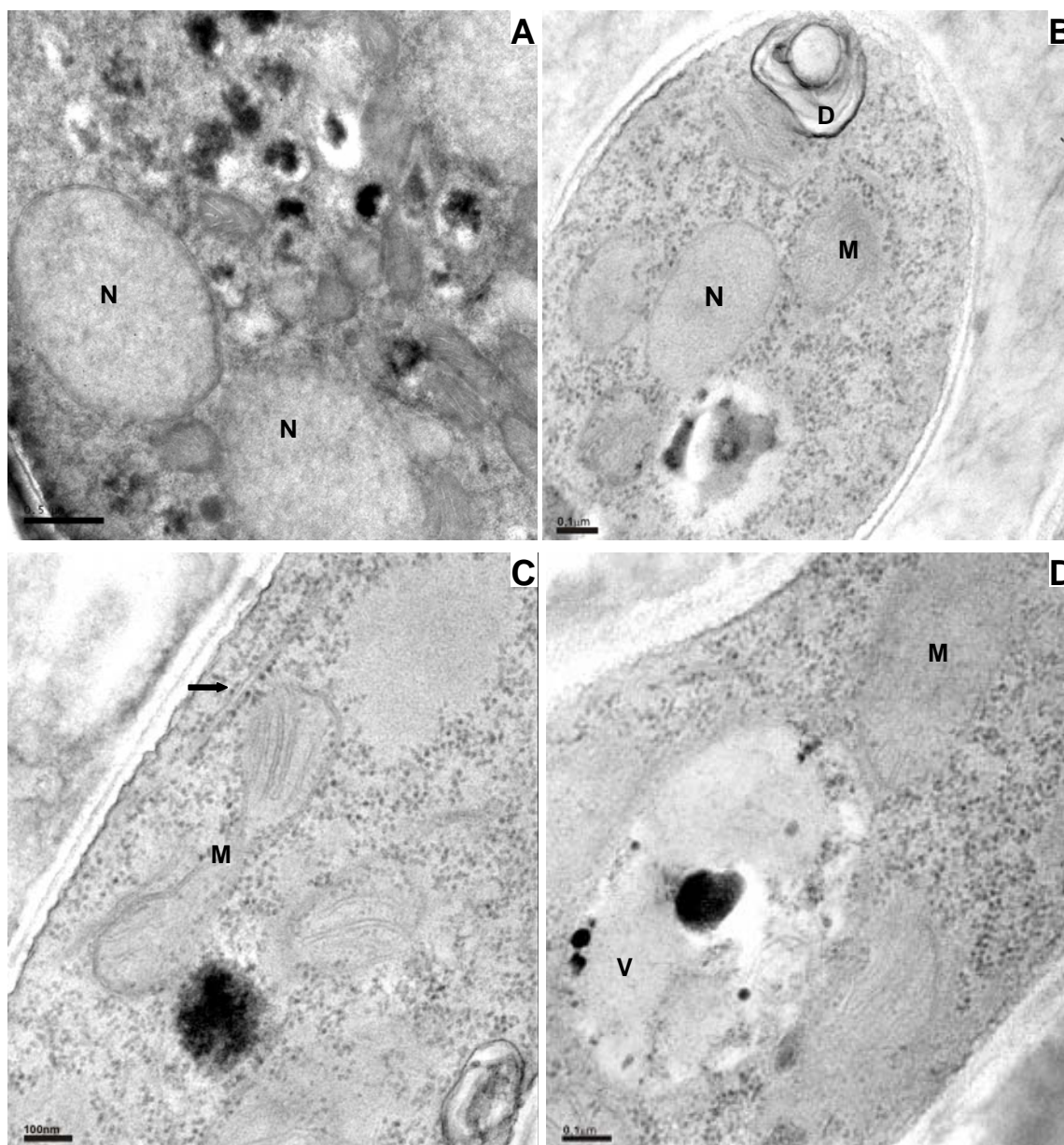


Figura 24. Detalhes ultraestruturais da hifa de *Metarhizium anisopliae* na cutícula de *Boophilus microplus*. Em A, notar o processo de divisão nuclear da hifa. Em B, C e D, evidenciar a presença de mitocôndrias com cristas esparsas (M), estruturas semelhantes aos dictiossomas (D), vacúolos (V) e retículo endoplasmático (seta) no citoplasma da hifa. N: núcleo.

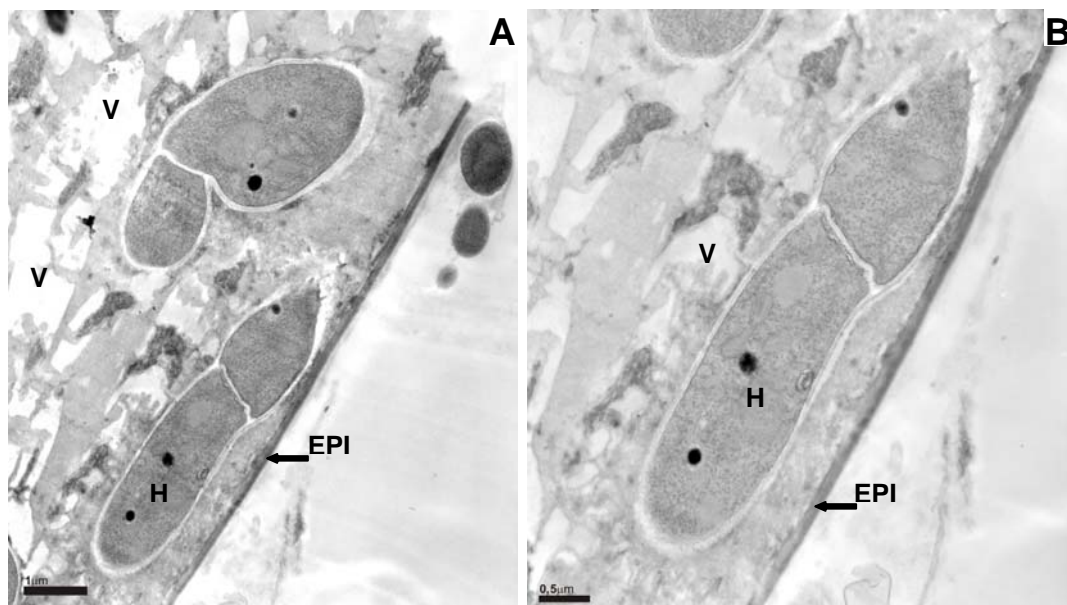


Figura 25. Eletromicrografia de transmissão da cutícula de *Boophilus microplus* infectada com *Metarhizium anisopliae* evidenciando em A e B, a grande destruição da procutícula ocasionada pela presença de vacúolos (V) e hifas(H) na procutícula. EPI: epicutícula.

## 4.2. Infecção dos Ovos

Análises da infecção dos ovos de carrapatos *B. microplus* por *M. anisopliae* foram realizadas por observação macroscópica (Figura 26) e por microscopia de varredura (Figura 27). *M. anisopliae* também é capaz de infectar os ovos do carrapato, pois, em análises macroscópicas, observou-se crescimento do fungo na superfície dos ovos (Figura 26B), o que não foi observado no controle (Figura 26A). As análises por MEV confirmaram a hipótese de infecção dos ovos (Figuras 27B, C e D e 28). Na Figura 28 podemos observar que os conídios de *M. anisopliae* aderiram, germinaram e penetraram nos ovos do carrapato. Observou-se a existência de camada de mucilagem aderindo os conídios à superfície dos ovos e a formação de curtos tubos germinativos que terminaram penetrando na superfície do ovo. A penetração do fungo na superfície dos ovos parece ter iniciado após 2 dias de infecção, pois após este período, foram encontradas todas as estruturas de penetração. Um pouco diferente da penetração na cutícula do carrapato, que se inicia após o primeiro dia de infecção. Após 10 dias de infecção, observou-se um grande desenvolvimento de hifas na superfície dos ovos, indicando que este foi completamente colonizado pelo fungo (Figura 27D). Nos ovos controle (Figura 27A) não se observou a presença de *M. anisopliae*.

A eclosão dos ovos foi observada tanto em ovos controle como infectados com *M. anisopliae*. Praticamente todos os ovos do experimento controle eclodiram após um período de incubação de 12-14 dias em câmara de germinação a 28°C com umidade de cerca de 90%, enquanto que, os ovos tratados com *M. anisopliae* não eclodiram quando incubado nas mesmas condições e no mesmo período de incubação (Figura 29), indicando que, o fungo *M. anisopliae*, além de infectar os ovos do carrapato, também reduz a eclosão dos ovos, sendo, portanto uma maneira eficiente de controle biológico.

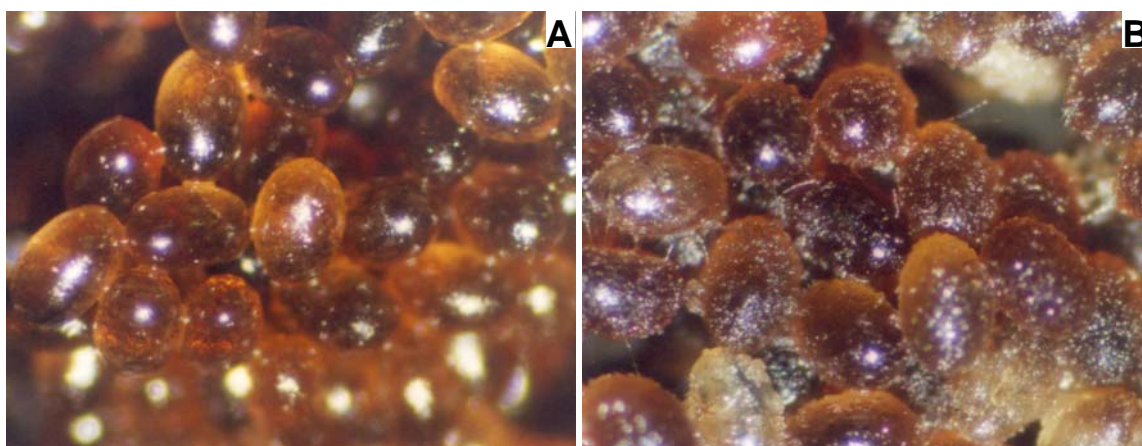


Figura 26. Fotomicrografia dos ovos do carrapato *Boophilus microplus*. A) Controle. B) Com 3 dias de infecção com *Metarhizium anisopliae*. 12,5X.

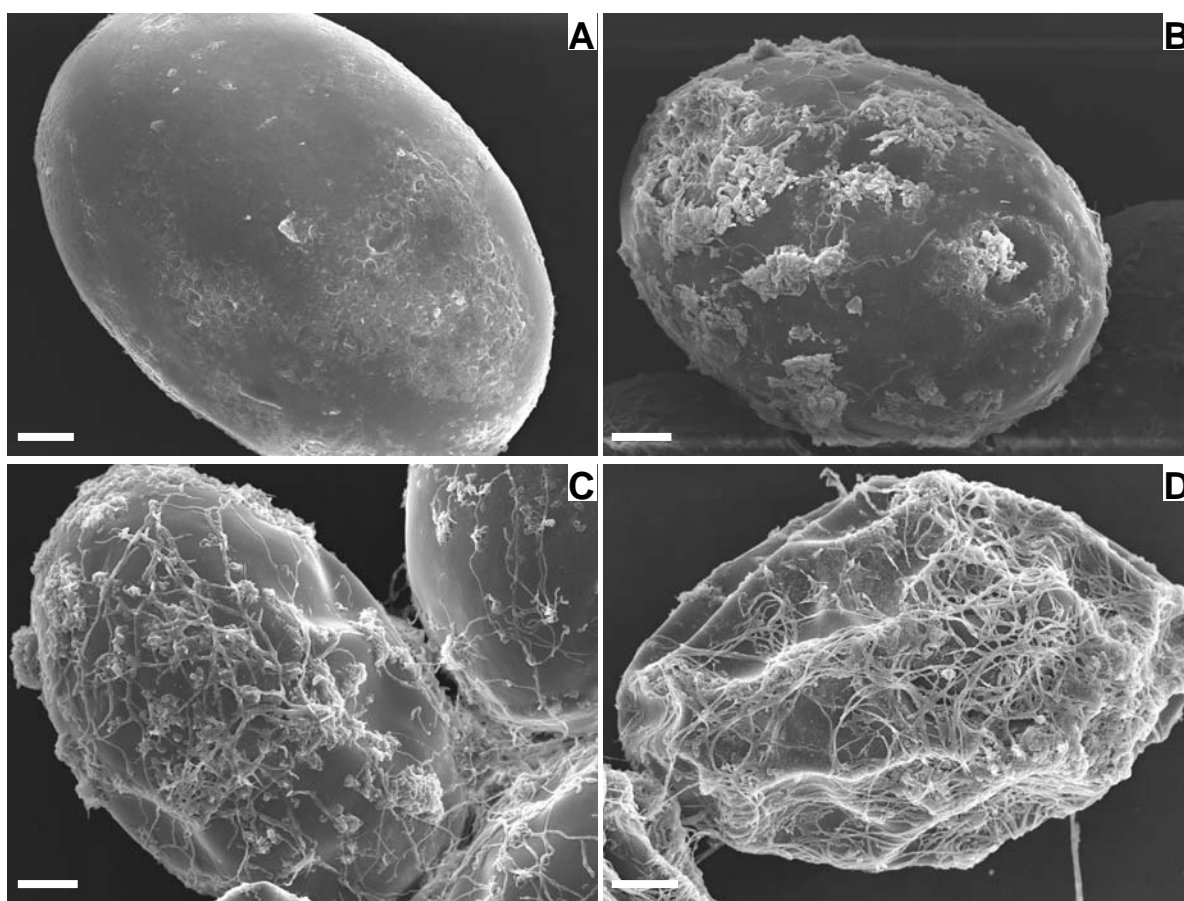


Figura 27. Eletromicrografia de varredura dos ovos do carrapato *Boophilus microplus*. A) Controle. B, C e D) Com 3, 4 e 10 dias de infecção com *Metarhizium anisopliae*, respectivamente. Bar=50 $\mu$ m.

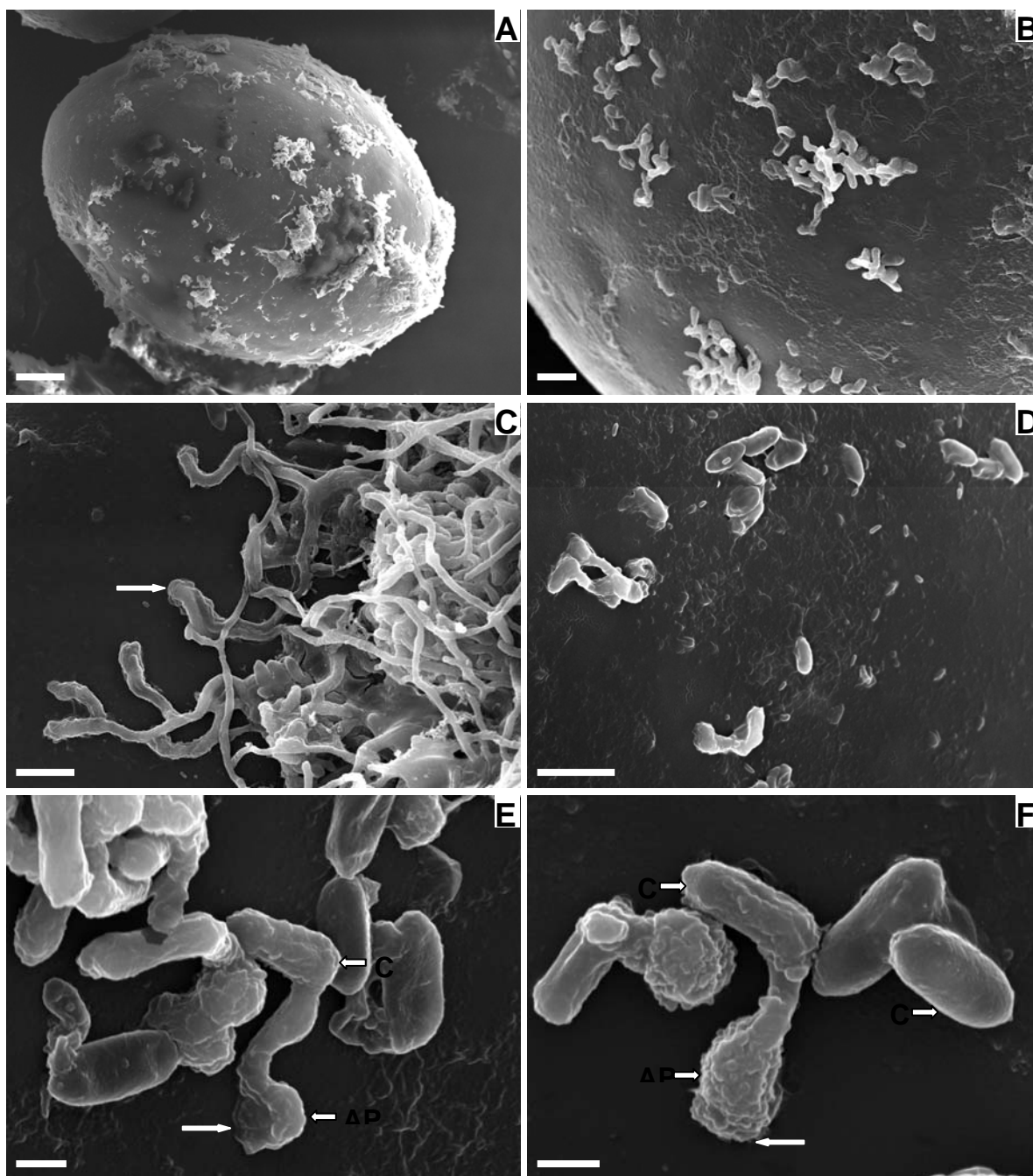


Figura 28. Eletromicrografia varredura dos ovos do carrapato *Boophilus microplus* com 2 dias de infecção com *Metarhizium anisopliae*. Notar a presença de grande quantidade de hifas, formação de apressório (AP) e penetração do fungo na superfície dos ovos (seta). A: Bar=50µm. B, C e D: Bar=10µm. E e F: Bar=2µm. CO: conídio.



Figura 29. Eclusão dos ovos de *Boophilus microplus* controle (A) e tratados com *Metarhizium anisopliae* (B).

## 5. DISCUSSÃO

Nossos estudos por microscopia óptica e eletrônica de transmissão revelaram que o tegumento de *B. microplus* é muito similar ao descrito para os artrópodes (WIGGLESWORTH, 1972) e para os insetos em geral (CLARKSON & CHARNLEY, 1996), sendo formado pela cutícula, células epidérmicas e membrana basal. CLARKSON & CHARNLEY (1996) e CLARKSON *et al.* (1998), observaram que a cutícula é uma camada acelular que contém duas camadas principais, uma externa, a epicutícula, e uma interna, a procutícula. A epicutícula é uma estrutura complexa e fina, que não possui quitina e é coberta por uma camada de cera, que contém ácidos graxos, lipídeos e esteróis. A procutícula forma a maior parte da cutícula e é composta por fibras de quitina e proteínas arranjadas em camadas repetidas formando uma estrutura elaborada e orientada denominada de lamela.

A cutícula de fêmeas de *B. microplus* apresenta a capacidade peculiar de expansão, devido ao ingurgitamento durante o parasitismo. A morfologia ultraestrutural de suas camadas foi estudada por HACKMAN & FILSHIE (1982) em diferentes estágios de desenvolvimento. Estes autores observaram diferenças na procutícula de fêmeas, ninfas e adultas, e isto foi correlacionado com a capacidade de estiramento da cutícula. Nossos resultados ultraestruturais são similares aos obtidos por HACKMAN & FILSHIE (1982), que observaram que cutículas de fêmeas ingurgitadas apresentam uma marcante divisão entre a epi e endocutícula e que a endocutícula é composta por lamelas constituídas por material amorfo envolvido por material granular eletrondenso. Estes autores ainda sugerem que o material amorfo corresponde a microfibrilas de quitina e que o material granular é a matriz protéica que envolve as microfibrilas de quitina.

O fungo entomopatogênico *M. anisopliae* invade seu hospedeiro primariamente através da penetração direta da cutícula, que é a primeira barreira contra infecção. Este modo de entrada é similar ao dos fungos fitopatogênicos, sendo realizado por uma combinação de pressão mecânica e degradação enzimática (ST LEGER *et al.*, 1987). Como as proteínas são o principal componente estrutural da cutícula dos insetos (ANDERSEN, 1979), fungos



entomopatogênicos como *M. anisopliae* produzem uma variedade de enzimas hidrolíticas, como proteases, quitinases e lipases na superfície da cutícula do hospedeiro durante o processo de infecção (ST LEGER *et al.*, 1987; 1988; 1996a; 1996b; PINTO *et al.*, 1997; CLARKSON *et al.*, 1998; TIAGO *et al.*, 2002; KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2003). A especificidade destas enzimas tem implicações importantes na patogênese. GOETTEL *et al.* (1989) em seus estudos ultraestruturais da penetração de *M. anisopliae* em cutícula de *Manduca sexta* sugerem que a penetração da epicutícula é primariamente por degradação enzimática, ao mesmo tempo em que a penetração da procutícula envolve tanto degradação enzimática quanto separação mecânica das lamelas. BIDOCHKA *et al.* (1997) observaram que fungos entomopatogênicos utilizam compostos da cutícula de acrididae como fonte de nutriente. Estes compostos são muito importantes, porque a maioria dos fungos entomopatogênicos requer nutrientes exógenos da superfície do hospedeiro para germinarem, se desenvolverem e produzirem várias enzimas para degradação da cutícula que facilitam o processo de penetração. É provável que a penetração envolva a produção de enzimas que degradam a cutícula, como sugerido por ST LEGER *et al.* (1987) para *M. anisopliae* infectando *Manduca sexta*. Neste estudo, foram fornecidas evidências de que o modo de penetração de *M. anisopliae* no tegumento de *B. microplus* envolve tanto pressão mecânica quanto degradação enzimática. É provável o envolvimento de enzimas hidrolíticas secretadas pelo fungo na cutícula do hospedeiro para facilitar a penetração do apressório. A presença de uma zona clara adjacente no local de penetração do apressório e a morfologia diferenciada e alterada porção terminal das hifas observada por MEV pode indicar este envolvimento. Este processo nunca foi relatado por estudos usando MEV, entretanto, alguns trabalhos (McCAULEY *et al.* 1968) relataram, baseados em microscopia óptica uma zona clara em volta do grampo de penetração em insetos infectados com *M. anisopliae* e concluíram que as enzimas hidrolíticas se difundiram do apressório. Por outro lado, ZACHARUK (1970c), estudando a ultraestrutura do processo de infecção de *M. anisopliae* em larvas de espécies da família Elateridae, sugeriu que as enzimas hidrolíticas se difundem diretamente do apressório para o tegumento, provocando a histólise das regiões da epi e da endocutícula situadas ao longo da membrana plasmática.

Nossos estudos usando a técnica histoquímica de PAS mostraram que a hifa de *M. anisopliae* está presente na cutícula de *B. microplus* após a inoculação pelo fungo. Nós observamos que cutículas infectadas têm uma diminuição da quantidade de polissacarídeos (provavelmente quitina) na endocutícula, mas a reação de PAS ainda permanece positiva. GABRIEL (1968), em seus estudos histoquímicos da infecção de *Galleria mellonella* e *Bombyx mori* com *M. anisopliae*, observou que, em casos de invasão massiva pelo fungo, certas camadas da lamela cuticular permaneceram PAS-positivas. Considerando que a presença de polissacarídeos, como quitina, é detectada pela reação de PAS e há intensa reação de PAS na parede celular do fungo dentro da cutícula do hospedeiro, nota-se que o fungo que penetra na cutícula mantém sua parede celular quitinosa. Ainda em nossos estudos com microscopia de luz, mostramos uma protuberância da cutícula causada pelo amplo desenvolvimento da hifa dentro da procutícula e entre a procutícula e a epicutícula. McCAULEY *et al.* (1968) revelaram este fenômeno, sendo que eles também observaram a ruptura da epicutícula. A invasão massiva e o desenvolvimento do fungo dentro da procutícula, assim como a degradação da procutícula pela presença de vacúolos foi comprovada pelos estudos ultraestruturais.

Antes da penetração, os conídios precisam aderir à superfície do hospedeiro. Isto é possível pelas interações hidrofóbicas entre o conídio e a cutícula do inseto (BIDOCHKA *et al.*, 1997) e pela produção de uma camada adesiva de muco. A natureza e função de secreção mucóide observada envolvendo o apressório de *M. anisopliae* no presente estudo parecem ser similares às descritas por ZACHARUK (1970a, b); ST LEGER *et al.* (1987); BIDOCHKA *et al.* (1997) e ASKARY *et al.* (1999). Estes autores relataram que o apressório é envolvido em uma secreção mucilagenosa e adere firmemente sobre uma ampla área da superfície do hospedeiro, fornecendo uma base de união. ZACHARUK (1970a, b) descreveu a ultraestrutura das células apressoriais relatando que estas se apresentam em alto nível de atividade metabólica, em função da secreção da camada de muco e da produção de enzimas hidrolíticas. Ainda, este autor descreve que estas células são completamente envolvidas por uma espessa substância amorfa, mucóide e eletrondensa, diferentemente dos conídios, onde essa substância amorfa é escassa e irregular. Em outros estudos,

é relatado que o substrato mucilaginoso é produzido pela ponta da hifa em crescimento e não é somente uma característica da adesão do apressório, mas uma importante característica do crescimento da hifa e formação do apressório (ST LEGER *et al.*, 1991). Ainda, ST LEGER *et al.* (1996b) revelaram que a mucilagem extracelular tem um provável papel na manutenção e no transporte de enzimas de degradação na cutícula.

Os conídios de *M. anisopliae* facilmente aderem à superfície da maioria dos insetos. Observou-se uma freqüente adesão de conídios de *M. anisopliae* nas patas de *B. microplus*, mas apesar dos conídios aderirem mais facilmente a estes locais, eles são capazes de se aderirem em qualquer parte da cutícula de *B. microplus*. Similares considerações foram relatadas por VESTERGAARD *et al.* (1999), que mostraram que os conídios de *M. anisopliae* foram capazes de aderirem a qualquer local da cutícula de adultos de *Frankliniella occidentalis*, mas que estes conídios são freqüentemente presos pelas cerdas nas asas e patas. Em outros estudos com *M. anisopliae*, SOSA-GOMES *et al.* (1997) revelaram que regiões da cutícula de *Nezara viridula*, com grande número de cerdas, representam sítios de alta afinidade de adesão conídios e McCAULEY *et al.* (1968) mostraram semelhantes considerações quando observaram que houve variação dos locais de infecção na mesma espécie de hospedeiro e que a maioria destas infecções ocorreram em dobras intersegmentais membranosas.

Cada conídio produziu somente um tubo germinativo e ocorreu grande variação no comprimento deste tubo antes da formação do apressório. O apressório foi produzido ao final dos tubos germinativos, longos ou curtos. Ambos os tipos de tubos germinativos foram encontrados na mesma região da cutícula. A diferenciação da topografia da cutícula pode influenciar o desenvolvimento de *M. anisopliae* na cutícula. Isto foi observado por VESTERGAARD *et al.* (1999) em cutícula de *F. occidentalis*, onde somente um apressório foi produzido ao final de um curto tubo germinativo nas partes duras do corpo enquanto um longo tubo germinativo foi produzido em asas membranosas. BUTT *et al.* (1995) relataram semelhantes observações para *M. anisopliae* em cutícula de afídeos e ST LEGER *et al.* (1991) relataram que a topografia da superfície da cutícula de *M. sexta* afeta a formação do apressório. Desta forma, o apressório é produzido sobre o local de inserção de cerdas, após extenso crescimento da hifa sobre a superfície da

cutícula e, em superfícies planas, a formação do apressório é restrita ao conídio. Nós observamos essas diferenças no comprimento do tubo germinativo nas mesmas regiões da cutícula de *B. microplus* indicando que provavelmente outros fatores influenciam esta diferenciação.

*M. anisopliae* é bastante conhecido por infectar diferentes espécies de insetos, mas sua patogenicidade depende de vários fatores, incluindo o isolado do fungo e a espécie de artrópode. Pouco se conhece sobre seu mecanismo de infecção em carrapatos. Desta forma, o presente estudo descreve o processo de infecção do carrapato *B. microplus* pelo fungo *M. anisopliae*. Em muitos aspectos estas observações são consistentes com a seqüência de eventos comumente descrita que caracteriza outras interações de fungos entomopatogênicos (CLARKSON & CHARNLEY, 1996; ALVES, 1998). Entretanto, nossos resultados são novos em vários aspectos, principalmente no tempo de infecção, porque existem poucos estudos que descrevem o processo de infecção de *M. anisopliae* em *B. microplus* por MEV (BITTENCOURT *et al.*, 1999a) ou MET. Desta forma, ZACHARUK (1970a, b, c, d) realizou uma detalhada descrição ultraestrutural das estruturas envolvidas no processo de penetração do fungo *M. anisopliae* em cutícula de coleóptera, conseguindo caracterizar todos os estágios de desenvolvimento do fungo como conídio, tubo germinativo, apressório e hifa penetrante, pela presença de organelas e características citoplasmáticas. Características ultraestruturais similares às das estruturas relatadas por estes autores foram encontradas na superfície da cutícula de *B. microplus* a partir de 24 h de infecção, dentre estas, conídios em germinação, as células apressoriais descritas e corpos de hifas na procutícula. Levando-se em consideração os estudos por MEV e MET realizados, podemos sugerir que o processo de infecção de *B. microplus* por *M. anisopliae* envolveu os seguintes eventos: a) adesão dos conídios na cutícula do hospedeiro através de uma fina camada mucilaginosa após 24 h de inoculação; b) germinação do conídio e produção de tubo germinativo que coloniza a superfície da cutícula entre 24 a 48 h após a inoculação; c) penetração do tubo germinativo no interior da cutícula do carrapato, entre 24 a 48 h pós-inoculação; d) colonização da cutícula e emergência do fungo na superfície da cutícula, no período de 72 a 96 h pós-inoculação.

Os primeiros estudos com *M. anisopliae* infectando larvas de espécies da família Elateridae (McCAULEY *et al.*, 1968) relataram que a maioria dos conídios germinaram no período de 24 a 48 h após a inoculação. Outros estudos (GUNARSSON, 1988) revelaram que os conídios germinaram até 12 h pós-inoculação e que eles penetraram na epicutícula entre 12 a 18 h após a inoculação do fungo *M. anisopliae* em *Schistocerca gregaria*. Por outro lado, ST LEGER *et al.* (1996a; 1996b) relataram que conídios de *M. anisopliae* germinaram formando apressório e penetraram na cutícula de *M. sexta* cerca de 40 h pós-inoculação e VESTERGAARD *et al.* (1999), estudando a infecção de *F. occidentalis* por *M. anisopliae*, revelaram que os conídios germinaram no período de 24 h pós-inoculação, que a formação do apressório ocorreu cerca de 30 h após a inoculação e que a colonização foi observada após 72 h. Estas diferenças temporais fornecem evidências que a cutícula parece influenciar todos os estágios do processo de infecção e diferenças quantitativas e temporais na adesão e germinação são importantes para a determinação da patogenicidade.

A capacidade de *M. anisopliae* infectar ovos de insetos ou outros artrópodes é pouco estudada. Pela literatura, *M. anisopliae* é capaz de infectar ovos de percevejos (*Blissus antillus*) que atacam plantações de milho (SAMUELS *et al.*, 2002) e ovos de carrapatos, tais como *B. microplus* (BITTENCOURT *et al.*, 1994) e *R. sanguineus* (MONTEIRO *et al.*, 1998b). Em carrapatos, *M. anisopliae* pode diminuir a produção, taxa de eclosão e viabilidade dos ovos (GINDIN *et al.*, 2002). De acordo com SAMISH *et al.* (2001) ocorre redução na produção de ovos em cerca de 89% em fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* infectada com *M. anisopliae* quando comparada com controle. Por outro lado, BITTENCOURT *et al.* (1994) mostraram que o percentual médio de eclosão de ovos de *B. microplus* infectados *in vitro* com *M. anisopliae* é bastante menor (3,3 a 66%) do que o observado nos ovos controle (91,3 a 94%), sendo que o percentual de eclosão das larvas é inversamente proporcional à concentração de conídios utilizada. Do mesmo modo, KAAYA *et al.* (1996) relataram que a aspersão de suspensão de conídios de *M. anisopliae* em rebanho de gado infestados com *R. appendiculatus* causou redução na eclosão dos ovos e MONTEIRO *et al.* (1998b) observaram baixo percentual de eclosão das larvas em ovos tratados com suspensões de diferentes isolados de *M. anisopliae*, quando comparado com os ovos-controle.

Similarmente, nossos resultados mostraram que os ovos tratados com o isolado E6 de *M. anisopliae* não eclodiram em um período de 12-14 dias de incubação diferentemente dos ovos controle. Consistentemente com os resultados obtidos por SAMISH *et al.* (2001), as fêmeas infectadas diminuíram a taxa de postura, levando-se em consideração que a taxa de mortalidade deste isolado foi de aproximadamente 98% em 4 dias de infecção. O baixo índice de eficiência reprodutiva é de grande importância para o controle do carrapato, pois demonstra a possibilidade de redução da taxa de crescimento da sua população, inclusive quando aplicado em testes a campo (BITTENCOURT *et al.*, 1999b).

O processo de infecção do fungo na superfície dos ovos, observado por MEV, parece ser bastante similar ao observado na superfície da cutícula dos carrapatos e descrito previamente por BITTENCOURT *et al.* (1999a). Apesar da superfície dos ovos dos carrapatos ser recoberta por uma camada de secreção (BITTENCOURT, 2000), o que não acontece na cutícula e que poderia dificultar o processo de adesão ou penetração do fungo, houve penetração e desenvolvimento deste sobre a superfície dos ovos, com formação das estruturas de penetração, como tubo germinativo e apressório. Entretanto, diferentemente da penetração na cutícula do carrapato, o tempo necessário para o surgimento destas estruturas do fungo na superfície dos ovos foi bem superior ao observado na cutícula, sugerindo que estas estruturas sejam mais resistentes à ação de fungos entomopatogênicos ou que talvez, a camada de secreção de alguma forma retarde essa ação. De qualquer forma, a presença destas estruturas de penetração e o desenvolvimento do fungo na superfície dos ovos, associados à diminuição da eclosão dos ovos, indica que *M. anisopliae* é também patogênico para ovos de *B. microplus*. Indiscutivelmente, o grande potencial que *M. anisopliae* apresenta como agente de controle biológico de carrapatos é aumentado ainda mais devido a sua capacidade de infectar seus ovos e, portanto reduzir a capacidade de eclosão destes, diminuindo consecutivamente o número de larvas e adultos, visto que uma das maiores dificuldades do uso de inseticidas químicos está em alcançar os ovos, que normalmente são depositados no solo.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B. *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiróz, 1998.
- ALVES-BRANCO, F. P. J.; PINHEIRO, A. C.; SAPPER, M. F. M.; FRANCO, J. C. B. *Programas estratégicos e estratégico integrado para o controle das parasitoses em bovinos de corte no Rio Grande do Sul*. Bagé: EMBRAPA CPPSul, 2000. 32p. (EMBRAPA CPPSul. Documentos, n.25).
- ANDERSEN, S. O. Biochemistry of the insect cuticle. *Ann. Rev. Entomol.*, 24:29-61, 1979.
- ANSARI, M. A.; VESTERGAARD, S.; TIRRY, L.; MOENS, M. Selection of highly virulent fungal isolate, *Metarhizium anisopliae* CLO 53, for controlling *Hoplia philanthus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 85:89-96, 2004.
- ASKARY, H.; BENHAMOU, N.; BRODEU, J. Ultrastructural and citochemical characterization of aphid invasion by the hyphomycete *Verticillium lecanii*. *J. Invertebr. Pathol.*, 74:1-13, 1999.
- AZEVEDO, J. L. Controle microbiano de insetos praga e seu melhoramento genético. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (eds.) *Controle Biológico*. Jaguariúna: Embrapa, v. 1, p. 69-96, 1998.
- BALDINI, L. A.; SOUZA, R. V.; MIGUEL, A. G. *Farmacologia dos principais antiparasitários de uso na medicina veterinária*. Universidade Federal de Lavras, 1999.
- BATTA, Y. A. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Crop Protection*, 22:415-422, 2003.
- BAXTER, G. D.; GREEN, P.; STUTTGEN, M.; BARKER, S. C. Detecting resistance to organophosphates and carbamates in the cattle tick *Boophilus microplus*, with a propoxur-based biochemical test. *Exp. Appl. Acarol.*, 23:907-914, 1999.
- BIDOCHKA, M. J.; ST LEGER, R. J. Mechanisms of Deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *Mem. Entomol. Soc. Can.*, 171:213-224, 1997.
- BITTENCOURT, V. R. E. P. Controle Biológico de Carrapato. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (eds.) *Controle Biológico*. Jaguariúna: Embrapa, v. 2, p. 145-171, 2000.

- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASCARENHAS, A. G.; FACCINI, J. L. H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. *Ciência Rural*, 29:351-354, 1999a.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*. *Rev. Univ. Rural. Ser. Ciênc. Vida*, 16:41-47, 1994.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; SOUZA, E. J.; PERALVA, S. L. F. S.; REIS, R. C. S. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 em teste de campo com bovinos infestados por carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *R. Bras. Med. Vet.*, 21:78-82, 1999b.
- BOUE, O.; REDONDO, M.; MONTERO, C.; RODRIGUEZ, M.; FUENTE, J.; Reproductive and safety assessment of vaccination with GAVAC™ against the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Theriogenology*, 51:1547-1554, 1999.
- BRAGA, G. U. L.; DESTÉFANO, R. H. R.; MESSIAS, C. L. Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. *Rev. Microbiol.*, 30:107-113, 1999.
- BUTT, T. M.; IBRAHIM, L.; CLARK, S. J.; BECKETT, A. The germination behavior of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. *Mycol. Res.*, 99:945-950, 1995.
- BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. Introduction – Fungal biological control agents: progress, problems and potential. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (eds.) *Fungi as Biological Agents: Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing, p. 1-8, 2001.
- CASTRO, J. J.; NEWSON, R. M. Host resistance in cattle tick control. *Parasitol. Today*, 9:13-17, 1993.
- CLARKSON, J.; CHARNLEY, K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol.*, 4:197-203, 1996.
- CLARKSON, J.; SCREEN, S.; BAILEY, A.; COBB, B.; CHARNLEY, K. Fungal Pathogenesis in Insects. In: BRIDGE P.D., COUTEAUDIER Y., CLARKSON J.M. (Eds.) *Molecular Variability of Fungal Pathogens*. CAB International, p. 83-94, 1998.
- CORREIA, A. C. B.; FIORIN, A. C.; MONTEIRO, A. C.; VERÍSSIMO, C. J. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. *J. Invertebr. Pathol.*, 71:189-191, 1998.
- DAUST, R. A.; ROBERTS, D. W. Virulence of natural insect-passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 40:107-117, 1982.
- FORTES, E. *Parasitologia Veterinária*. Porto Alegre: Editora Sulina, 1987.



- 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*. *Vet. Parasitol.*, 94:117-125, 2000.
- FULONG, J.; PRATA, M. *Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. Instrução Técnica para o Produtor de Leite*. Juiz de Fora: EMBRAPA CNPGL, 2003. (EMBRAPA CNPGL. Boletim, n.34).
- GABRIEL, B. P. Histochemical study of insect cuticle infected by the fungus *Entomophthora coronata*. *J. Invertebr. Pathol.*, 11:82-89, 1968.
- GALLO, D. *Manual de entomologia agrícola*. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda, 1988.
- GINDIN, G.; SAMISH, M.; ZANGI, G.; MISHOUTCHENKO, A.; GLAZER, I. The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. *Exp. Appl. Acarol.*, 28:283-288, 2002.
- GOETTEL, M. S.; ST LEGER, R. J.; RIZZO, N. W.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, W. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca Sexta*) cuticle. *J. Gen. Microbiol.*, 135:2233-2239, 1989.
- GONZALES, J. C. *O controle do carrapato do boi*. Porto Alegre, 1993.
- GUNNARSSON S. G. S. Infection of *Schistocerca gregaria* by the fungus *Metarhizium anisopliae*: cellular reactions in the integument studied by scanning electron and light microscopy. *J. Invertebr. Pathol.*, 52:9-17, 1988.
- HACKMAN, R. H. Chemistry of the insect cuticle. In: ROCKSTEIN, M. (ed.) *The physiology of Insecta*. 2. ed. New York: Academic Press, p. 251-270, 1973.
- HACKMAN, R. H.; FILSHIE, B. K. The tick cuticle. In: OBENCHAIN, F. D.; GALUN, R. (eds) *Physiology of ticks*. Oxford: Pergamon Press, p.1-42, 1982.
- HADLEY, N. F. Cuticle ultrastructure with respect to the lipid waterproofing barrier. *J. Exp. Zool.*, 222:239-248, 1982.
- HEGEDUS, D. D.; KHACHATOURIANS, G. G. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotech. Adv.*, 13:455-490, 1995.
- INGLIS, G. D.; GOETTEL, M. S.; BUTT, T. M.; STRASSER, H. Use of Hyfomicetous fungi for managing insect pests. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (eds.) *Fungi as Biological Agents: Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing, p. 23-69, 2001.
- JONSSON, N. N.; MATSCHOSS, A. L.; PEPPER, P.; GREEN, P. E.; ALBRECHT, M. S.; HUNGERFORD, J.; ANSELL, J. Evaluation of TickGARD<sup>PLUS</sup>, a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. *Vet. Parasitol.*, 88:275-285, 2000.

- KAAYA, G. P.; HASSAN, S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Exp. Appl. Acarol.*, 24:913-926, 2000.
- KAAYA, G. P.; MUNYINYI, D. M. Biological potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. *J. Invertebr. Pathol.*, 66:237-241, 1995.
- KAAYA, G. P.; MWANGI, E. N.; OUNA, E. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Bauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 67:15-20, 1996.
- KASSA, A.; STEPHAN, D.; VIDAL, S.; ZIMMERMANN, G. Laboratory and field evaluation of different formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* submerged spores and aerial conidia for the control locusts and grasshoppers. *BioControl*, 49:63-81, 2004.
- KERSHAW, M. J.; MOORHOUSE, E. R.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S. E.; CHARNLEY, A. K. The role of destuxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *J. Invertebr. Pathol.*, 74:213-223, 1999.
- KIRKLAND, B. H.; CHO, E.; KEYHANI, N. O. Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidea) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control*, 31:414-421, 2004.
- KRIEGER DE MORAES, C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Curr. Microbiol.*, 46: 205-210, 2003.
- LACEY, C. M.; LACEY, L. A.; ROBERTS, D. R. Route of invasion and histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 52:108-118, 1988.
- LEAL, A. T.; FREITAS, D. R. J.; VAZ JR, I. S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. *Acta Sci. Vet.*, 31:1-11, 2003.
- LIMA, E. A. L. A. Aspectos taxonômicos e citológicos de Hyphomycetes (Deuteromycotina) entomopatogênicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84:17-20, 1989.
- LOPES, R. B.; ALVES, S. B.; TAMAI, M. A. Fungo *Metarhizium anisopliae* e o controle de *Frankliniella occidentalis* em alface hidropônico. *Sci. Agrícola*, 57:239-243, 2000.
- LÜBECK, I. Produção e purificação de  $\beta$ -1,3-glicanases em *Metarhizium anisopliae*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

- 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*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93:839-846, 1998.
- MARTINEZ, M. L.; SILVA, M. V. G. B.; MACHADO, M. A.; TEODORO, R. L.; VERNEQUE, R. S. A biologia molecular como aliada ao combate aos carrapatos. V Simpósio da sociedade de melhoramento animal. Pirassununga, 2004.
- MCCAULEY, V. J. E.; ZACHARUCK, R. Y.; TINLINE, R. D. Histopathology of green muscardine in larvae of four species of Elateridae (Coleoptera). *J. Invertebr. Pathol.*, 12:444-459, 1968.
- MELLO, B. Controle Biológico da cigarrinha da raiz da cana faz produtor economizar até R\$ 120/hectare. *Jornal O Estado de São Paulo*. São Paulo, 02 jun. 2004. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br.htm>> Acesso em 26 set. 2004.
- MENDES, M. C.; VERISSIMO, C. J.; KANETO, C. N.; PEREIRA, J. R. Bioassays for measuring the acaricides susceptibility of cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1987) in São Paulo state, Brazil. *Arq. Inst. Biol.*, 68:23-27, 2001.
- MESSIAS, C. L. Fungos, sua utilização para controle de insetos de importância médica e agrícola. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84:57-59, 1989.
- MILNER, R. J. Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. *Biocontrol News and Information*, 21:47N-50N. 2000.
- MILNER, R. J.; STAPLES, J. A.; LUTTON, G. G. The selection of an isolate of Hyphomycete fungus *Metarhizium anisopliae*, for control of termites in Australia. *Biological Control*, 11:240-247, 1998.
- MONTEIRO, A. C.; FIORIN, A. C.; CORREIA, A. C. B. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsh.) sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Rev. Microbiol.*, 29:109-112, 1998a.
- MONTEIRO, S. G.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DAEMON, E.; FACCINI, J. L. H. Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em ovos de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Ciência Rural*, 28:461-466. 1998b.
- NUNES, J. L.; PUGLIESE, M. E.; HAYES, R. P. *Boophilus microplus* Can Estudios parasitarios del ciclo biologico. *Rev. Med. Vet.*, 53 (1), 1972.
- ONOFRE, S. B.; MINIUK, C. M.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. *Am. J. Vet. Res.*, 62:1478-1480, 2001.

- PATERSON, I. C.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M.; CLARKSON, J. M. Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiol.*, 140:185-189, 1994.
- PEARSE, A.G. E. *Histochemistry: theoretical and applied*. 2. ed. London: J & A Churchill Ltda, 1961.
- PINTO, A. S.; BARRETO, C. C.; SCHRANK, A.; ULHOA, C. J.; VAINSTEIN, M. H. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogenic *Metarhizium anisopliae*. *Can. J. Microbiol.*, 43:322-327, 1997.
- REVISTA ANGUS. O difícil combate ao carrapato. Porto Alegre. n.12. 2004.
- RIBA, G.; KEITA, A.; SOARES JR, G. G.; FERRON, P. Comparative studies of *Metarhizium anisopliae* and *Tolypocladium cylindrosporum* as pathogens of mosquito larvae. *J. Amer. Mosquito Control Ass.*, 2:469-473, 1986.
- ROBERTS, D. W. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*: Isolation of destruxins from submerged cultures. *J. Invertebr. Pathol.*, 14:82-88, 1969.
- ROBERTS, D. W. World picture of biological control of insects by fungi. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84:89-100, 1989.
- ROMERO, T. Guerra Biológica contra as pragas. Fundação de Amparo de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo. São Paulo, 24 nov. 2003. Disponível em: <[http://www.agencia.fapesp.br/boletim\\_dentro.php?data\[id\\_materia\\_boletim\]=969.htm](http://www.agencia.fapesp.br/boletim_dentro.php?data[id_materia_boletim]=969.htm)> Acesso em 07 jan. 2005.
- SAMISH, M.; GINDIN, G.; ALEKSEEV, E.; GLAZER, I. Pathogenicity of entomopatogenic fungi to different developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *J. Parasitol.*, 87:1355-1359, 2001.
- SAMISH, M.; REHACEK, J. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annu. Rev. Entomol.*, 44:159-182, 1999.
- SAMUELS, R. I.; CORACINI, D. L. A.; MARTINS DOS SANTOS, C. A.; GAVA, C. A. T. Infection of *Blissus antillus* (Hemiptera: Lygaeidae) eggs by the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biological Control*, 23:269-273, 2002.
- SAMUELS, R. I.; PATERSON, I. C. Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol.*, 110B:661-669, 1995.
- SCHOLTE, E.; NJIRU, B. N.; SMALLEGANGE, R. C.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. J. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopatogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malar. J.*, 2:29-36, 2003.

- SCREEN, S. E.; HU, G.; ST LEGER, R. J. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *Anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *Acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca Sexta*. *J. Invertebr. Pathol.*, 78:260-266, 2001.
- SILVA, M. H.; SANTI, L.; STAATS, C. C.; COSTA, A. M.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. The cuticle-induced endo/exo acting-chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chit3* gene. *Res. Microbiol.*, in press.
- SOSA-GOMEZ, D. R.; BOUCIAS, D. G.; NATION, J. L. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipides and aldehydes. *J. Invertebr. Pathol.*, 69:31-39, 1997.
- SPURR, A. R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electromicroscopy. *Ultrastructure Res.*, 26:31-46, 1969.
- ST LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Production of cuticle-degrading enzymes by the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca Sexta*. *J. Gen. Microbiol.*, 133:1371-1382, 1987.
- ST LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 58:415-426, 2001.
- ST LEGER, R. J.; DURRANDS, P. K.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Role of extracellular chymioelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca Sexta*. *J. Invertebr. Pathol.*, 52:285-293, 1988.
- ST LEGER, R. J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. Penetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 58:168-179, 1991.
- ST LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; RIZZO, N. W.; ROBERTS, D. W. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca Sexta*) cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:907-912, 1996a.
- ST LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; RIZZO, N. W.; ROBERTS, D. W. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:1257-1264, 1996b.
- ST LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:6349-6354, 1996c.

- ST LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *J. Invertebr. Pathol.*, 47:295-302, 1986a.
- ST LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture cuticle. *J. Invertebr. Pathol.*, 48:85-95, 1986b.
- ST LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. *J. Invertebr. Pathol.*, 47:167-177, 1986c.
- TIAGO, P. V.; FUNGARO, M. H. P.; FURLANETO, M. C. Cuticle-degrading proteases from the entomopathogen *Metarhizium flavoviride* and their distribution in secreted and intracellular fractions. *Let. Appl. Microbiol.*, 34:91-94, 2002.
- VESTERGAARD, S.; BUTT, T. M.; BRESCIANI, J.; GILLESPIE, T. A.; EILENBERG, J. Light and electron microscopy studies of the infection of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 73:25-33, 1999.
- VILLARINO, M. A.; WAGNER, G. G.; GEORGE, J. E.; In vitro detection of acaricide resistance in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.*, 28:265-271, 2002.
- VINCENT, J. F. V.; WEGST, U. G. K. Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Structure and Development*, 33:187-199, 2004.
- WANG, C.; SKRABEK, A.; BUTT, T. M. Investigations of the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 85:168-174, 2004.
- WIGGLESWORTH V. B. *The Principles of Insect Physiology*. London: Chapman and Hall, 1972.
- WRAIGHT, S. P.; JACKSON, M. A.; KOCK, S. L. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (eds) *Fungi as biocontrol agents: Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing, p. 253-287, 2001.
- ZACHARUK R. Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). I. Dormant and germinant conidia. *J. Invertebr. Pathol.*, 15:63-80, 1970a.
- ZACHARUK R. Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). II. Conidial germ tubes and appressoria. *J. Invertebr. Pathol.*, 15:81-91, 1970b.

- ZACHARUK R. Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). III. Penetration of host integument. *J. Invertebr. Pathol.*, 15:372-396, 1970c.
- ZACHARUK R. Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). IV. Developmente within the host. *Can. J. Microbiol.*, 17:525-529, 1970d.
- ZHIOUA, E.; BROWNING, M.; JOHNSON, P. W.; GINSBERG, H. S.; LEBRUM, R. A. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari:Ixodidae). *J. Parasitol.*, 83:815-818, 1997.

## APÊNDICE

Alinhamento das seqüências obtidas da região ITS1-5.8S-ITS2 dos isolados de *Metarhizium* analisados

flavotypeEAF139855	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	T--AC--AA	CTCCCAAACC	CCCAATGTGA	ACATATACCT	55
flavonovazealandicumAF139853	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	T--AC--AA	CTCCCAAACC	CC--TGTGA	ACTTATACCT	52
albumAF137067	1	GGAGGGATCA	TTATCGAGTT	T--ACTTCAA	CTCCCAAACC	CCCT--TGTGA	ACGTATACCT	57
C7	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--TATACCT	51
C12	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--TATACCT	51
C19	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--TATACCT	51
CG27	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--TATACCT	51
CG320	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--TATACCT	51
CG374	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--TATACCT	51
var.majusAF137061	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--TATACCT	51
C11	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--TATACCT	51
CG343	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--TATACCT	51
RJd	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
NORDESTE	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
E9	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
E6	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
MT	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
M5	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
AL	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
var.anisoAY387579	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
CG291	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
CG144	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
CG125	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
CG97	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
CG87	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
CG47	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
CG46	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
CG33	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
CG31	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
CG491	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
CG423	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
CG30	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
C14	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	---ATCCAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AT--CATACCT	51
flavoflavovirideAY387582	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	T---ACAAAA	CTCCCAAACC	CC--TGTGA	AC--TATACCT	53
var.acridumAF516324	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	T---ACAAAA	CTCCCAAACC	CC--TGTGA	AC--TATACCT	53
var.lepidiotumAF137066	1	GGAGGGATCA	TTATCGAGTT	GTTAATAAAAA	CTCCCAA--CC	CC--TGTGA	AC--TATACCT	55
flavominusAF138272	1	GGAGGGATCA	TTATCGAGTT	TA-TTTTCAA	CTCCCAAACC	CCC--TGTGA	ACTTATACCT	57
flavopemphigumAF139850	1	GGAGGGATCA	TTACCGAGTT	T----ACAA	CTCCCAAACC	CAA--TGTGA	ACT--ATACCT	52
Clustal Consensus	1	*****	*** *****	** ***** *	*****	*****	*****	43



```

flavotypeEAF139855      55  -TT-ACCGTT  GCTTCGGCGG  GCTCGCCCC  GGGAGCAGGC  TCGCCTGCC  C--CCCGAG  111
flavonovazealandicumAF139853  52  -T--ACTGTT  GCTTCGGCGG  GTCCG--CC  CGGAACAGGT  TCGCGAGAG  CGGCCCGGA  107
albumAF137067          57  -TT-CCAGTT  GCTTCGGCGG  GTATAGCCCC  GGGGTCAGGT  TCGCAAGAG  CTGCCCGGA  115
C7                      51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
C12                     51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
C19                     51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
CG27                    51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
CG320                   51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
CG374                   51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
var.majusAF137061      51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
C11                     51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
CG343                   51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
RJd                     51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
NORDESTE               51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
E9                      51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
E6                      51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
MT                      51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
M5                      51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
AL                      51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
var.anisoAY387579      51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
CG291                   51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
CG144                   51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
CG125                   51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
CG97                    51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
CG87                    51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
CG47                    51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
CG46                    51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
CG33                    51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
CG31                    51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
CG491                   51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
CG423                   51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
CG30                    51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
C14                     51  -TTAATGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  72
flavoflavovirideAY387582  53  -GTCACTGTT  GCTTCGGCGG  TACCG----  -----  -ACCCCCCG  GAAACCGGA  96
var.acridumAF516324     53  -GTCACTGTT  GCTTCGGCGG  TACCG----  -----  -ACCCCCCG  GAAACCGGA  96
var.lepidiotumAF137066  55  -GTAACTGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----GA  76
flavominusAF138272     58  GTCTACCGTT  GCCTCGGCGG  -----  -----  -----  -----  77
flavopemphigumAF139850  53  GTCTACCGTT  GCTTCGGCGG  -----  -----  -----  -----  72
Clustal Consensus      43  ***  **  *****  55

```

```

flavotypeEAF139855      112  CCTG-CGCCC  GCCGGGGGAC  TAAAACA-AA  CTCTTCTGTA  TCT-TGTATA  ATAA----G  163
flavonovazealandicumAF139853  108  CCAGCGCCCCC  GCCGGGGGAC  CAAAAC----  ---TCTTGTA  TTT-TTACT  TTT----G  153
albumAF137067          116  CCAGCGCCCCT  GCCGGGGGAC  CAAAAC----  ---TCTTGTA  TTTCTCTACG  ATAA----GG  164
C7                      73  CTTCGCGCCC  GCCGGGGACC  CAA-----  ACCTTCTGAA  TTT-TTTA--  ATAA----GT  118
C12                     73  CTTCGCGCCC  GCCGGGGACC  CAA-----  ACCTTCTGAA  TTT-TTTA--  ATAA----GT  118
C19                     73  CTTCGCGCCC  GCCGGGGACC  CAA-----  ACCTTCTGAA  TTT-TTTA--  ATAA----GT  118

```

CG27	73	CTTCGCGCTC	GCCGGGGACC	CAA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GG	118
CG320	73	CTTCGCGCTC	GCCGGGGACC	CAA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GG	118
CG374	73	CTTCGCGCTC	GCCGGGGACC	CAA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GG	118
var.majusAF137061	73	CTTCGCGCTC	GCCGGGGACC	CAA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GG	118
C11	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CAA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
CG343	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CAA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
RJd	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
NORDESTE	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
E9	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
E6	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
MT	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
M5	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
AL	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
var.anisoAY387579	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
CG291	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
CG144	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
CG125	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
CG97	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
CG87	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
CG47	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
CG46	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
CG33	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
CG31	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
CG491	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
CG423	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
CG30	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CGA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
C14	73	CTTCGCGCCC	GCCGGGGACC	CAA-----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTA--	ATAA----	GT	118
flavoflavovirideAY387582	97	GCAGGCGCCC	GCCGGGGATC	CTAGTA----	ACAATCTGAA	TCT-TCTAT-	ATAATATGCG	150	
var.acridumAF516324	97	GCAGGCGCCC	GCCGGGGATC	CTAGTA----	ACAATCTGAA	TCT-TCTAT-	ATAATATGCG	150	
var.lepidiotumAF137066	77	CTTCGCGCCC	GCCGGGGGAC	CCA--A----	ACCTTCTGAA	TTT-TTTAT-	TTTA---ACT	125	
flavominusAF138272	77	--GCTCGCCC	GCCGCGGGAC	CGACAAACAA	AACTCTTGTA	TTT--CTATC	TTTG-----G	128	
flavopemphigumAF139850	72	--GTTGCGCCC	GCCGAGGGAC	CGACAAATAA	A-CTCTTGTA	TTT--CTATC	TTTA-----G	122	
Clustal Consensus	55	***	**** *	*	*	***	**	*	75

flavotypeEAF139855	164	CCTGCTCTGAG	TGGT--ATT-	TAA--AATGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	218
flavonovazealandicumAF139853	154	CATGCTCTGAG	TGGA--ATCA	TAACAAATGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	211
albumAF137067	165	AATGCTCTGAG	TGGTTATAG	AAGAAAAATGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	224
C7	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA---ATGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	174
C12	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA---ATGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	174
C19	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA---ATGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	174
CG27	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AAA--AATGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	176
CG320	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AAA--AATGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	176
CG374	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AAA--AATGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	176
var.majusAF137061	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AAA--AATGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	176
C11	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
CG343	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
RJd	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173

NORDESTE	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
E9	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
E6	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
MT	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
M5	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
AL	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
var.anisoAY387579	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
CG291	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
CG144	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
CG125	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
CG97	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
CG87	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
CG47	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
CG46	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
CG33	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
CG31	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
CG491	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
CG423	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
CG30	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	173
C14	119	ATCTTCTGAG	TGGTTAAAAA	AAA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	174
flavoflavovirideAY387582	151	ATCTTCTGAG	TGGTGGGAAA	AAA---ATGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	207
var.acridumAF516324	151	ATCTTCTGAG	TGGTGGGAAA	AAA---ATGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	207
var.lepidiotumAF137066	126	ATCTTCTGAG	TGGTAAACAA	AA-----TGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	180
flavominusAF138272	129	CATGCTCTGAG	TGGAATCACA	CAT-AAATGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	187
flavopemphigumAF139850	123	CATGCTCTGAG	TGGAATCATA	AAC-AAATGA	ATCAAAACTT	TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	181
Clustal Consensus	75	*****	***	*	***	*****	*****	118
<hr/>								
flavotypeEAF139855	219	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	278
flavonovazealandicumAF139853	212	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	271
albumAF137067	225	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	284
C7	175	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	234
C12	175	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	234
C19	175	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	234
CG27	177	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	236
CG320	177	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	236
CG374	177	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	236
var.majusAF137061	177	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	236
C11	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
CG343	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
RJd	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
NORDESTE	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
E9	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
E6	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
MT	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
M5	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
AL	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
var.anisoAY387579	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233

CG291	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
CG144	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
CG125	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
CG97	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
CG87	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
CG47	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
CG46	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
CG33	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
CG31	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
CG491	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
CG423	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
CG30	174	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	233
C14	175	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	234
flavoflavovirideAY387582	208	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	267
var.acridumAF516324	208	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	267
var.lepidiotumAF137066	181	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	240
flavominusAF138272	188	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	247
flavopemphigumAF139850	182	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCGAAATG	CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTCAGT	241
Clustal Consensus	119	*****	*****	*****	*****	*****	*****	178

flavotypeEAF139855	279	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGCAGTA	CTCTGECGGG	CATGCCTGTT	338
flavonovazealandicumAF139853	272	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGCAGTA	CTCTGECGGG	CATGCCTGTT	331
albumAF137067	285	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGCTAGTA	TTCTACCGGG	CATGCCTGTT	344
C7	235	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	294
C12	235	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGECGGG	CATGCCTGTT	294
C19	235	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGECGGG	CATGCCTGTT	294
CG27	237	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	296
CG320	237	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	296
CG374	237	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGECGGG	CATGCCTGTT	296
var.majusAF137061	237	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	296
C11	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	293
CG343	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	293
RJd	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGECGGG	CATGCCTGTT	293
NORDESTE	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	293
E9	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	293
E6	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	293
MT	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGECGGG	CATGCCTGTT	293
M5	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	293
AL	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	293
var.anisoAY387579	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	293
CG291	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGECGGG	CATGCCTGTT	293
CG144	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	293
CG125	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	293
CG97	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGECGGG	CATGCCTGTT	293
CG87	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGECGGG	CATGCCTGTT	293
CG47	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	293
CG46	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCGTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	293

CG33	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	293
CG31	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	293
CG491	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	293
CG423	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	293
CG30	234	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	293
C14	235	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	294
flavoflavovirideAY387582	268	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	327
var.acridumAF516324	268	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	327
var.lepidiotumAF137066	241	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	300
flavominusAF138272	248	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	307
flavopemphigumAF139850	242	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCTCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	301
Clustal Consensus	179	*****	*****	*****	****	***	*** *****	*****

flavotypeEAF139855	339	CGAGCGTCAT	TTCAA-CCCT	CAAGCCC	-GGC-	-----GCTT	GGTGTGGGG	383
flavonovazealandicumAF139853	332	CGAGCGTCAT	TTCAA-CCCT	CAAGCCC	-AGC-	-----GCTT	GGTGTGGGG	376
albumAF137067	345	CGAGCGTCAT	TTCAA-CCCT	CAAGCCC	-GGC-	-----GTTT	GGTGTGGGG	389
C7	295	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	341
C12	295	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	341
C19	295	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	341
CG27	297	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	343
CG320	297	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	343
CG374	297	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	343
var.majusAF137061	297	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	343
C11	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
CG343	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
RJd	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
NORDESTE	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
E9	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
E6	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
MT	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
M5	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
AL	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
var.anisoAY387579	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
CG291	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
CG144	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
CG125	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
CG97	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
CG87	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
CG47	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
CG46	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
CG33	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
CG31	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
CG491	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
CG423	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
CG30	294	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	340
C14	295	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGTCCCCT	-GTGG-	-----ACTT	GGTGTGGGG	341
flavoflavovirideAY387582	328	CGAGCGTCAT	TACGC-CCCT	CAAGCCCCT	-GTGG-	-----GTTT	GGTGTGGGG	374

```

var.acridumAF516324      328 CGAGCGTCAT TACGC CCCT CAAGCCCCCT -GTGG----- -----GTTT GGTGTTGGGG 374
var.lepidiotumAF137066  301 CGAGCGTCAT TACGC CCCT CAAGCCCCC CGTGG----- -----ACTT GGTGTTGGGG 348
flavominusAF138272     308 CGAGCGTCAT TACAA CCCT CAAGCCCCC CCGCACGGG AACCGGGCTT GGTGTTGGGG 366
flavopemphigumAF139850 302 CGAGCGTCAT TACAAGCCCT CAAGCCCCC CGGC----- -----TT GGTGTTGGGG 347
Clustal Consensus      234 ***** * * **** * * * * ** ***** 268

```

```

flavotypeEAF139855      384 ACCGGCGAC- GCGCTG--- -----CTC CGGCAT-GCG CGC-----GC CGCCCCGAA 426
flavonovazealandicumAF139853 377 ACCGGCGACC GCGCTG--- -----CTT CGGCAG-GCC CGC-----GC CGCCCCGAA 420
albumAF137067           390 GCCGGCGAT- GGTGTTGGGG GCGATCTCTT CGTCCCCGG CGC-----GC CGCCCCGAA 443
C7                       342 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTCAA 379
C12                      342 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTCAA 379
C19                      342 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTCAA 379
CG27                    344 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 381
CG320                   344 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 381
CG374                   344 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 381
var.majusAF137061      344 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 381
C11                     341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
CG343                   341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
RJd                     341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
NORDESTE                341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
E9                      341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
E6                      341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
MT                      341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
M5                      341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
AL                      341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
var.anisoAY387579      341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
CG291                   341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
CG144                   341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
CG125                   341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
CG97                    341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
CG87                    341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
CG47                    341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
CG46                    341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
CG33                    341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
CG31                    341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
CG491                   341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
CG423                   341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
CG30                    341 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 378
C14                     342 ATCGGCGA-- -G-GCTGG-- -----TT TTCCA-GCA CA-----GC CGTCCCTTAA 379
flavoflavovirideAY387582 375 ATCGGCGA-- -A-GCT--- -----TT TTCCA-GCA CGC-----GC CGTCCCTTAA 411
var.acridumAF516324    375 ATCGGCGA-- -A-GCT--- -----TT TTCCA-GCA CGC-----GC CGTCCCTTAA 410
var.lepidiotumAF137066 349 ATCGGCGA-- -GCGCTGT--- -----CT TTCCA-GCA CG-----C CGTCCCTTAA 386
flavominusAF138272     367 ACCGGCGACC GGTGCCTG- ----CTGCTC CTGGGCAGG CGC--CCGCG CGCCCCGAA 419
flavopemphigumAF139850 348 ACCGGCGACC GGTGCCTG- ----CTGCTT C-GGGCAGG CGCGCCCGCG CGCCCCGAA 401
Clustal Consensus      268 **** * * * * * * * * * * 284

```

flavotypeEAF139855	427	ATGAATTGGC	GGTCTCGTCG	CGGCCTC--C	CCTGCGTAGT	ACCACAA---	--CCTCGCAG	479	
flavonovazealandicumAF139853	421	ATGAATTGGC	GGTCTCGTCG	CGGCCTC--C	TCTGCGTAGT	AGCACAA---	--CCTCGCAA	473	
albumAF137067	444	ATGAATTG-C	GGCCTCGCCG	CGGCCTC--C	TCTGCGTAGT	AACATGTTGC	CCCTCGCAA	500	
C7	380	ATCAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	434	
C12	380	ATCAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	434	
C19	380	ATCAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	434	
CG27	382	ATTCAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	436	
CG320	382	ATTCAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	436	
CG374	382	ATTCAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	436	
var.majusAF137061	382	ATTCAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	436	
C11	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
CG343	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
RJd	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
NORDESTE	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
E9	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
E6	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
MT	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
M5	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
AL	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
var.anisoAY387579	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
CG291	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
CG144	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
CG125	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
CG97	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
CG87	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
CG47	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
CG46	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
CG33	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
CG31	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
CG491	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
CG423	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
CG30	379	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	433	
C14	380	ATTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAG---	-CACTCGCAA	434	
flavoflavovirideAY387582	412	ATTTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCTTCC	TCTGCGCAGT	AGTAACT---	-CACTCGCAA	467	
var.acridumAF516324	411	ATTTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCTTCC	TCTGCGCAGT	AGTAACT---	-CACTCGCAA	466	
var.lepidiotumAF137066	387	ATTTAATTGGC	GGTCTCGCCG	TGGCCCT-CC	TCTGCGCAGT	AGTAAAA---	-CACTCGCAA	441	
flavominusAF138272	420	ATGAATTGGC	GGCCCGTTCG	CGGCCTC-CC	TCTGCGCAGT	AGCACATG--	--TCTCGCAG	474	
flavopemphigumAF139850	402	ATGAATTGGC	GGCCCGTTCG	CGGCCTC-CC	TCTGCGTAGT	AGCACACA--	--TCTCGCAG	456	
Clustal Consensus	285	**	****	* ** * ** *	****	*	***** ** *	****	318

flavotypeEAF139855	480	CGGGAGCGCG	GCGCG-CCA	CTGCCGTAAA	ACACCCCAAC	T---TCTCCA	A-GAGTTGAC	534
flavonovazealandicumAF139853	474	CAGGAGCGCG	GCGCG-CCA	CTGCCGTAAA	ACGCC-AAC	T---TTTTT	A-GAGTTGAC	527
albumAF137067	501	CAGGAGCCCG	GCGCG-CCA	CTGCCGTAAA	AACCACCAAC	T---TTTTT	ACAAGTTGAC	556
C7	435	CAGGAGCCCG	GCGCGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCAAC	-----TTTTT	A-TAGTTGAC	488
C12	435	CAGGAGCCCG	GCGCGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCAAC	-----TTTTT	A-TAGTTGAC	488
C19	435	CAGGAGCCCG	GCGCGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCAAC	-----TTTTT	A-TAGTTGAC	488
CG27	437	CAGGAGCCCG	GCGCGTCCA	CTGCCGTAAA	ACACCCAAC	-----TTTTT	A-TAGTTGAC	490

CG320	437	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACACCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	490
CG374	437	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACACCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	490
var. majusAF137061	437	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACACCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	490
C11	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
CG343	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
RJd	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
NORDESTE	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
E9	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
E6	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
MT	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
M5	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
AL	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
var. anisoAY387579	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
CG291	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
CG144	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
CG125	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
CG97	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
CG87	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
CG47	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
CG46	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
CG33	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
CG31	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
CG491	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
CG423	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
CG30	434	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	487
C14	435	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	-----	TTTTT	A-	TAGTTGAC	488
flavoflavovirideAY387582	468	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	CAACT	TTGTT	A-	CAGTTGAC	526
var. acridumAF516324	467	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCCCAAC	CAACT	TTGTT	A-	CAGTTGAC	525
var. lepidiotumAF137066	442	CAGGAGCCCG	GCGCGGTCCA	CTGCCGTAAA	ACCCCAAC	-----	TTTTT	A-	CAGTTGAC	494
flavominusAF138272	475	CTGGAGCCCG	GCGCGG-CCA	CTGCCGTAAA	ACGCAACAAC	TTTC-	TTCTT	T-	TAGTTGAC	531
flavopemphigumAF139850	457	CTGGAGCCCG	GCGCGG-CCA	CTGCCGTAAA	ACGCAACAAC	TTT-	TTTTT	A-	CAGTTGAC	512
Clustal Consensus	319	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	*	* * * * *			356

flavotypeEAF139855	535	CTCGAATCAG	GTAGGAAT	552
flavonovazealandicumAF139853	528	CTCGAATCAG	GTAGGAAT	545
albumAF137067	557	CTCGAATCAG	GTAGGAAT	574
C7	489	CTCGAATCAG	GTAGGACT	506
C12	489	CTCGAATCAG	GTAGGACT	506
C19	489	CTCGAATCAG	GTAGGACT	506
CG27	491	CTCGAATCAG	GTAGGACT	508
CG320	491	CTCGAATCAG	GTAGGACT	508
CG374	491	CTCGAATCAG	GTAGGACT	508
var. majusAF137061	491	CTCGAATCAG	GTAGGACT	508
C11	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
CG343	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
RJd	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
NORDESTE	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505



E9	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
E6	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
MT	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
M5	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
AL	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
var.anisoAY387579	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
CG291	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
CG144	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
CG125	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
CG97	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
CG87	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
CG47	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
CG46	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
CG33	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
CG31	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
CG491	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
CG423	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
CG30	488	CTCGAATCAG	GTAGGACT	505
C14	489	CTCGAATCAG	GTAGGACT	506
flavoflavovirideAY387582	527	CTCGAATCAG	GTAGGACT	544
var.acridumAF516324	526	CTCGAATCAG	GTAGGACT	543
var.lepidiotumAF137066	495	CTCGAATCAG	GTAGGACT	512
flavominusAF138272	532	CTCGAATCAG	GTAGGAAT	549
flavopemphigumAF139850	513	CTCGAATCAG	GTAGGAAT	530
Clustal Consensus	357	*****	***** *	373

