

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

ELIANDRA DE FREITAS SIA

ISOLADOS ENDOFÍTICOS E ENTOMOPATOGÊNICOS DE

***Beauveria*: CARACTERIZAÇÃO E IMPORTÂNCIA**

BIOTECNOLÓGICA

Dissertação apresentada à Universidade de Mogi das Cruzes para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Ciências Biológicas.

Prof. Orientador: Dr. João Lúcio de Azevedo

**Mogi das Cruzes, SP
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

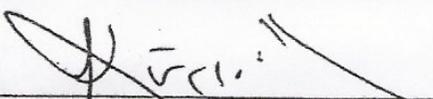
Às dez horas do dia vinte e nove de maio de dois mil e seis, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Isolados endofíticos e entomopatogênicos de *Beauveria*: caracterização e importância biotecnológica" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Eliandra de Freitas Sia**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 48 (quarenta e oito), a saber: 24 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores João Lúcio de Azevedo e Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner da Universidade de Mogi das Cruzes, e Cristina Sayuri Maki da Universidade de São Paulo, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou a candidata. Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADO por UNANIMIDADE
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

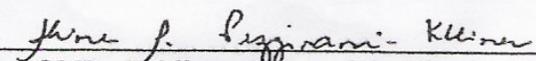
Mogi das Cruzes, 29 de maio de 2006

Comissão Examinadora

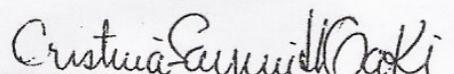
Julgamento


Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

APROVADO
(aprovado(a)/reprovado(a))


Prof.^a Dr.^a Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

APROVADA
(aprovado(a)/reprovado(a))


Prof.^a Dr.^a Cristina Sayuri Maki

APROVADO
(aprovado(a)/reprovado(a))

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Sia, Eliandra de Freitas

Isolados endofíticos e entomopatogênicos de
Beauveria : caracterização e importância biotecnológica /
Eliandra de Freitas Sia. – 2006.

64 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -
Universidade de Mogi das Cruzes, 2006.

Área de concentração: Ciências biológicas

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

1. Fungos endofíticos 2. Fungos entomopatogênicos
3. *Beauveria* 4. RAPD 5. *Diatrea saccharalis* 6.
Controle biológico I. Título II. Azevedo, João Lúcio de

CDD 632.96

AGRADECIMENTOS

- A Deus por me dar saúde, paciência e equilíbrio para superar este e outros tantos desafios;
- Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pela orientação e estímulo constante;
- Ao Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo pela amizade, competência e contribuição, sem o que este trabalho não seria possível;
- A minha mãe, Carmelinda de F. Sia pela sua determinação, coragem e sabedoria;
- Ao meu pai, Olívio Bento Sia pelo apoio incondicional;
- À Juliana Aparecida Sia, Lívio César de Freitas Sia e Arlam Lopes Borges pelo constante incentivo e companheirismo;
- À minhas amigas, Taís Soares e Gilmara Cavalcante da Silva pelo estímulo e carinho, com que acompanharam e aqueceram este percurso;
- À Universidade de Mogi das Cruzes e aos professores do curso de mestrado em Biotecnologia pela minha formação acadêmica;
- Ao Rodrigo M. Stuart pelo auxílio no decorrer dos experimentos;
- À colega Maria Cecília Piola Brandt pelas palavras amigas nos momentos tão necessários e a todos do Núcleo Integrado de Biotecnologia;
- A todos os colegas do Laboratório de Genética de Microrganismo da ESALQ e em especial a Joelma Marconi, Maria Carolina Quecine, José Antônio da Silva, Cristina Maki, Rodrigo Mendes e Fernanda Souza pela companhia e auxílio prestados no laboratório.

Obrigada a todos.

RESUMO

O gênero *Beauveria*, formado por fungos mitosporicos pertencentes à ordem Moniliales é utilizado mundialmente no controle de insetos pragas. Dentro deste gênero destaca-se a espécie *Beauveria bassiana* utilizada no controle biológico de diferentes insetos, bem como encontrada endofiticamente em plantas, entre elas o milho. Recentemente, estudos mostraram que isolados endofíticos de milho identificados como sendo do gênero *Beauveria* podem pertencer a outras espécies do gênero, ainda não encontradas no interior de plantas. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo a caracterização destes isolados em comparação com outros isolados de *B. bassiana*. Foram também estudadas nestes isolados, outras propriedades de valor biotecnológico relacionadas ao controle de insetos tais como características morfológicas que podem estar implicadas com aumento da eficiência no ataque de insetos e análise da variabilidade genética utilizando a técnica RAPD e seqüenciamento do rDNA. Analisando os isolados endofíticos e entomopatogênicos de *Beauveria*, verificou-se que o isolado endofítico B157 distingue-se significativamente dos demais, avaliados quanto ao tamanho dos esporos, número de esporos produzidos e capacidade de controlar larvas de *Diatraea saccharalis*. A análise de variabilidade genética por RAPD mostrou a existência de 5 haplótipos, sendo que o isolado B157 possivelmente não pertence a espécie *B. bassiana*, assemelhando-se mais a *B. amorpha*, podendo mesmo pertencer a uma espécie de *Beauveria* ainda não identificada. Dos seis isolados endofíticos e entomopatogênicos usados, cinco deles foram eficientes em bioensaios mostrando potencial no controle de larvas de *Diatraea saccharalis*.

Palavras-chave: Fungos endofíticos e entomopatogênicos; *Beauveria*; *Beauveria amorpha* RAPD; *Diatraea saccharalis*; Controle biológico.

ABSTRACT

Beauveria is a mitosporic fungus belonging to the order Moniliales. It is largely used to control agriculture insect pests. From the genus *Beauveria* the most used species is *Beauveria bassiana* employed to control different insect-pests species and also found as endophyte in plants as in maize. Recently studies have shown that endophytic isolates, identified as *Beauveria* may belong to other species of the same genus not yet found as endophytes. The present work was carried out to characterize endophytic isolates and to compare them to entomopathogenic *Beauveria bassiana* isolates obtained from insects. Other properties of biotechnological value related to the control of insects were also studied as morphological characteristics which may be related to efficiency to the insect control. Genetic variability using techniques as RAPD and sequencing of rDNA were also employed. It was found that the endophytic isolate B157 was significantly distinct from the other isolates used, in relation to conidial size, number of produced conidia and capacity to control larvae of *Diatraea saccharalis*. The analysis of genetic variability via RAPD showed the existence of 5 haplotypes allowing distinction between endophytic and entomopathogenic isolates. It was found that isolate B157 probably do not belong to *B. bassiana* species being more similar to *B. amorpha* or may be an unidentified species of *Beauveria*. Bioassay studies showed that five of the six isolates used were effective against *Diatraea saccharalis* larvae and are of potential interest in biocontrol of this agricultural pest.

Keywords: Endophytic fungi; entomopathogenic fungi; *Beauveria*; *Beauveria amorpha*; *Diatraea saccharalis*; RAPD; Biological control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ciclo das relações patógeno – hospedeiro	18
Figura 2	Microscopia Eletrônica de Varredura das linhagens utilizadas de <i>Beauveria</i>	37
Figura 3	Coeficiente de circunferência dos conídios de <i>Beauveria</i> spp. calculados pela relação comprimento/largura, cujas medidas foram obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. (Teste de Tukey. Nível < 0,05).....	38
Figura 4	Influência dos meios de cultura sobre o crescimento de seis linhagens de <i>Beauveria</i> no período de 3 a 18 dias em Meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e Meio Completo (MC)	40
Figura 5	Diâmetro de colônias de <i>Beauveria</i> crescidas em meio BDA no período de 3-18 dias	41
Figura 6	Diâmetro de colônias de <i>Beauveria</i> crescidas em MC no período de 3-18 dias	41
Figura 7	Avaliação do peso micelial em BD. Mesmas letras indicam não haver diferenças estatisticamente significativas (Teste de Tukey. Nível <= 0,05)	42
Figura 8	Avaliação do peso micelial em MC líquido. Mesmas letras indicam não haver diferenças estatisticamente significativas (Teste de Tukey. Nível <= 0,05)	43
Figura 9	Número de esporos de isolados de <i>Beauveria</i> em meio BDA. O log ₁₀ é do número de esporos e as mesmas letras indicam não haver diferenças estatisticamente significativas (Teste Tukey. Nível <= 0,05)	44
Figura 10	Número de esporos de isolados de <i>Beauveria</i> em MC. O log ₁₀ é do número de esporos e as mesmas letras indicam não haver diferenças estatisticamente significativas (Teste Tukey. Nível <= 0,05)	45
Figura 11	Avaliação da patogenicidade de <i>Beauveria</i> em larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> . Letras iguais indicam não haver diferenças estatisticamente significantes. Teste de Tukey. Nível <= 0,05 (Resultado de 5 repetições)	47

Figura 12	Análise da curva de patogenicidade de <i>Beauveria</i> em larvas de <i>D. saccharalis</i>	58
Figura 13	Análise do RAPD, gel de eletroforese mostrando padrões de RAPD obtidos dos isolados de <i>Beauveria</i> usando o <i>primer</i> X04. M-marcador <i>Ladder</i> 1 KB	50
Figura 14	Dendrograma construído com análise molecular RAPD dos isolados de <i>Beauveria</i>	51
Figura 15	Dendrograma construído com análise das seqüências de rDNA (ITS1 + 5.8s + ITS2) dos isolados de <i>Beauveria</i>	52

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	Isolados de <i>Beauveria</i> cedidos para o presente trabalho.....	28
Tabela 2	Tamanho dos conídios em μm (comprimento e largura) de <i>B. bassiana</i> e <i>B. amorpha</i> , descritos na literatura e encontrados no presente trabalho.....	36
Tabela 3	Influência do Meio de cultura, sobre o crescimento de seis linhagens de <i>Beauveria</i> , no período de 3 a 18 dias, em estufa a 28° C.....	39
Tabela 4	Suspensão e Viabilidade dos conídios de <i>Beauveria</i>	47

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism)
BD	Batata-Dextrose
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
CENARGEN	Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESALQ	Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
ISSR	Inter single sequence repeats (seqüências repetidas internas simples)
ITS	Internal transcribed sequences (seqüências internas transcritas)
LrRNA	Sub-unidade maior (L) do RNA ribossômico
MC	Meio Completo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Microscopia Óptica
NAP/MEPA	Núcleo de apoio à pesquisa/Microscopia eletrônica na agropecuária
NTSYS	Taxonomia numérica e sistema de análise multivariante (Numerical taxonomy and multivariant analysis system)
NIB	Núcleo Integrado de Biotecnologia
PCR	Reação de Cadeia de Polimerase(Polimerase chain reaction)
pH	Potencial hidrogeniônico
RAPD	Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

rDNA	DNA Ribossomal
RFLP	Polimorfismo de comprimento por enzimas de restrição (Random fragment length polymorphism)
RNA	Ácido Ribonucléico
SrRNA	Sub-unidade menor(S) do RNA ribossômico
Taq DNA	DNA polymerase de <i>Thermus aquaticus</i>
tRNA	RNA de transferência
UPGMA	Unweighted pair-group method using arithmetic average
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 O Gênero <i>Beauveria</i>	13
1.2 O Controle Biológico e o Gênero <i>Beauveria</i> como Entomopatogênico	14
1.3 <i>Beauveria</i> como Endófito.....	19
1.4 Diversidade Genética de <i>Beauveria</i>	20
1.5 <i>Diatraea saccharalis</i>	24
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Isolados Fúngicos e Condições de Cultivos	28
3.2 Caracterização Morfológica	29
3.3 Avaliação de Patogenicidade	31
3.4 Caracterização e Análise da Variabilidade Genética de Isolados de <i>Beauveria</i> por RAPD e Sequenciamento de Regiões ITS do rDNA	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Identificação e Caracterização dos Isolados	35
4.2 Patogenicidade de <i>Beauveria</i> em larvas de <i>Diatraea saccharalis</i>	45
4.3 Análise da Variabilidade Genética de <i>Beauveria</i>	48
5 CONCLUSÕES	53
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

Há aproximadamente 150 anos, foi observado que os fungos podiam causar doenças em insetos. Agostino Bassi demonstrou em um experimento em 1834, a natureza da infecção com o fungo *Beauveria bassiana*; na tentativa de controlar os danos causados por doenças em insetos comercialmente importantes, como o bicho-da-seda, *Bombix mori* (Lepidóptera: Bombycidae). Dentro deste contexto, os fungos constituem o maior grupo de organismos entomopatogênicos, visto que cerca de 750 espécies já foram identificadas como causadoras de doenças em insetos, tanto aquáticos como terrestres, em regiões tropicais, subtropicais, temperadas e até no deserto. Dentre os fungos descritos como entomopatogênicos, estão os mitospóricos pertencentes a morfodivisão Deuteromycetes, incluindo-se dentre eles, os gêneros *Aschersonia*, *Beauveria*, *Culicinomyces*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Tolypocladium* e *Verticillium*. No Brasil, os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem relatados, sendo provável que a maioria dos 85 gêneros de fungos entomopatogênicos até hoje descritos ocorra no Brasil, embora somente 20 deles tenham sido constatados atacando insetos de importância agrícola em nosso país.

Fungos entomopatogênicos economicamente importantes na agricultura estão sendo estudados e usados com sucesso no controle de pragas. Dentre eles, destaca-se a espécie *Beauveria bassiana*, um fungo mitospórico pertencente à ordem Moniliales, bastante conhecido e utilizado mundialmente no controle de insetos pragas, bem como encontrado endofiticamente em plantas como o milho. Recentemente formas endofíticas de *Beauveria* foram encontradas em plantas de milho no Brasil e há indicações de que alguns dos isolados podem pertencer a uma espécie distinta da *B. bassiana*, que é a mais utilizada no controle biológico de insetos. A finalidade do presente trabalho foi analisar por técnicas clássicas e moleculares, isolados

endofíticos e entomopatogênicos de *Beauveria*, com relação às suas características morfológicas, relacionadas à sua eficiência no controle de insetos e variabilidade genética, verificando possíveis distinções entre os isolados endofíticos e entomopatogênicos, a nível de espécie.

1.1 O Gênero *Beauveria*

Com base em Alexopoulos e Mins (1979), que adotaram o Reino Fungi proposto por Whittaker (1969), a espécie *Beauveria bassiana* é um Deuteromiceto pertencente à ordem Moniliales. Este gênero foi primeiramente descrito por Beauverie em 1911 e Vuillemin em 1912 e se caracteriza por apresentar micélio branco ou levemente corado, hifas hialinas, finas e septadas, e conidióforos únicos, irregularmente agrupados ou em cachos verticulados (MCLEOD, 1954) reproduzindo-se de forma vegetativa, via conídios e segmentos hifais. Desde a sua classificação, este gênero tem sido sujeito a uma considerável investigação taxonômica. Após revisão do gênero por De Hoog (1972), detectou-se a existência de duas espécies: *B. bassiana* e *B. brongniartii* (*B. tenella*), as quais se diferenciam entre si quanto ao formato dos conídios. De acordo com McLeod (1954), os conídios de *B. brongniartii* são elipsoidais ao contrário dos conídios de *B. bassiana* que são globosos quando cultivados em meio sólido. Em meio líquido aerado ou na hemolínfa dos insetos, os conídios assumem formas elipsoidais, semelhantes a estruturas leveduriformes que são conhecidas pelo nome de blastósporos (FERRON, 1978).

Estudos posteriores baseados em aspectos morfológicos e bioquímicos, identificaram pelo menos seis espécies deste gênero: *B. bassiana*, *B. alba*, *B. amorpha*, *B. brongniartii*, *B. velata* e *B. vermiconia* (MUGNAI et al., 1989). No mesmo ano, Bissett e Widden (1989) descreveram uma sétima espécie chamada de *B. caledonica*. St. Leger et al. (1992 a)

demonstraram que duas destas espécies, *B. bronginiartii* e *B. vermiconia* além de outra espécie morfológicamente semelhante classificada como *Tolypocladium cylindrosporum*, são geneticamente distintas umas das outras. Segundo estes autores, *B. caledonica* seria uma rara linhagem diplóide de *B. bassiana*. Recentemente, Li et al. (2001) descreveram *Cordyceps bassiana* como sendo a fase sexual de *B. bassiana*, embora poucos estudos confirmem estes dados. Portanto, o gênero *Beauveria* é ainda pouco estudado do ponto de vista taxonômico e, especialmente a introdução de novas técnicas de análise molecular poderão lançar novas luzes para elucidar pontos controversos, auxiliando na classificação de espécies do gênero.

1.2 O Controle Biológico e o Gênero *Beauveria* como Entomopatógeno

1.2.1 O Controle Biológico

No início dos anos 70 do século passado, aumentou a preocupação com as condições ambientais e com a saúde pública em relação aos problemas causados pelos agroquímicos, especialmente nos países mais desenvolvidos. Foi também observado um contínuo desenvolvimento de resistência dos insetos a inseticidas (GEORGHIU e MELLON, 1983).

Os cultivos vegetais em larga escala são habitats ideais para reprodução e alimentação de um amplo espectro de espécies de insetos. Entretanto, muitos são os fatores que contribuem para um controle natural destes insetos, entre eles, o clima não propício e o grande número de espécies de inimigos naturais, especialmente microrganismos. Apesar destes fatores atuarem no controle natural, muito insetos se tornam pragas; pois estes inimigos naturais e doenças muitas vezes atuam tardiamente sobre insetos, não evitando danos econômicos ou até a morte das plantas atacadas. Tudo isso reforça a necessidade de adoção de um manejo mais racional na

agricultura e dentre as práticas preconizadas, destaca-se a utilização do controle biológico (ROBBS e BILTENCOURT, 1998; ALVES et al., 2001).

O controle biológico baseia-se no manejo integrado, com a utilização de métodos harmoniosos de diferentes técnicas, em consonância com princípios ecológicos, econômicos e sociais com o objetivo de manter os organismos-pragas abaixo do nível de dano econômico (VENDRAMIN, 2002). Muitos autores vêm estudando processos naturais de doenças em insetos, isolando e selecionando linhagens eficientes de microrganismos patogênicos para desenvolver sistemas de produção e formulação de inóculos a fim de serem aplicados em campo. O desenvolvimento da tecnologia dos bioinseticidas microbianos resultou em sucesso comercial e a aceitação entre os produtores em diversas culturas.

Devido a grande biodiversidade microbiana no Brasil, o controle biológico de pragas é um amplo campo a ser investigado, havendo um grande número de espécies ainda desconhecidas e adaptadas a novas condições ambientais que podem apresentar potencial para uso no controle das principais pragas das culturas brasileiras. No controle biológico são utilizados microrganismos como: protozoários, fungos, bactérias, vírus, nematóides, rickétsias e micoplasmas. Dentre estes agentes biológicos de controle de insetos, os fungos são patógenos de largo espectro, capazes de atacar insetos fitófagos, aquáticos e pragas do solo, além de infectarem diferentes estágios de desenvolvimento do hospedeiro e ter grande versatilidade (ALVES, 1998).

Os fungos entomopatogênicos são os organismos mais estudados e apresentam grande potencial para o controle de pragas (FERRON, 1978). A ocorrência de fungos entomopatogênicos em condições naturais, tanto enzootica como epizooticamente, tem sido importante na redução das populações de pragas em agroecossistemas. A grande variabilidade genética desses fungos entomopatogênicos pode ser considerada uma das principais vantagens no

controle de insetos, onde cerca de 80% das doenças de insetos têm como agentes etiológicos fungos (ALVES, 1998).

1.2.2 *Beauveria* como Fungo Entomopatogênico

A dinâmica das doenças de insetos, sua distribuição e intensidade de ocorrência receberam maior atenção nas últimas décadas (FUXA e TANADA, 1987; ALVES, 1998; MELO e AZEVEDO, 2000). Este fato provavelmente deve-se ao sucesso de alguns programas de controle biológico e ao efeito de patógenos que provocam epizotias, como as espécies de fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, entre outras (PEDIGO et al., 1953; ALVES, 1998; MELO e AZEVEDO, 2000).

Segundo Smith e Grula (1981) a simplicidade de exigências nutricionais de *B. bassiana*, onde o necessário para o crescimento micelial é uma fonte de nitrogênio e sua germinação requerer apenas uma fonte simples utilizável de carbono, possibilitou o emprego desta espécie em experimentos laboratoriais, uma vez que ela pode crescer facilmente nos mais diferentes ambientes naturais ou artificiais (SCHAERFFENDERG, 1964; SAMSINAKOVA, 1966; AOKI e CHIOUSA, 1968; AOKI e YANASE, 1970; KUCERA, 1971). Fatores como pH do meio, umidade relativa, temperatura e luz podem também interferir na germinação de esporos e sobrevivência de *B. bassiana*. A temperatura ótima para o crescimento desta espécie está entre 20 e 25 graus (FERRON, 1981) ou 20 a 30 graus (FARGUES et al., 1992), apesar de poder suportar temperaturas de até 45 graus (ALVES, 1998).

Diferentes de agentes entomopatogênicos, como vírus e bactérias, os fungos não precisam necessariamente ser ingerido pelos seus hospedeiros para serem infectivos. Dessa forma, estes

microrganismos são capazes de penetrar no corpo do inseto através da cutícula e desenvolverem-se no seu interior, provocando a morte (figura 1). Para tanto, os fungos liberam na superfície do organismo alvo, enzimas como quitinases e esterases, entre outras, que auxiliam na penetração por meio do tegumento do inseto. Neste caso, para que a penetração ocorra, o conídio deve germinar na superfície do inseto, onde os nutrientes presentes podem acelerar o processo de infecção, estimulando a formação do tubo germinativo, embora ácidos graxos saturados, tais como ácido caprílico, quando presentes na superfície do inseto possam inibir a germinação dos conídios de *B. bassiana* (SMITH e GRULA, 1982). O processo de infecção acontece em qualquer parte da cutícula do inseto e a penetração dos tubos germinativos é efetuada cerca de 16 horas após o contato entre patógeno e hospedeiro (PEKRUL e GRULA, 1979). Foram observadas por Vey e Fargues (1977), estruturas semelhantes a apressórios durante a infecção de *B. bassiana* em *Leptinotarsa decemlineata*. Essas estruturas também foram observadas, *in vitro*, em *M. anisopliae* (ST. LEGER et al., 1992b).

Durante o processo de infecção, *B. bassiana* produz metabólitos ativos que destroem o balanço fisiológico normal do hospedeiro (SHARMA et al., 1994), podendo interromper o processo de metamorfose, levando também à morte do inseto (MAZET et al., 1994). Foram observadas por Cheung e Gula (1982), alterações histopatológicas nos tecidos intestinais de larvas de *Heliothis zea* infectadas com *Beauveria*. Estas alterações foram induzidas provavelmente por toxinas secretadas pelo fungo. Estes autores observaram uma forte correlação entre a atividade proteolítica extracelular do fungo e a sua virulência.

Segundo Hung e Boucias (1992), a infecção pode ocorrer também por meio de blastósporos. Posteriormente, Hung et al. (1993) observaram que a presença de *Beauveria* em larvas de *Spodoptera exigua* impede o desencadeamento de respostas de defesa. Por outro lado, tal impedimento não interfere em respostas antibacterianas, como, por exemplo, a biossíntese de

lisoizima (BOUCIAS et al., 1994) e, tampouco a infecção de *Spodoptera exigua* por *B. bassiana* não estimula tal síntese.

Por infectar uma ampla classe de insetos e ser comum na natureza (MCCOY et al., 1988; CASTRILLO et al., 2003) este fungo tem sido usado em todo o mundo, isoladamente ou associado a outros fungos, como inseticida microbiano no controle de pragas da agricultura (HAJEK e EASTBURN, 2001; RAO et al., 2006).

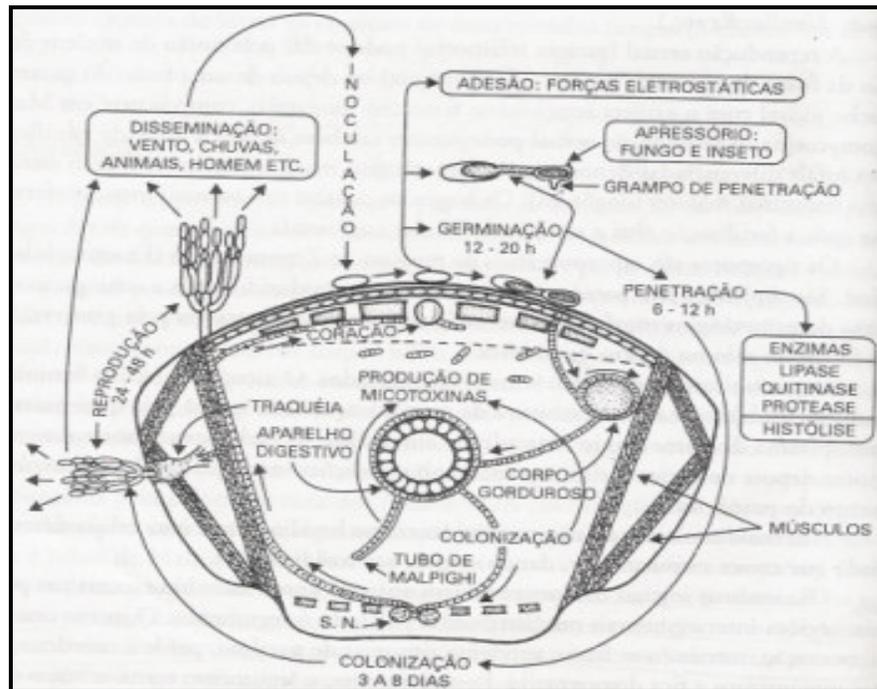


Figura 1. Ciclo das relações patógeno – hospedeiro segundo Alves, 1998.

1.3 *Beauveria* como Endófito

O termo endófito foi inicialmente utilizado por Bary em 1866 e aplicado aos microrganismos que vivem no interior de tecidos vegetais, encontrados colonizando órgãos e tecidos como folhas, ramos e raízes sem causar danos aparentes à planta hospedeira, bem como apresentando uma estreita relação mutualística entre eles. Eles são encontrados em todas as espécies vegetais analisadas até o momento (AZEVEDO et al., 2000; ARAÚJO et al., 2001; AZEVEDO et al., 2002; AZEVEDO et al., 2003; COSTA, 2001; FERNANDES et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002a; ARAÚJO et al., 2002b; BALDANI et al., 2002; COUTINHO et al., 2002; ADACHI et al., 2002; BEATTIE e SABARATNAM, 2003; TRIPLETT et al., 2003; KUKLINSKY et al., 2005; PIMENTEL, 2001).

O estudo de fungos endofíticos tem sido importante para se conhecer a base biológica da interação endófito-hospedeiro. Estes fungos são potencialmente vantajosos para a produção de metabólitos secundários de interesse farmacológico (STIERLE et al., 1993; PEIXOTO-NETO et al., 2002), como vetores genéticos para a introdução de genes de interesse, tais como: genes de resistência a pragas em plantas hospedeiras (MURRAY et al., 1992), para o controle biológico de doenças, entre outras características (AZEVEDO, et al., 2000; AZEVEDO e ARAÚJO, 2003).

Bactérias e fungos endofíticos foram isolados do interior de plantas do milho (*Zea mays* L.) (McLNROY e KLOEPPER, 1995; ARAÚJO et al., 2000; PAMPHILE e AZEVEDO, 2002; PIMENTEL, 2001) e em alguns casos, a presença do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* foi detectada (BING e LEWIS, 1993; PIMENTEL 2001). Infectando uma grande variedade de insetos e sendo comum na natureza, *B. bassiana* é utilizada como bioinseticida controlador de insetos pragas na agricultura (McCOY et al., 1988; CASTRILLO et al., 2003; HAJEK et al., 2001). Dessa forma, a utilização de isolados endofíticos é importante, pois eles

habitam um nicho ecológico semelhante ao ocupado por fitopatógenos, podendo assim controlá-los por meio de competição por nutrientes, produção de substância antagônica, parasitando o patógeno ou mesmo induzindo a planta a desenvolver resistência. Além disso, podem colonizar a planta e posteriormente parasitar o inseto praga que tentar se alimentar da planta hospedeira.

1.4 Diversidade Genética de *Beauveria*

É comum encontrar entre as várias espécies de fungos entomopatogênicos uma grande variabilidade natural. As espécies portadoras de tal variabilidade podem ser distinguidas geneticamente por meio de diferenças nos padrões enzimáticos ou no comportamento reprodutivo, mesmo que elas sejam morfologicamente muito próximas (St. LEGER et al., 1992b). Esta variabilidade é devida a várias causas como mutação e recombinação. Em *B. bassiana* existe um processo de recombinação por meio de parassexualidade denominado de parameiose descrito pela primeira vez por Paccola-Meirelles e Azevedo (1991).

A avaliação da variabilidade genética de Deuteromicetos é uma questão muito importante. São várias as características de fungos possíveis de serem empregadas em estudos visando a caracterização genética de uma espécie. Entre elas, podem ser citadas a germinação, tipo de crescimento, conidiação, número de núcleos, produção de enzimas exógenas, resistência a agentes físicos e químicos. Tais características, além de úteis na avaliação da variabilidade, contribuem na condução de programas de melhoramento genético de fungos biocontroladores.

As técnicas moleculares têm também contribuído na exploração da variabilidade genética destes microrganismos. Estas técnicas compreendem desde a separação eletroforética de isoenzimas até as técnicas de RFLP, RAPD e AFLP. Segundo Boucias et al. (1982) a ampla

variabilidade natural possibilita um aumento da capacidade adaptativa das linhagens a flutuações bióticas e abióticas do ambiente. Provavelmente, este polimorfismo genético permita à *Beauveria bassiana* parasitar uma ampla diversidade de insetos.

Analisando a variabilidade natural de *B. bassiana*, quanto à produção de conídios em diferentes meios de culturas, sensibilidade ao benomil, produção de isoenzimas e perfis eletroforéticos para esterases, Paccola Meirelles e Azevedo (1990) concluíram que esta espécie apresenta grande variabilidade para todos os parâmetros avaliados. Estudando o perfil eletroforético para isoenzimas de 146 isolados do gênero *Beauveria*, foram observadas 47 classes genotípicas diferentes, sugerindo que a variabilidade genética potencial pode ser expressa em populações naturais (St. LEGER et al., 1992a). Em estudo posterior, Neuvéglise et al., (1994) também detectaram polimorfismos isoenzimáticos em *Beauveria*, enquanto que, por meio da técnica de RFLP de dois genes ribossomais, os autores conseguiram separar as linhagens estudadas em 7 grupos distintos.

Outros autores, estudando perfis para esterases observaram alguma homogeneidade entre isolados de hospedeiros relacionados e de mesma área geográfica (RIBA et al., 1986; POPRAWISKI et al., 1988; TIGANO e RIBA, 1990; St.LEGER et al., 1992 a). Tal fato pode ser resultado de uma forte pressão de seleção ou por parte do inseto hospedeiro ou do ambiente, sugerindo a existência de uma estreita correlação entre o tipo de hospedeiro, a distribuição geográfica e o perfil eletroforético do entomopatógeno.

O genoma de *Beauveria bassiana* é bastante variado, apresentando 5 a 8 cromossomos, com tamanho estimado de 26,5 a 44,1 Mb, como foi observado por meio de cariótipo eletroforético (PFEIFER e KACHATOURIANS, 1993; VIAUD et al., 1996; SHI, 2000; SHI e XU, 2000).

Além da importância na taxonomia, a biologia molecular pode ser bastante útil em estudos genéticos. Rakotonirainy et al. (1991), comparando por meio do seqüenciamento o rRNA de várias linhagens de *Tolypocladium cylindrosporum*, *T. extinguens* e *B. bassiana*, observou uma clara separação entre estes dois gêneros e apontou que provavelmente, *T. cylindrosporum* e *T. extinguens* não pertençam ao mesmo gênero.

Kosir et al. (1991) analisaram por meio de RFLP do DNA genômico duas linhagens de *B. bassiana*: uma mais virulenta (selvagem) e um mutante menos virulento. Este último apresentou um padrão de comprimento de fragmentos de restrição diferentes da linhagem mais virulenta. Tais resultados indicaram que as diferenças observadas entre as linhagens incluíram a perda de alguma seqüência de DNA; a qual deve estar envolvida na patogenicidade. Hegedus et al. (1991) clonaram e seqüenciaram cinco genes mitocondriais em *B. bassiana*, que codificam tRNAs. Esses genes encontram-se agrupados e apresentam uma alta porcentagem de homologia (64 a 67%) com genes equivalentes de outras espécies de fungos filamentosos. Além disso, os autores observaram que o código genético mitocondrial desta espécie é semelhante ao de outro fungo, onde o códon UGA é usado como um sinal para o aminoácido triptofano ao invés de funcionar como um códon de término.

Em outra análise, Hegedus e Khachatourians (1993a) utilizaram cinco sondas mitocondriais oriundas de uma linhagem de *B. bassiana*, para estudar a variabilidade do genoma mitocondrial deste e de outros fungos entomopatogênicos. Hibridizações realizadas com sondas múltiplas presentes simultaneamente produziram padrões únicos, os quais separaram o grupo *B. bassiana* de todos os outros fungos testados. Também, Hegedus e Khachatourians (1993b) desenvolveram quatro sondas a partir de fragmentos de *B. bassiana*, as quais não hibridizaram com o DNA de outras espécies de fungos filamentosos, incluindo duas espécies do mesmo gênero. Tais sondas são derivadas de DNA moderadamente repetitivo e produziram padrões de

hibridização distintos em todas as linhagens de *B. bassiana* testadas, demonstrando a grande eficiência de tal metodologia na identificação e caracterização desta espécie.

Por meio do uso conjunto de várias técnicas moleculares, como digestão com enzimas de restrição, hibridização com sondas de DNA e comparações de seqüências de DNA, Pfeifer et al. (1993) constituíram um detalhado mapa dos sítios de clivagem de sete enzimas de restrição para o genoma mitocondrial de *B. bassiana*. Os experimentos de hibridização com sondas derivadas de outro fungo, revelaram a localização de dois genes que codificam SrRNA (sub-unidade menor do rRNA) e LrRNA (sub-unidade maior do rRNA). Tais genes são altamente conservados no genoma mitocondrial de fungos filamentosos.

Neuvéglise et al., (1994) examinaram as variações dentro do gene que codifica o rRNA em 28 linhagens de *B. brongniartii* e 2 linhagens de *B. bassiana*. Os autores utilizaram para estas análises, as técnicas de PCR e RFLP. Os resultados obtidos por estes autores revelaram um alto grau de polimorfismo dentro da espécie *B. brongniartii* e permitiram a separação das linhagens estudadas em 7 grupos distintos, bem como a estimativa das distâncias genéticas entre estes grupos. De modo geral, os estudos sobre a biologia molecular de *Beauveria* têm contribuído bastante para o entendimento sobre os mecanismos genéticos envolvidos nesta espécie.

Mais recentemente várias metodologias de biologia molecular vêm sendo usadas nas pesquisas sobre variabilidade em *Beauveria*. Wang et al., (2005) utilizaram marcadores ISSR (*inter-single sequence repeats*) para análise da variabilidade genética de 39 isolados de *Beauveria* spp. provenientes de distintos hospedeiros e de diferentes áreas geográficas. A técnica foi bastante útil na distinção das 4 espécies de *Beauveria* estudadas *B. bassiana*, *B. brongniarii*, *B. velata* e *B. amorpha*. Fernandes et al., (2006) usaram também em espécies de *Beauveria*, a técnica de RAPD juntamente com análise morfológica para caracterizar 50 isolados provenientes do artrópode *Boophilus microplus*, detectando 23 perfís eletroforéticos.

1.5 *Diatraea saccharalis*

A broca da cana-de-açúcar, *D.saccharalis*, é um inseto lepidóptero que apresenta desenvolvimento holometabólico, ou seja, passa pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto. Seus ovos são depositados freqüentemente nas folhas ainda verdes, tanto na face superior como inferior do limbo foliar e ocasionalmente, na bainha. Esta broca tem formato oval, com ovos achatados, sendo depositados em grupos de forma imbricada, onde um ovo cobre 2/3 ou a metade do que vem logo a seguir. Essa massa de ovos de número bastante variável, em média de 12 (LIMA FILHO e LIMA, 2001), pode chegar a algumas dezenas e se assemelha a escama de peixe ou couro de cobra. A duração dessa fase é bastante variável em função, principalmente, da temperatura, sendo nas condições brasileiras, de uma a duas semanas.

Após a eclosão, a lagarta migra para a região do cartucho da planta à procura de abrigo, permanecendo ali por um período que varia de uma a duas semanas, alimentando-se pela raspagem da folha da cana ou da casca do entrenó em formação. Durante essa fase o inseto passa por uma ou duas ecdises, quando então inicia a perfuração da casca do colmo. Geralmente, essa perfuração ocorre próximo a base do entrenó, porção mais mole, abrindo galeria no sentido ascendente na região do palmito da planta. Em certas situações, por razões ainda desconhecidas, a lagarta se alimenta abrindo uma galeria de forma circular, enfraquecendo com isso o entrenó que pode se quebrar, principalmente, pela ação do vento.

Normalmente, quando o ataque se dá próximo à região de crescimento da planta, ocorre a morte da gema apical, sendo o sintoma facilmente reconhecido pelo amarelecimento das folhas mais novas, denominado “coração morto” ou “olho morto”.

A lagarta, uma vez tendo penetrado no colmo da cana, passa toda essa fase ali protegida, mas em alguns casos, principalmente pela inundação de sua galeria por água da chuva,

ao sentir-se “molestada”, abre um orifício na casca e sai, vindo a abrir outro buraco em um entrenó mais abaixo, onde torna a penetrar.

Durante o período larval, o inseto sofre um número variável de ecdises, freqüentemente seis. A duração dessa fase é a mais longa das quatro pelas quais ele passa em sua vida, sendo em média de 70 dias, nas condições do estado de São Paulo.

A lagarta de *D. saccharalis* apresenta coloração branco-leitosa, com cápsulas cefálicas marrom-escuro e pequenas manchas de cor marrom-claro, distribuídas ao longo de todo o corpo. Possuem três pares de pernas torácicas, quatro pares de falsas pernas abdominais e um par de falsas pernas anais. Quando completamente desenvolvida, mede cerca de 25 mm.

Próximo à pupação, a lagarta abre um orifício na casca e o fecha parcialmente com fios de seda e restos de sua alimentação e assim protegida, passa a fase de pupa, esta fase dura cerca de dez dias, quando emerge o adulto.

A cana-de-açúcar sofre o ataque dessa praga durante todo o seu desenvolvimento. Sua incidência é menor quando a cana é jovem e não apresenta entrenós formados, aumentando os danos com o crescimento da planta. Esse comportamento, entretanto, pode variar em função da época do ano e da variedade, principalmente.

Na fase larval, *D. saccharalis* pode causar danos diretos e indiretos. Os danos diretos decorrem da alimentação do inseto e caracterizam-se por perda de peso (pela abertura de galerias no entrenó), morte da gema apical da planta (“coração morto”), encurtamento do entrenó, quebra da cana, enraizamento aéreo e germinação das gemas laterais. Esses danos ocorrem isoladamente ou associados, o que pode agravar os prejuízos.

Os danos indiretos são causados por microrganismos que invadem o entrenó através do orifício aberto na casca pela lagarta. Esses microrganismos, predominantemente fungos, entre eles o *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum*, invertem a sacarose armazenada na

planta, provocando perdas pelo consumo de energia no metabolismo de inversão e pelo fato de os açúcares resultantes desse desdobramento (glicose e levulose) não se cristalizarem no processo industrial. Entretanto, quando a matéria-prima se destina à produção de álcool, o problema não é menos grave, pois os microrganismos que penetram no entrenó aberto contaminam o caldo e concorrem com as leveduras na fermentação alcoólica. Nessa concorrência há uma redução na eficiência de produção de álcool, gerando prejuízos (ALMEIDA et al., 1997). Uma vez que esta praga causa severos danos à cultura canavieira, processos de controle tais como o uso de fungos entomopatogênicos, entre eles a *B. bassiana*, podem ser bons candidatos neste controle.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar por técnicas clássicas e moleculares isolados entomopatogênicos e endofíticos do fungo *Beauveria* e avaliar algumas características dos isolados que sejam de importância no controle de pragas.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar os isolados endofíticos e entomopatogênicos de *Beauveria* por meio de Microscopia Óptica (MO);
- Avaliar as possíveis diferenças entre as espécies endofíticas e entomopatogênicas de *Beauveria* quanto ao tamanho dos esporos por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Comparar a influência de dois meios de cultura (Batata-Dextrose-Ágar e Meio Completo) sobre o crescimento e esporulação destes isolados endofíticos e entomopatogênicos de *Beauveria*;
- Caracterizar os isolados endofíticos e entomopatogênicos de *Beauveria* pela técnica molecular RAPD e de seqüenciamento do rDNA;
- Avaliar a capacidade de isolados endofíticos e entomopatogênicos de *Beauveria* em atacar e controlar larvas de *Diatraea saccharalis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética de Microrganismos, Depto de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP.

3.1 Isolados Fúngicos e Condições de Cultivos

Foram utilizados os isolados endofíticos e entomopatogênicos de *Beauveria* (tabela 1), os quais foram gentilmente cedidos pela Dra. Ida Chapaval Pimentel (Universidade Federal do Paraná, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Curitiba, PR: isolados B95, B157 e E3 e CENARGEN , EMBRAPA,(Brasília): Isolados CG. Para os ensaios, os isolados fúngicos foram cultivados em placa de Petri contendo meio BDA e mantidos a 28°C.

Tabela 1: Isolados de *Beauveria* cedidos para o presente trabalho

Isolados	Características	Origem
B157	Endofítico	Milho (Pimentel, 2001)
B95	Endofítico	Milho (Pimentel, 2001)
CG62	Entomopatogênico	Inseto (<i>Diabrotica sp.</i>)
CG82	Entomopatogênico	Inseto (<i>Diabrotica sp.</i>)
CG165	Entomopatogênico	Inseto (<i>Lacraia vilosa</i>)
E3	Entomopatogênico	Inseto (<i>Anthonomous grandis</i>)

3.2 Caracterização Morfológica

3.2.1 Microscopia Óptica

A identificação foi feita com base na morfologia dos fungos utilizando chaves de identificação descritas por Barnett e Hunter (1998). Para a identificação foi utilizada a técnica de Micro-cultivo descrita por Brazolin (1997), na qual um pequeno bloco de meio de cultura BDA foi colocado sobre uma lâmina de vidro esterilizada, inoculado com esporos do fungo e coberta com uma lamínula de vidro. Este conjunto foi transferido para uma placa de Petri contendo papel-filtro umidecido com água esterilizada e incubado a 28°C e 70% de umidade relativa por cerca de 14 dias. Após este período o meio de cultura foi retirado da lâmina para análises microscópicas. Essas lâminas foram observadas a fresco e coradas com azul de algodão. As lâminas coradas foram vedadas com esmalte para a observação do material.

3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura foram utilizadas lamínulas de 2 cm, fixadas em solução Karnovsky modificada (2,5% glutaraldeído; 0,001M Ca Cl₂; 2,5% paraformaldeído em tampão cacodilato 0,5M, pH 7,2) por duas horas e realizada infiltração com glicerol 30% por 30 min para crioproteção. Os fragmentos foram mergulhados em N₂ líquido, fragmentados com o auxílio de pinça e bisturi e tratados com uma solução de tetróxido de ósmio 1-2% em tampão cacodilato por 2 horas. Em seguida as amostras foram lavadas três vezes por 10 min. com água para retirada do excesso de ósmio e desidratadas em uma série de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). Os materiais foram secos ao ponto crítico (CPD 30, Balzers), montado sobre os

“stub” e cobertos com ouro no metalizador (MED 010, Balzers) para serem observadas por MEV (LEO, NAP/MEPA, ESALQ/USP).

3.2.3 Análise do Efeito do Meio de Cultura sobre *Beauveria*

3.2.3.1 Efeito sobre o Crescimento Radial

Fragmentos de 8mm de diâmetro das colônias dos isolados de *Beauveria* com 10 dias em meio de cultura BDA (200g de Batata; 20g de Dextrose; 15g de Ágar em 1 litro de Água destilada, pH - 6. 8) e Meio Completo (0,01g de FeSO₄; 0,50g KCL; 1,50g de KH₂PO₄; 0,50 de MgSO₄.7H₂O; 6,0g de NaNO₃; 0,01g de ZnSO₄; 1,50g de Caseína hidrolizada; 0,50g de Extrato de levedura; 10,0g de Glicose; 2,0g de Peptona; 1,0ml Solução de ácidos nucleicos de levedura; 1,0ml de Solução de vitaminas; 15,00g de Ágar; 1000ml de Água destilada (Pontecorvo et al, 1953, modificado por Azevedo e Costa, 1973), foram inoculados no centro de placas de Petri contendo meios BDA ou MC e incubados a temperatura de 28° C. Foram efetuadas três repetições e a avaliação do crescimento radial foi avaliado após 3, 6, 9, 12, 15 e 18 dias.

3.2.3.2 Efeito sobre o Peso Seco

Três discos (8mm) da colônia fúngica foram retirados das bordas de colônias com aproximadamente 10 dias de crescimento e inoculados em frascos contendo 50 ml de meio de cultura BD (Batata Dextrose) ou MC líquido. Os micélios foram retirados após 6 dias, colocados em estufa de secagem a 60° C e avaliados após 4 dias, quando alcançaram peso constante.

3.2.3.3 Efeito sobre a Esporulação de *Beauveria* spp.

Com a utilização da alça de platina, alíquotas de conídios foram inoculadas em três pontos sobre os meios BDA e MC, para a contagem de esporos. Após 8 dias, as colônias foram removidas colocadas em 10 mL de solução Tween 80 a 0,1%, agitadas em vórtex e realizada a contagem de esporos que foi estimada em câmara de Neubauer (conídios/ml⁻¹).

3.3 Avaliação de Patogenicidade

3.3.1 Inoculação de *Beauveria* spp. em *Diatraea saccharalis*

Os isolados de *Beauveria* foram inoculados sobre larvas de *Diatraea saccharalis* autoclavadas e imersas em placas com meio ágar-água (1,5%) a fim de recuperar a virulência dos isolados fúngicos. As placas foram mantidas a 28°C e após 10 dias os fungos foram repicados em meio BDA permanecendo mais 10 dias na estufa.

Posteriormente, discos de 8 mm destas colônias foram transferidos para tubos contendo 10 ml de água esterilizada, mais solução aquosa de espalhante adesivo (Tween 80 a 0,1%v/v) e o número de conídios foi estimado em câmara de Neubauer. 10 µL da suspensão de conídios (10⁷ conídios/ml⁻¹) foram aplicadas sobre a cutícula de larvas de *Diatraea saccharalis* de terceiro ínstar. Foram utilizadas 5 repetições, com 5 larvas por repetição.

3.3.2 Teste de Viabilidade de Conídios

Paralelamente foi realizada a leitura da viabilidade de conídios dos isolados. Para isso, os conídios foram semeados sobre meio BDA com auxílio de uma alça de Drigalski; após 12 horas, foi feita uma contagem de esporos germinados e não germinados.

3.4 Caracterização e Análise da Variabilidade Genética de Isolados de *Beauveria* por RAPD e Seqüenciamento de Regiões ITS do rDNA

3.4.1 Extração do DNA total

Os isolados de *Beauveria* foram crescidos a 28°C, em meio BD por 15 dias. Após este período, o micélio foi coletado por filtração, triturado com nitrogênio líquido para extração de DNA total, de acordo com Raeder e Broda (1985). Após purificação com fenol-clorofórmio (S et al., 1989), o DNA foi quantificado em gel de agarose (0,8%) utilizando um padrão conhecido de DNA (fago λ). Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (SAMBROOK *et al.*, 1989) e fotodocumentado sobre luz UV. Posteriormente, o DNA foi armazenado a -20°C.

3.4.2. Análise da Variabilidade Genética de Isolados de *Beauveria* por RAPD

A reação de RAPD foi otimizada testando-se diferentes concentrações de MgCl₂ (2,0; 2,5; 3,0; 3,5; e 4,0mM), Taq DNA Polimerase (3 e 5U/reação) e DNA (10 e 20 ng) para cada reação.

A reação de amplificação foi feita em termociclador *Perkin-Elmer GeneAmp[®] PCR System 9700*, programado para realizar uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos, sendo que cada ciclo consiste de uma etapa de desnaturação (1 minuto a 92°C), uma etapa de anelamento (1 minuto a 35°C) e uma etapa de alongamento (2 minutos a 72°C) e por fim uma extensão final a 72°C por 5 minutos. As reações de amplificação foram constituídas de 10ng de DNA, 40 pmoles de primer (*Operon Technologies*), 3,5 mM de MgCl₂, 100µM de cada dNTPs (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) e 5 unidades de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*) em Tris-HCl 10mM (pH 8,3) + KCl 50mM em um volume final de 25µL. Após a amplificação, as reações foram aplicadas em gel de agarose-TAE 1,4% (2,5 Volts.cm⁻¹), corado com brometo de etídio, visualizado em transluminador de UV e fotodocumentado. O controle negativo foi preparado com água ultrapura autoclavada no lugar do DNA. Todas as reações foram repetidas em experimentos independentes.

Os dados obtidos nos géis de eletroforese foram transformados em dados binários (1 para presença e 0 para ausência de bandas), para que os mesmos pudessem ser processados pelo programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, versão 2.02), gerando uma matriz de similaridade pela utilização do coeficiente de Simple Matching (SM). Baseado nessa matriz, o programa forneceu um dendrograma gerado pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average), estabelecendo as relações de distância genética entre os diferentes isolados. O consenso de dendrograma foi obtido com 1000 réplicas (valores de bootstrap) usando o programa Winboot (YAP e NELSON, 1996).

3.4.3 Amplificação e Sequenciamento do rDNA de *Beauveria*

As regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA foram amplificadas por PCR, utilizando iniciadores ou *primers* flanqueadores específicos para essas regiões. O termociclador foi programado para realizar uma desnaturação inicial a 94⁰C por 5min, seguido de 24 ciclos de 94⁰C por 30s, 55⁰C por 30s e 72⁰C por 30s e após os ciclos, foi permitida uma extensão final a 72⁰C por 7min. Os iniciadores ou *primers* utilizados foram ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), os quais anelam em posições específicas do 18S e 28S rDNA, respectivamente. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo Tampão 1x (50 mM de KCl, 20mM de Tris-HCl (pH 8,4)), 3,7mM de MgCl₂, 1mM de dNTP, 0,05U.µL⁻¹ de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,4µM de *primer* ITS-1, 0,4µM de *primer* ITS-2 e, aproximadamente, 3ng de DNA. O fragmento amplificado foi observado em gel de agarose 1,4%, tendo como padrão de peso molecular o DNA *ladder* 100pb (Invitrogen). Após a eletroforese, os fragmentos amplificados foram purificados com o Kit GFX PCR (Amersham Pharmacia Biotech) e foram gentilmente seqüenciados por Dr. Ricardo Harakava (Instituto Biológico, São Paulo, SP).

Para a identificação dos isolados, as seqüências foram analisadas contra a base de dados do *GenBank* por meio do BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), que utiliza o método heurístico para encontrar o melhor resultado dos alinhamentos locais entre a seqüência submetida e o banco de dados. O alinhamento das seqüências foi feito usando o programa *Clustal X*, e as análises filogenéticas foram feitas de acordo com o método *Neighbor-joining* para a construção do dendrograma (FELSENSTEIN, 1985) utilizando o programa PAUP 3.0. A árvore filogenética foi observada pelo programa TreeView.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação e Caracterização dos Isolados

4.1.1 Análise Morfológica

A identificação dos isolados de *Beauveria* foi realizada por Microscopia Óptica e posteriormente por Microscopia Eletrônica de Varredura. Por meio da Microscopia Óptica verificou-se que todas as linhagens utilizadas apresentavam características morfológicas típicas do gênero *Beauveria*, conforme item 4.2.1 de Material e Métodos (dados não apresentados). Todas linhagens apresentaram características do gênero *Beauveria*, com fiálides representadas por células com a região basal mais volumosa que se organizam nos conidióforos, densamente agrupados em espirais ou solitários. Os conídios globosos, ovóides, cilíndricos verrugosos, curvados ou não, aparecem sobre as hastes das fiálides, que podem ser simples, com algumas ramificações na parte superior, ou em ziguezague (SAMSON et al., 1988).

Uma análise mais detalhada das linhagens estudadas foi feita por Microscopia Eletrônica de Varredura. A MEV foi realizada para verificar se ocorriam diferenças entre as espécies endofíticas comparadas com as entomopatogênicas (Figura 2). Para isso, foram avaliadas as médias do tamanho dos esporos e comparados com descrições da literatura para uma melhor caracterização dos isolados endofíticos e entomopatogênicos. Foi observado que o tamanho dos esporos das linhagens utilizadas, com exceção da linhagem B157, variou de 2 a 3,1 µm de comprimento e 2 a 2,6 µm de largura, sendo que estes valores estão de acordo com os dados apresentados por De Hoog (1972) e Samson (1981), os quais verificaram conídios globosos e subglobosos com 2 a 3 x 2 a 2,5 µm e com conidióforos formando densos cachos em *B. bassiana*. Os resultados observados para o isolado B157 sugerem que este isolado possa

pertencer à outra espécie. O isolado endofítico B157 apresentou o coeficiente de circunferência (comprimento/largura dos conídios), com uma exceção, significativamente maior que os demais isolados (Figuras 2 e 3 e Tabela 2) , sendo este valor semelhante àquele atribuído à espécie *B. amorpha* (SAMSON e EVANS, 1982), a qual apresenta conídios hialinos, lisos, cilíndricos, frequentemente dilatados em uma extremidade e fracamente curvados, com 3,5 a 5µm de comprimento x 1,5 a 2µm de largura. Um dos isolados entomopatogênicos (CG82) não apresentou diferença estatisticamente significativa com relação a B157, mas por outro lado agrupou-se também junto aos demais isolados supostamente pertencentes à espécie *B. bassiana*. (Figura 3 e Tabela 2).

Tabela 2: Tamanho dos conídios em µm (comprimento e largura) de *B. bassiana* e *B. amorpha*, descritos na literatura e encontrados no presente trabalho.

ESPÉCIES	Médias (literatura)	Médias obtidas (deste trabalho)	Linhagens
<i>B. amorpha</i>	3,5 a 5 x 1,5 a 2	3,6 a 5 x 1,4 a 2	B157
<i>B. bassiana</i>	2 a 3 x 2 a 2, 5	2 a 3,1 x 2 a 2,6	B95, CG62, CG82, CG165, E3

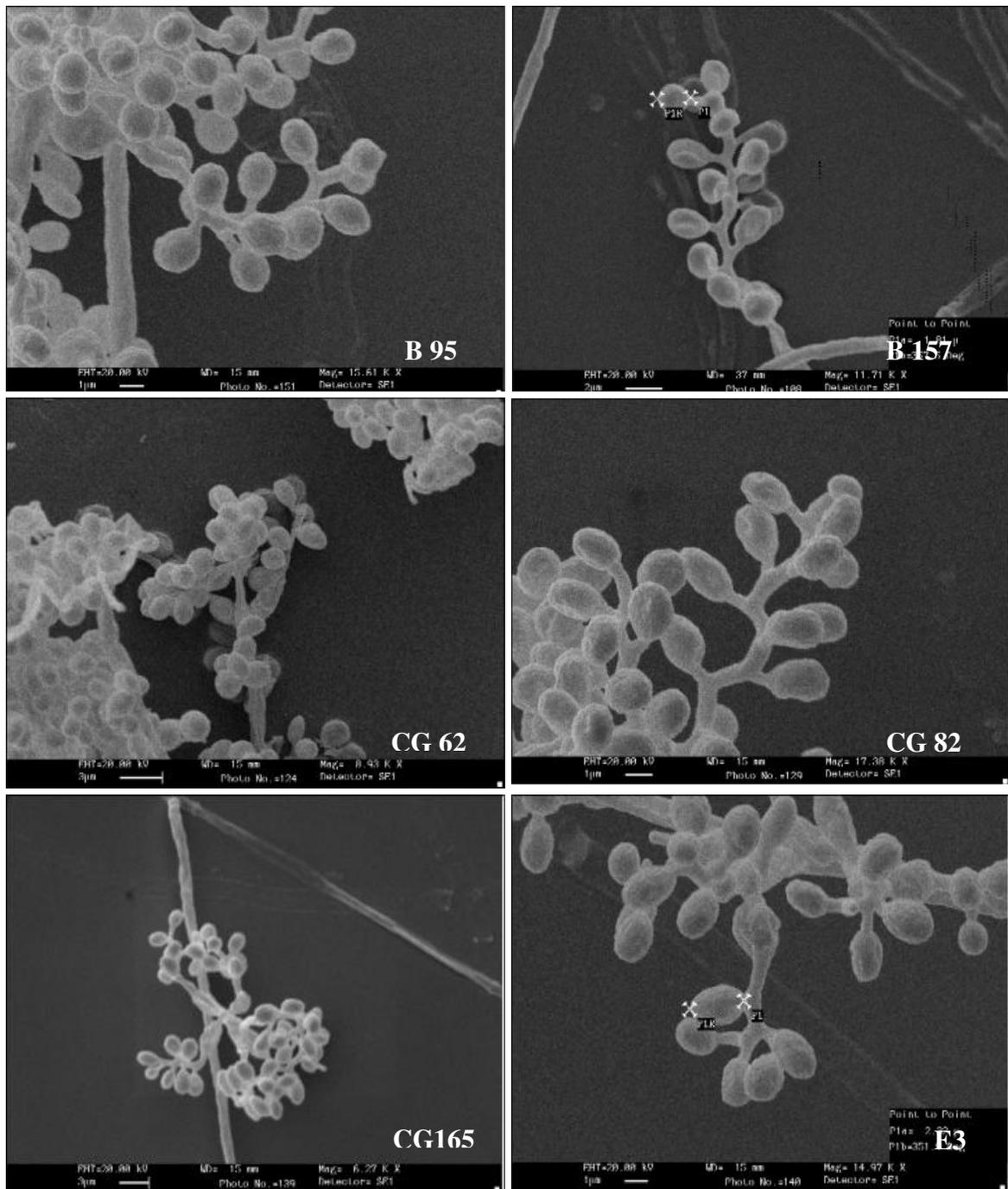


Figura 2: Microscopia Eletrônica de Varredura das linhagens utilizadas de *Beauveria*.
Foto: Departamento de microscopia - LEO, NAP/MEPA, ESALQ/USP

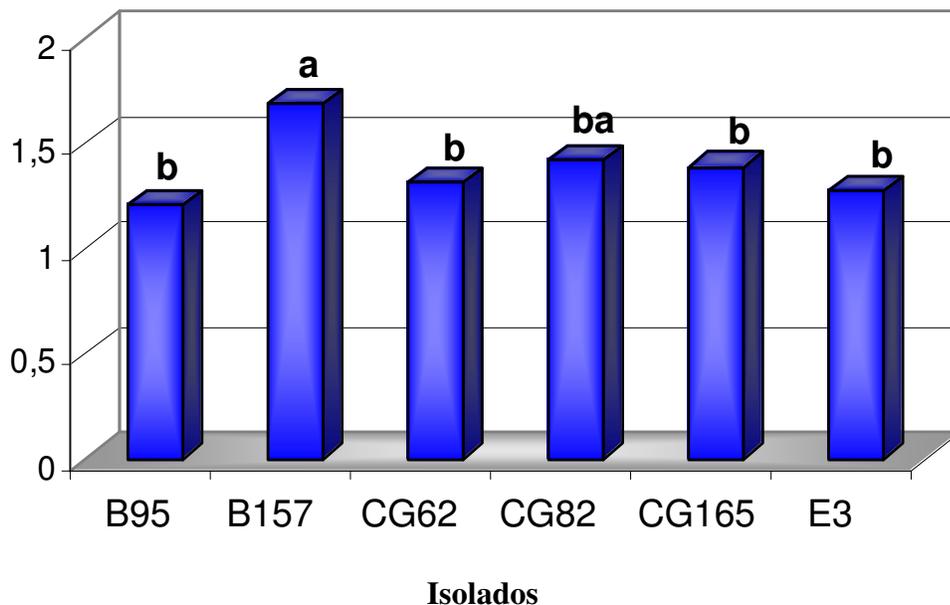


Figura 3: Coeficiente de circunferência dos conídios de *Beauveria* spp. calculados pela relação comprimento/largura, cujas medidas foram obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. (Teste de Tukey. Nível < 0,05).

4.1.2 Influência do Meio de Cultura sobre o Crescimento das Colônias de *Beauveria*

Este teste teve por finalidade analisar o comportamento das linhagens de *Beauveria* nos meios MC e BDA (item 4.2.3.1). Pela comparação do crescimento dos isolados nos meios de cultura utilizados foi possível verificar que todas as linhagens apresentaram aspecto pulverulento e cor branca característica de *Beauveria* em meio sólido (Figura 4). Os isolados B95, B157, CG62 e E3 além das características citadas, apresentaram crescimento radial característico, com intensa conidiação em ambos os meios e com o desenvolvimento melhor em MC; já as linhagens CG82 e CG165 apresentaram conidiação abundante em MC e se diferenciaram em BDA com menor conidiação e zona periférica pouco densa resultando também em um menor crescimento.

Ficou evidenciado que todas as linhagens se desenvolveram melhor em MC. A análise desses resultados demonstrou que em relação ao crescimento, os isolados endofíticos e entomopatogênicos se desenvolveram melhor em MC do que em BDA (Figuras 4, 5, 6 e Tabela 3). Resultados semelhantes foram obtidos por Monteiro (1988), estudando *B. bassiana* (isolados AM B-02 e AM. B-09) em MC. Entretanto, o citado autor trabalhou somente com *B. bassiana* recém isolada de *Tenebrio molitor* (Coleóptera: Tenebrionidae). Neste trabalho, o meio BDA foi útil por permitir distinção entre as possíveis duas espécies, pois B157 supostamente da espécie *B. amorpha*, cresceu melhor em BDA que as outras linhagens utilizadas. Por outro lado, o crescimento em MC foi semelhante para todos os isolados.

Tabela 3: Influência do Meio de cultura, sobre o crescimento de seis linhagens de *Beauveria*, no período de 3 a 18 dias, em estufa a 28° C.

Linhagem	Diâmetro da Colônia (cm) ¹ Dias											
	3°		6°		9°		12°		15°		18°	
	BDA	MC	BDA	MC	BDA	MC	BDA	MC	BDA	MC	BDA	MC
B95	1,33	1,58	2,11	2,86	2,66	4,23	3,36	5,73	4,10	7,00	4,70	8,30
B157	0,90	1,65	2,66	3,20	3,80	4,73	5,33	6,53	7,10	8,16	8,80	8,90
CG62	1,38	1,40	2,35	2,75	3,16	4,06	4,50	5,50	5,90	6,70	7,36	7,96
CG82	1,46	1,81	2,46	2,73	3,46	4,23	4,25	5,30	5,10	6,30	6,15	7,40
CG165	1,36	1,53	2,31	2,70	3,13	4,36	3,53	6,00	4,60	7,70	5,40	9,00
E3	1,56	1,68	2,20	3,05	2,70	4,36	3,26	5,70	4,10	7,10	5,00	8,46

¹Média aritmética de 03 repetições.

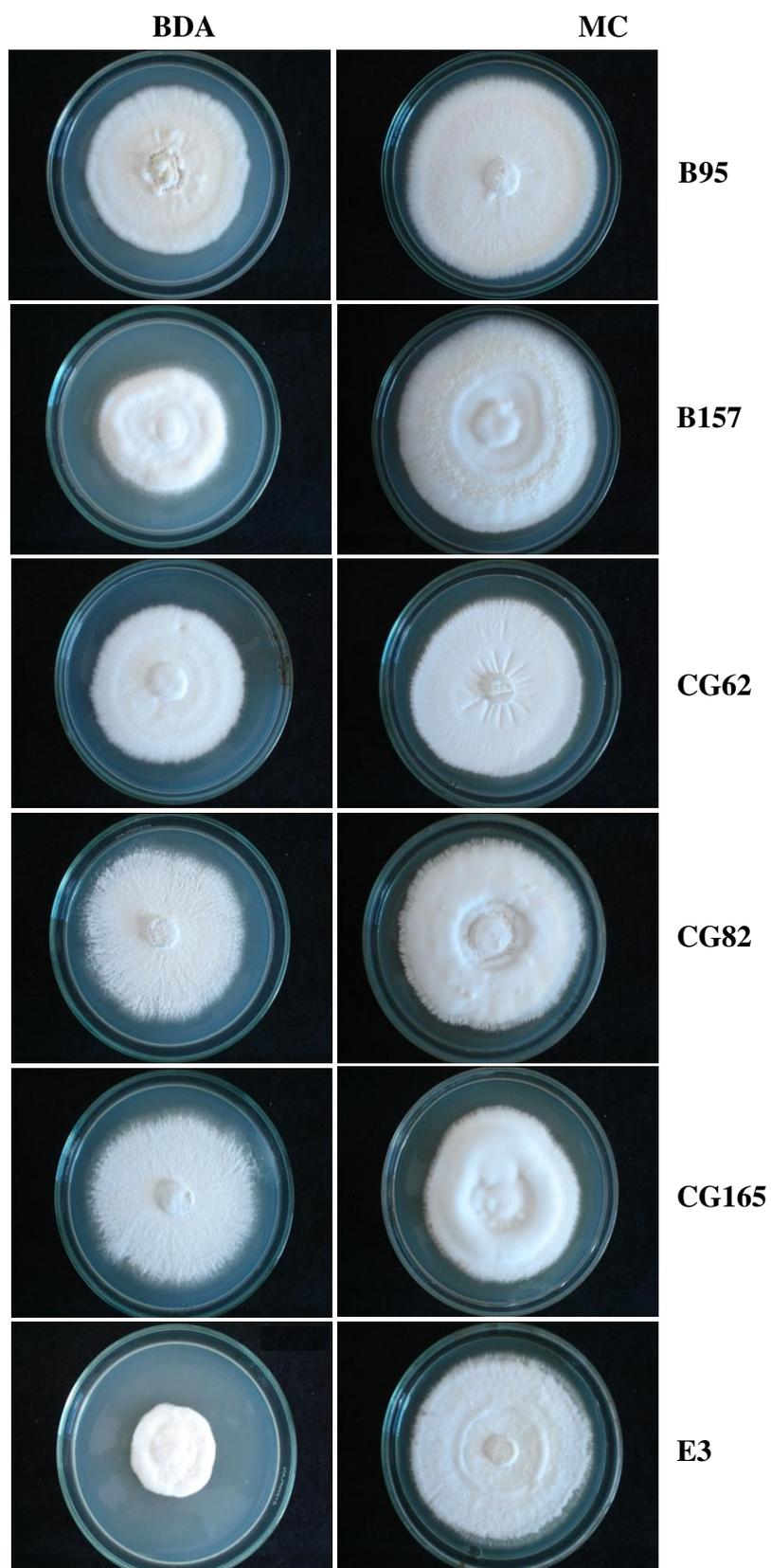


Figura 4: Influência dos meios de cultura sobre o crescimento de seis linhagens de *Beauveria* no período de 3 a 18 dias em Meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e Meio Completo (MC).

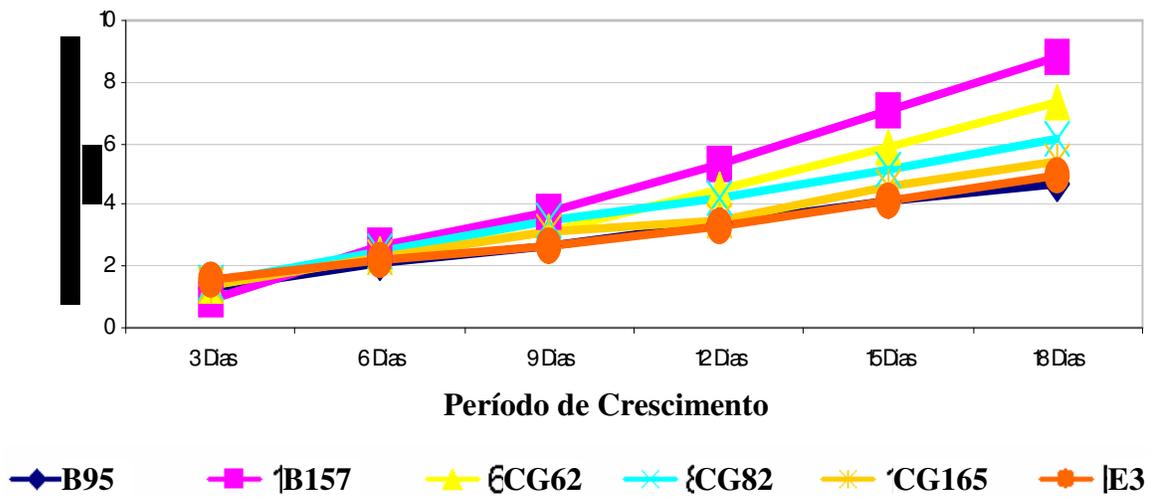


Figura 5: Diâmetro de colônias de *Beauveria* crescidas em meio BDA no período de 3-18 dias.

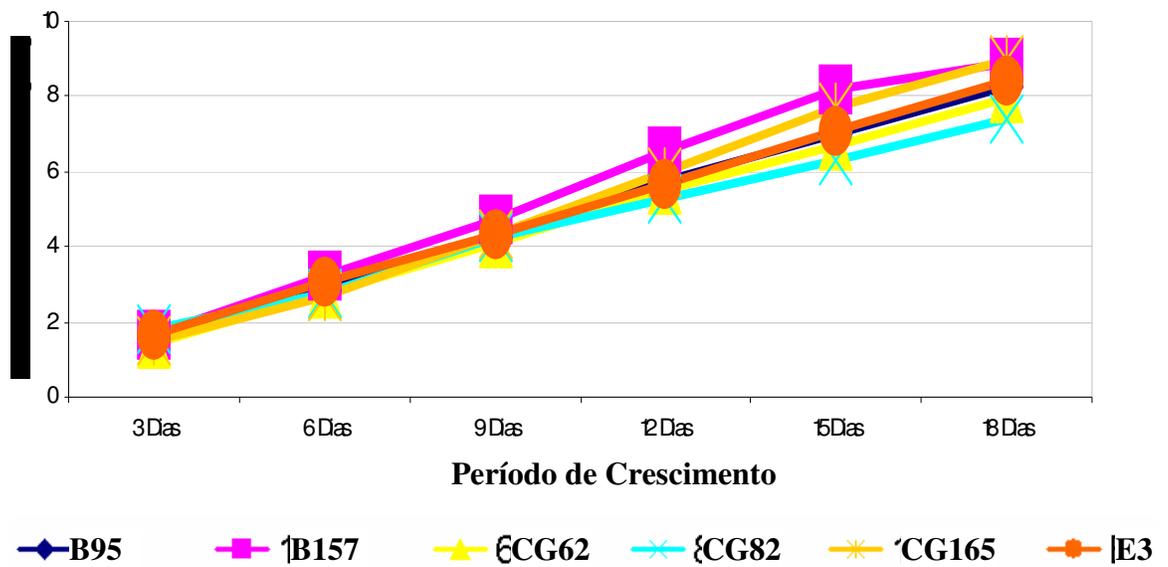


Figura 6: Diâmetro de colônias de *Beauveria* crescidas em meio MC no período de 3-18 dias.

4.1.3 Influência do Meio de Cultura no Peso Seco do Micélio

Conforme descrito no item 4.2.3.2 após secagem em estufa (60° C), os micélios de *Beauveria*, após 4 dias, mantiveram peso constante. As figuras 7 e 8 mostram que o isolado CG82 teve maior peso em meio BD, isto é, meio de Batata-Dextrose líquido sem Ágar, que em MC líquido e o isolado B157 maior peso em MC que em BD. Entretanto, não foram detectadas diferenças significativas entre os pesos secos das linhagens utilizadas tanto no MC como no BD. Os resultados indicam, que os meios BD a MC não distinguem as linhagens pela avaliação da biomassa total.

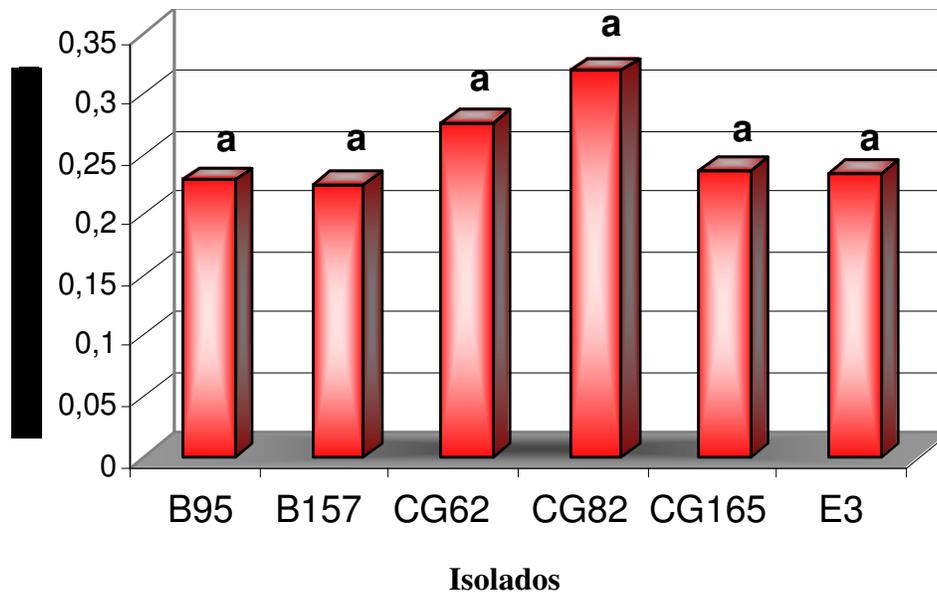


Figura 7: Avaliação do peso micelial em BD. Mesmas letras indicam não haver diferenças estatisticamente significativas (Teste de Tukey. Nível $\leq 0,05$).

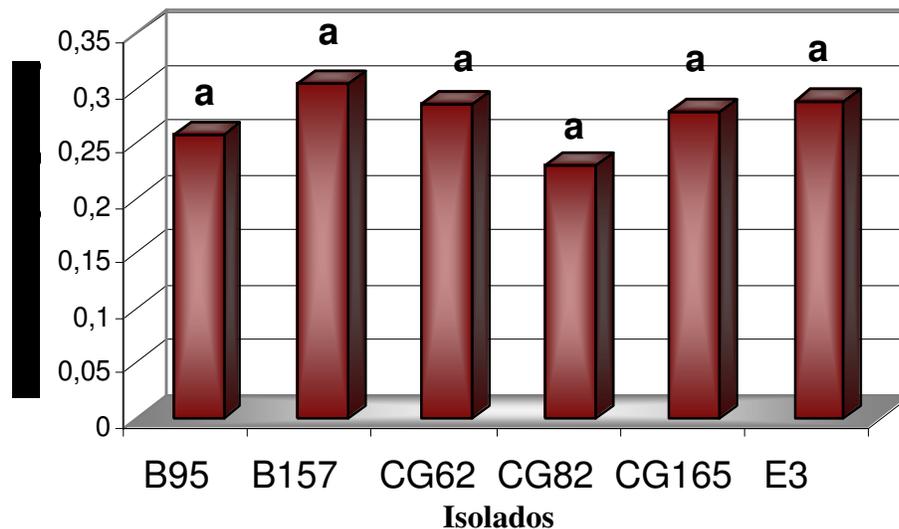


Figura 8: Avaliação do peso micelial em MC líquido. Mesmas letras indicam não haver diferenças estatisticamente significativas (Teste de Tukey. Nível $\leq 0,05$).

5.1.4 Meio de Cultura e Esporulação

Após 8 dias de crescimento, a esporulação dos isolados foi estimada em câmara de Neubauer (conídios/ml) conforme descrito no item 4.2.3.3. Comparando o meio BDA e MC foi observado que todos os isolados praticamente apresentaram maior esporulação em MC (figuras 9 e 10). Além disso, foi constatado que o isolado B157 foi diferente dos demais isolados avaliados produzindo significativamente mais esporos que os outros isolados. Esta é mais uma característica que distingue B157 dos demais isolados estudados no presente trabalho. Esta característica é de importância para trabalhos que envolvem controle biológico e colocam B157 como potencialmente apropriado para este tipo de aplicação, pois é por meio dos esporos que *Beauveria* se dissemina no campo e ataca os insetos-pragas da agricultura. Também deve ser

destacado que B157 tem origem endofítica o que significa que embora microrganismos endofíticos em geral não tenham esporulação no interior das plantas hospedeiras, ela não perde essa característica quando cultivada em meios de cultivo no laboratório.

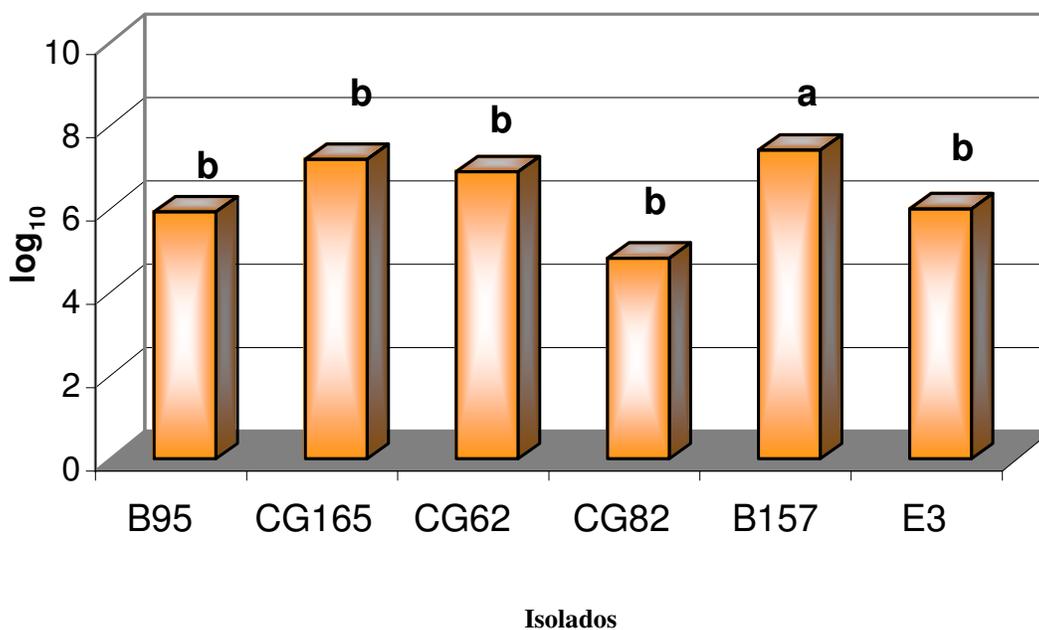


Figura 9: Número de esporos de isolados de *Beauveria* em meio BDA. O Log₁₀ é do número de esporos e as mesmas letras indicam não haver diferenças estatisticamente significativas (Teste Tukey. Nível <= 0,05).

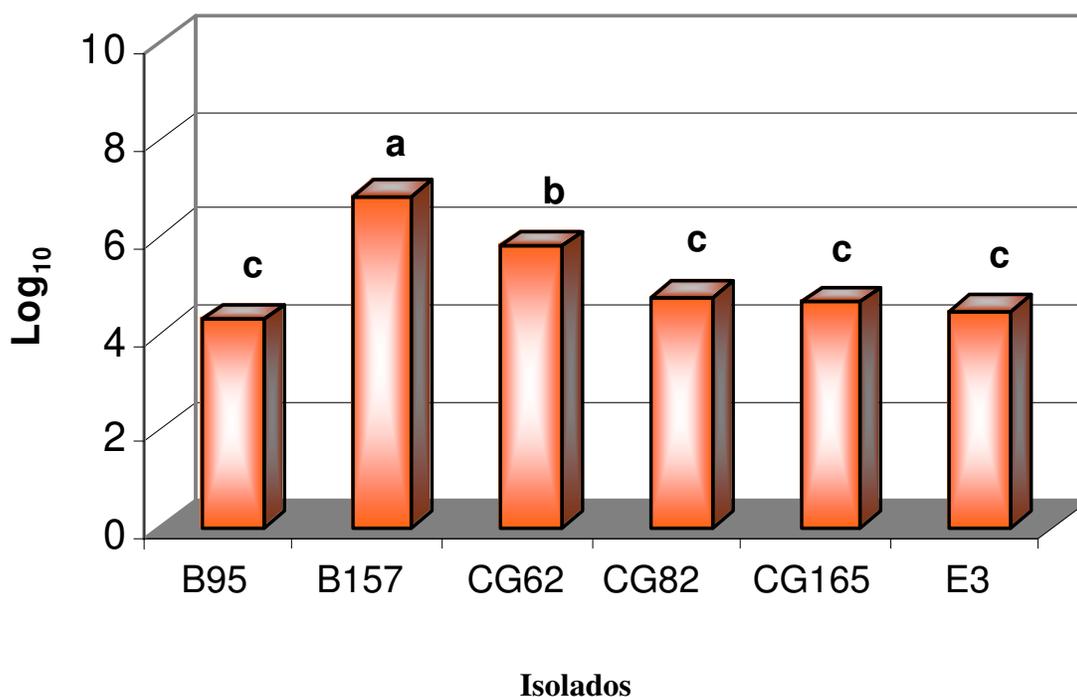


Figura 10: Número de esporos de isolados de *Beauveria* em MC. O Log₁₀ é do número de esporos e as mesmas letras indicam não haver diferenças estatisticamente significativas (Teste Tukey. Nível <= 0,05).

4.2 Patogenicidade de *Beauveria* em larvas de *Diatraea saccharalis*

Conforme descrito no item 4.3.1, isolados endofíticos (B95 e B157) e espécies entomopatogênicas (CG62, CG82, CG165 e E3) de *Beauveria* foram inoculados em larvas de *D. saccharalis* a fim de recuperar sua virulência. Alves (1998) observou uma variação da patogenicidade com frequência em bioensaios de seleção, podendo estar associados a fatores como baixa virulência do isolado, especificidade, tolerância do hospedeiro, entre outros. Esta baixa virulência em isolados mantidos em laboratório se deve a repiques constantes em meio de cultura sintético, o qual pode estar associado à repressão de genes de virulência.

Após o repique em meio contendo lagartas de *D. saccharalis*, a viabilidade dos esporos de cada isolado foi estimada (tabela 4) permitindo observar que os esporos dos isolados B157 e CG82 apresentam viabilidade inferior a 90%, enquanto os outros apresentaram viabilidade de 95% ou maior que 95%. Em seguida, 10 μ L da suspensão de esporos (10^7 esporos/ mL⁻¹) dos isolados foram inoculados nas larvas de *D. saccharalis* de 3^o ínstar e posteriormente determinada a mortalidade em até 10 dias. Os resultados mostraram que os isolados endofíticos B95 e B157 foram mais agressivos que as espécies entomopatogênicas CG62, CG82, CG165, e E3 (figura 11). A diferença destes isolados indica que os endofíticos podem ser usados com maior sucesso que os demais, e inclusive os isolados endofíticos poderiam ser utilizados para o controle de pragas que colonizam o interior da planta hospedeira. Um ponto interessante foi que, embora o isolado B157 tenha mostrado menor viabilidade dos esporos, a sua patogênese foi maior, reforçando o seu potencial para o controle de pragas incluindo *D. saccharalis*. A Figura 12 apresenta as curvas de mortalidade de larvas de *D. saccharalis*. Novamente as linhagens endofíticas B157 e B95 apresentam, especialmente após o 5^o dia do teste, alta eficiência em relação as demais no ataque das larvas de *D. saccharalis*.

Sabendo-se que *Beauveria bassiana* é um grande controlador de insetos pragas em todo o mundo (HAJEK e EASTBURN, 2001), os dados apresentados no presente trabalho mostram que este fungo pode também manter estas características mesmo tendo sido isolado como endófito de milho, fato este que ressalta a sua importância para o controle de insetos pragas de culturas de valor agrícola.

Tabela 4: Suspensão e Viabilidade dos conídios de *Beauveria*.

Isolados	Viabilidade (%)	Suspensão de Conídios/ ml
B95	98%	$4,1 \times 10^7$
B157	89%	$3,9 \times 10^7$
CG62	96%	$4,3 \times 10^7$
CG82	87%	$4,5 \times 10^7$
CG165	95%	$4,9 \times 10^7$
E3	97%	$3,5 \times 10^7$

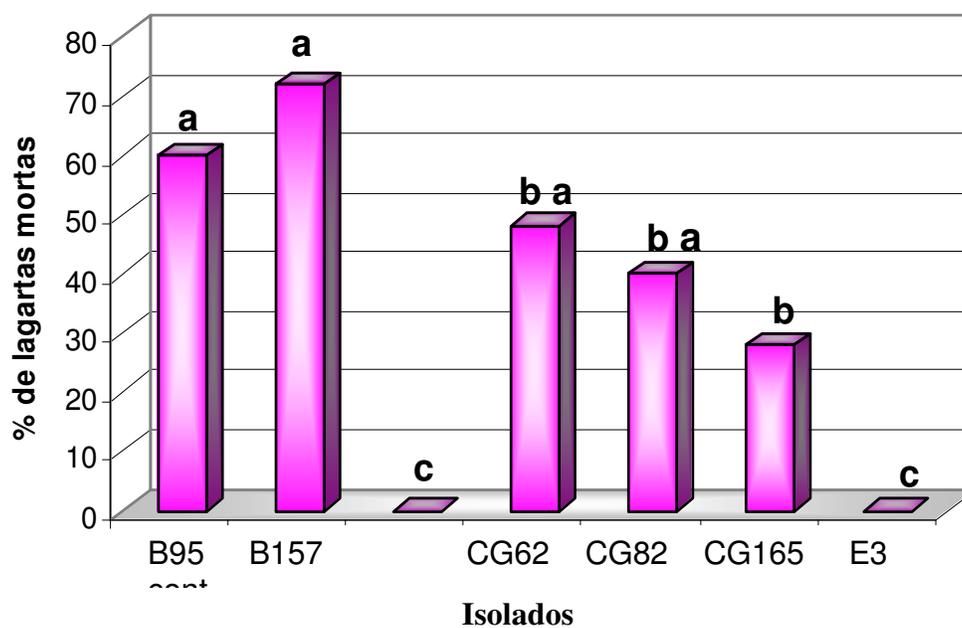


Figura 11: Avaliação da Patogenicidade de *Beauveria* em larvas de *Diatraea saccharalis*. Letras iguais indicam não haver diferenças estatisticamente significantes. Teste de Tukey. Nível $\leq 0,05$ (Resultado de 5 repetições).

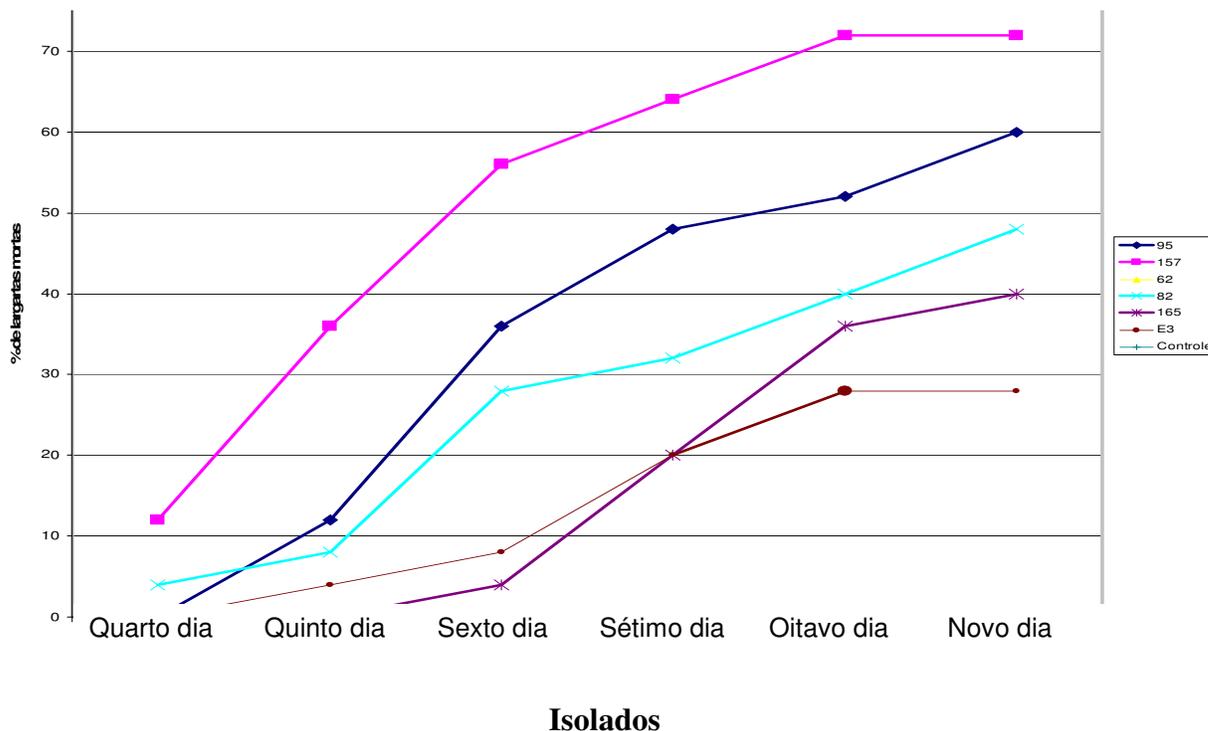


Figura 12: Análise da curva de Patogenicidade de *Beauveria* em larvas de *D. saccharalis*.

4.3 Análise da Variabilidade Genética de *Beauveria*

4.3.1 Diversidade Genética de RAPD

Identificar o grau de similaridade entre os genótipos de organismos de interesse é a função desta técnica que amplifica fragmentos não específicos de DNA, distribuídos de forma aleatória no genoma do organismo alvo, por meio da utilização de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) de 10 bases, amplificando via PCR, fragmentos do DNA genômico.

Para que se obtenha melhores resultados é importante que se otimizem as condições de amplificação; selecionando os iniciadores ou *primers*, concentração de íons $MgCl_2^{++}$ e DNA na reação. Neste trabalho, foram avaliados os 6 isolados de *Beauveria* (2 endofíticos e 4

entomopatogênicos). Foram avaliados os perfís de RAPD destes isolados utilizando 45 *primers*, dos quais foram selecionados 6 (W04, W06, W20, X04, X11, C08) que mostraram um melhor perfil de bandas.

Foi observado que a melhor condição na otimização da reação foi obtida utilizando-se a concentração 3.0 mM de MgCl₂ e 3U de enzima Taq DNA polimerase, juntamente com 10 ou 20ng de DNA por reação. Segundo Willians et al. (1993) a concentração de DNA na reação é um fator muito importante na análise de RAPD, visto que em altas concentrações de DNA é observado um borrão (background) dificultando a leitura das bandas, enquanto que em concentrações baixas ocorre a perda de bandas importantes que seriam visíveis em concentrações adequadas.

Utilizando-se as condições otimizadas foi possível avaliar a diversidade genética dos 6 isolados de *Beauveria*. Os *primers* utilizados no presente estudo geraram um total de 88 bandas com ótimo nível de repetibilidade. Destas bandas, 82 mostraram-se polimórficas, ou seja, estiveram ausentes em pelo menos um isolado avaliado. A figura 13 mostra o perfil de bandas obtido como o *primer* XO4 para os 6 isolados, indicando que os isolados endofíticos apresentaram bandas diferenciadas dos isolados entomopatogênicos (ver seta).

Para mostrar as relações genéticas entre os isolados avaliados construiu-se um dendrograma (figura 14) por meio da análise combinada das 88 bandas. Utilizando uma linha arbitrária a 95% de similaridade, foi observada a formação de 4 grupos distintos: G1 (B157, B95), G2 (CG82, CG165), G3 (CG62), G4 (E3). Na análise observa-se que o grupo 1 pode ser separado muito bem dos demais isolados com 100% de confiabilidade (valores de bootstrap) mostrando que eles são geneticamente diferentes dos demais isolados. Desta forma o presente

trabalho, por meio dos dados de RAPD, permitiu uma distinção genética entre isolados endofíticos e entomopatogênicos.

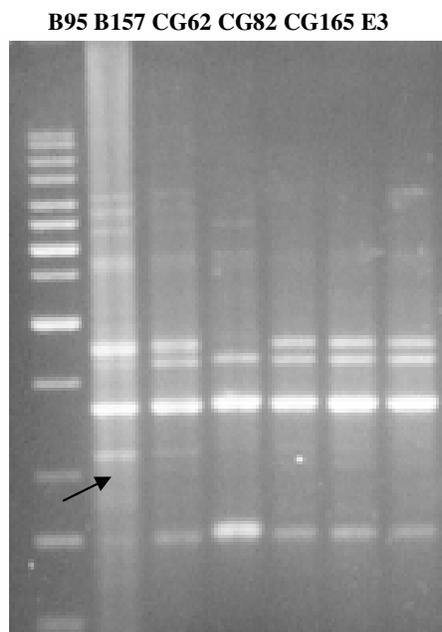


Figura 13: Análise do RAPD, gel de eletroforese mostrando padrões de RAPD obtidos dos isolados de *Beauveria* usando o *primer* X04. M-marcador *Ladder* 1 KB.

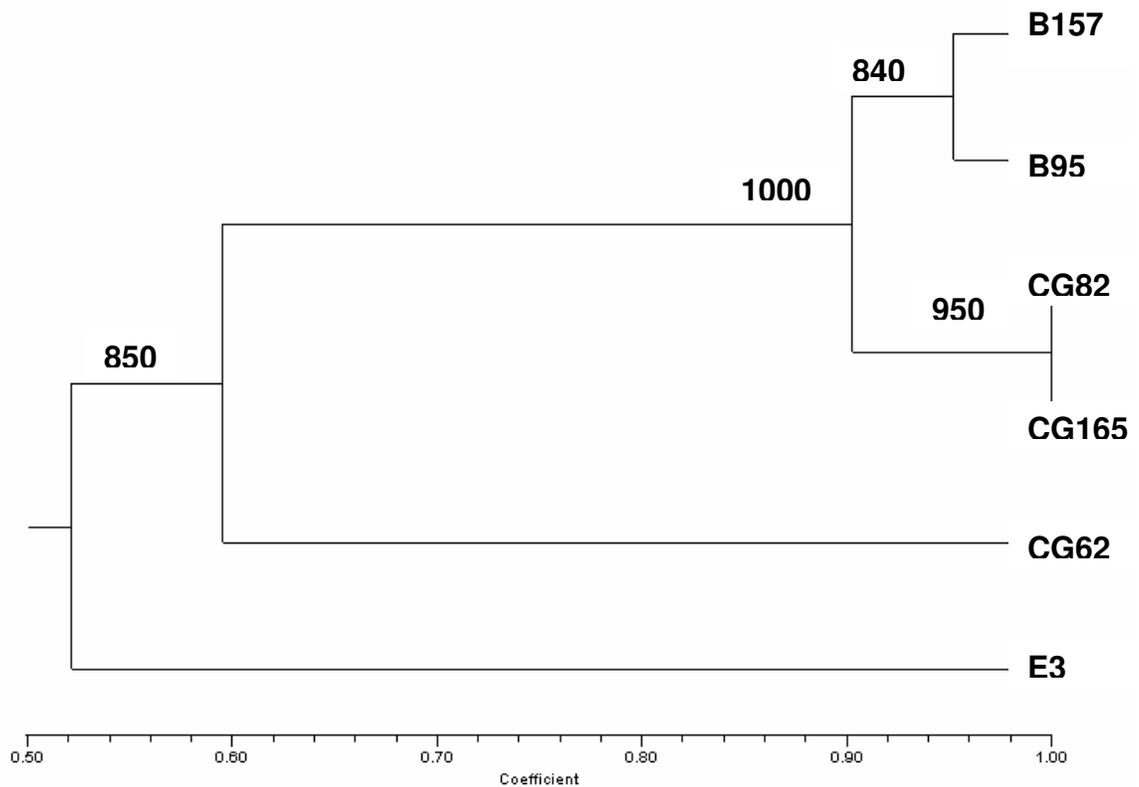


Figura 14: Dendrograma construído com análise molecular RAPD dos isolados de *Beauveria*..

4.3.2 Análise do rDNA de *Beauveria*

Por meio da amplificação das regiões ITS1, 5.8S e ITS2 do rDNA de *Beauveria* foi obtido um produto de PCR em torno de 750 pb, não mostrando polimorfismo quanto ao tamanho do fragmento amplificado. Estes fragmentos foram posteriormente seqüenciados, alinhados e comparados com outras seqüências depositadas no GenBank. As seqüências avaliadas mostraram dendrogramas com as relações filogenéticas entre os isolados (figura 15), mas não houve possibilidade de separação entre isolados endofíticos e entomopatogênicos de *Beauveria*.

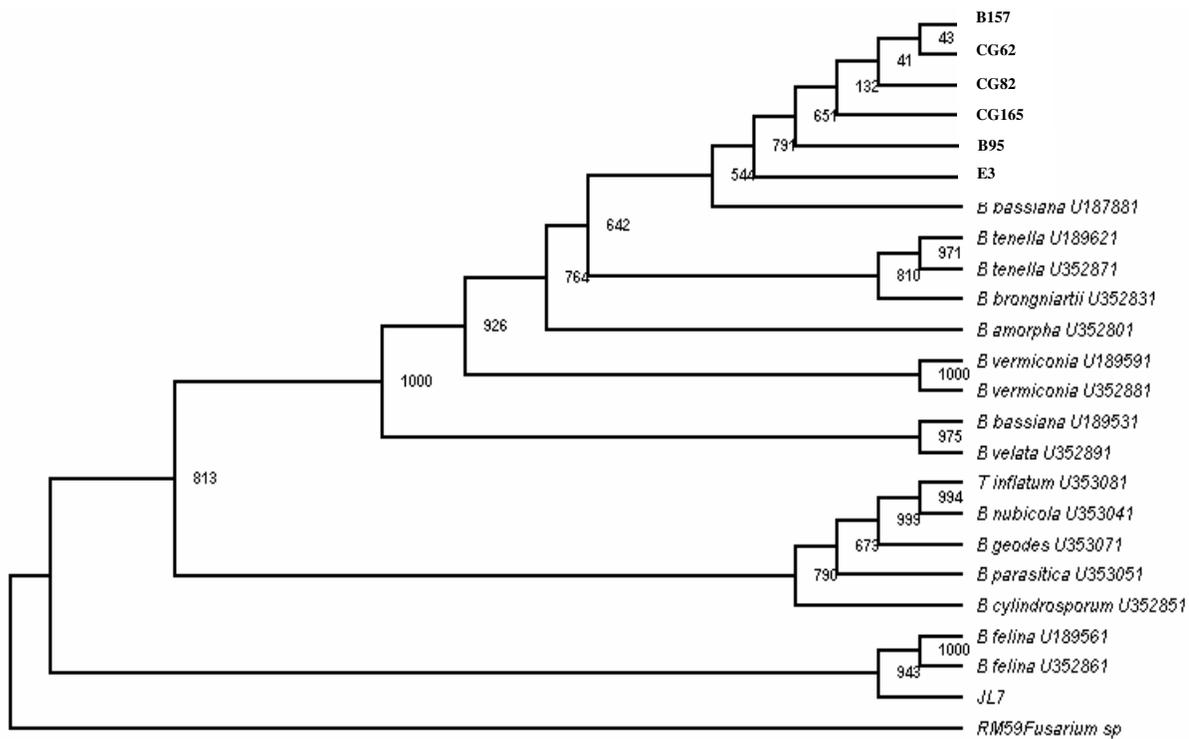


Figura 15: Dendrograma construído com análise das seqüências de rDNA (ITS1 + 5.8s + ITS2) dos isolados de *Beauveria*.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

- A análise morfológica permitiu classificar todas as linhagens utilizadas como sendo pertencentes ao gênero *Beauveria*, porém, o auxílio da Microscopia Eletrônica de Varredura associada a outras características permitiu distinguir uma linhagem endofítica (B157) como pertencente à outra espécie de *Beauveria* que não *B. bassiana*;
- O crescimento das linhagens em dois distintos meios de cultura, novamente indicou uma linhagem endofítica (B157) com crescimento diferencial das demais em meio BDA. Entretanto, o peso seco de micélio não se constitui em um bom parâmetro na distinção das linhagens usadas;
- A linhagem endofítica B157 apresentou número de esporos superior às demais. Além de ser um fator de distinção entre as linhagens, esta característica é de valor para sua utilização no controle de insetos;
- Cinco linhagens foram efetivas no controle de larvas de *D. saccharalis* e as linhagens endofíticas foram as que melhor se comportaram quando analisadas conjuntamente quanto ao número e tempo de mortalidade de larvas;
- Pela análise molecular via RAPD foi possível distinguir linhagens endofíticas das entomopatogênicas;
- Todos os dados analisados conjuntamente indicam que o isolado B157 pertencente ao gênero *Beauveria*, possivelmente se classifica como *Beauveria amorpha* ou mesmo a uma espécie ainda não identificada.

REFERÊNCIAS

ADACHI, K.; NAKATAMI, M.; MOCHIDA, H., **Isolation of an endophytic diazotroph, *Klebsiella oxytoca*, from sweet potato stems in Japan.** Soil Science and Plant Nutrition, v.48, p.889-895, 2002.

ALEXOPOULOS, C.J.; MINS, C.W. **Introductory Mycology.** New York, John Wiley, p.632, 1979.

ALMEIDA, L.C.; E.B. ARRIGONI; J.P. RODRIGUES FILHO. Modelo de análise econômica para avaliação do controle biológico da broca da cana-de-açúcar, *D. saccharalis*. **In: Anais do 7º Seminário Copersucar de Tecnologia Agrônômica**, 1997.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B(Ed.) **Controle Microbiano de Insetos. 2º ed. Piracicaba: Fealq.** p.289-381, 1998.

ALVES, S.B.; MEDEIROS, M.B.; TAMAI, M.A.; LOPES, R.B. Trofobiose e microrganismos na proteção de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.21, p.16-21, Jul. /ago. 2001.

AOKI, J.; CHIGUSA, K. **Studies on the nutrition and metabolism of pathogenic fungi in muscardine disease (1).** Nitrogen utilization by synthetic media of *Beauveria bassiana*, *Isaria farinosa* and *I. fumo-rosea*. Journal of Sericulture. Science. Japan, v.37, p.288-294, 1968.

AOKI, J.; YANASE, K. **Studies on the nutrition and metabolism of pathogenic fungi of muscardine (2).** The influences of amino acids for the formation and multiplication of hyphal bodies of *Spicaria fumorosea* (Wize) Vassil. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Journal of Sericulture. Science. Japan. v.39, p.285-292, 1970.

ARAÚJO, J.M.; SILVA, A.C.; AZEVEDO, J.L. **Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.).** Brazilian. Archives of. Biology and Technology, v.43; p.447-451, 2000.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR., W.; AGUILAR-VILDOSO, C.J.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. **Variability and Interactions Between Endophytic Bacteria and Fungi Isolated From Leaf Tissues of Citrus Rootstocks.** Canadian Journal Microbiology, v.47, p.229-236, 2001.

ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR., W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. **Diversity of Endophytic Bacterial Population and Their Interaction With *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants.** Applied and Environmental. Microbiology, v.68, n.10, p.4906-4914, 2002b.

AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo. Editora Nacional, EDUSP, p.288, 1973.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR., W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. **Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants**. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.3, p.40-65, 2000.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR., W.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. **Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais**. In: AZEVEDO, J.L.; BARROS, N.M.; SERAFINI, L.A. (Ed.) **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria**, Caxias do Sul - RS, Editora EDUCS, c.8, p.233-268, 2002.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr., W.; ARAÚJO, W.L. **Importância dos microrganismos endofíticos na agricultura**. *Revisão anual de patologia de plantas*, v.11, p.115-137, 2003.

BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; BALDANI, V.L.D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.AZEVEDO, J.L. (Edts.). **Biotechnology: Avanços na Agricultura e na Agroindústria**, Caxias do Sul - RS, Editora EDUCS, c.7, p.195-232, 2002.

BARNETT, H.L; HUNTER, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. 4nd ed. St. Paul, Minnesota. APS Press. 1998.

BASSI, A., (1834) citado por Kendrick, B. The **Fifth Kingdom**. Ontario, Micology Publications, 363p, 1985.

BARY, A. **Morphologie und physiologie der Pilze, Fleethen, und myxomyceten**. Leipzig: Engelamn, p.316, 1866.

BEATTIE, G.A.; SABARATNAM, S. **Differences Between *Pseudomonas syringae* pv: *syringae* B728 and *Pantoea agglomerans* BRT98 in Epiphytic and Endophytic Colonization of Leaves**. Applied and Environmental Microbiology, v.69, p.1220-1228, 2003.

BING, L.A.; LEWIS, L.C. **Occurrence of the entomopathogen *Beauveria bassiana* (balsamo) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. and virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hubner)**. Agriculture Ecosystems and . Environment. v.45, p.147-156, 1993.

BISSET, J.; WIDDEN, P.A. **New species of *Beauveria* isolated from scottish moorland soil**. Canadian Journal of Botany, n.66, p.361, 1989.

BOUCIAS, D.G.; HUNG, S.Y.; MAZET, I.; AZBELL, J. **Effect of the fungal pathogen, *Beauveria bassiana*, on the lysozyme activity in *Spodoptera exigua* larvae.** Journal of. Insect Physiology., v.5, p.385-391, 1994.

BOUCIAS, D.G.; McCOY, C.W.; JOSILYN, D.J. **Isozyme differentiation among 17 geographical isolates of *Hirsutella thompsonii*.** J. Invertebrated. Pathology.,v..39, p.329-333, 1982.

CASTRILLO, L.A.; VANDENBERG, J.D.; WRAIGHT, S.P. **Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers.** Journal Invertebrate Pathology82 p 75-83,3003

CHEUNG, P.Y.K.; GRULA, E.A. ***In vivo* events associated with entomopathology od *Beauveria bassiana* for the corn earworm (*Heliothus zea*).** Journal Invertebrate Pathology v 39 p 303-313, 1982

COSTA, S.O.P. As bactérias em biotecnologia. In: AZEVEDO, J.L; BARROS, N.M.; SERAFINI, L.A. (Ed.) **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**, Guaíba - RS, Editora Agropecuária, c.2, p.75-91, 2001.

COUTINHO, T.A.; PREISIG, O.; MERGAERT, J.; CNOCKAERT, M.C.; RIEDEL, K.H.; SWINGS, J.; WINGFIELD, M.J. **Bacterial Blight and Dieback of Eucalyptus species, Hybrids, and Clones in South Africa**, Plant Disease, v.86, p.20-25, 2002.

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

FARGUES, J.; MANIANIA, N.K.; DELMAS, J.C.; SMITS, N. **Influence de la température sur la croissance *in vitro* d'hyphomycètes entomopatogènes.** Agronomie, v.12, p.557-564, 1992.

FELSENSTEIN, J. **Confidence limits on filogenecy an approach using the bootstrap.** Evolution, v.39, p.783-791, 1985.

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

FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; RODRIGUES, L.S., **Bactérias Diazotróficas Associadas a Coqueiros na região de Baixada Litorânea em Sergipe.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.36, n.12, p.1509-1517, 2001.

FERRON, P. **Biological control of insects by entomogenous fungi.** Annual Review of Entomology V23 p409-442, 1978

FERRON, P. **Pest control by the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*.** In: BURGESS, H. D. (ed.). Microbiol control of pests and plant diseases. London, Academic Press, p.465-482, 1981.

FUXA, J.R.; TANADA, Y. **Epidemiological concepts applied to insect pathology.** In: FUXA, J.R.; TANADY, Y. ed. Epizootiology of insect diseases. New York, c.1, p.3-22, 1987.

GEORGHIOU, G.P.; MELLON, R.B. **Pesticide resistance in time and space.** In: GEORGHIOU, G.P.; SAITO, T. Pest resistance to pesticides. New York: Plenum Press, p.1-46, 1983.

HAJEK, A.E.; EASTBURN. C. **Effect of host insects on activation of *Entomophaga maimaiga* resting spores.** Journal Invertebrate Pathology, v4, p.290, 2001.

HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.C. **Construction of cloned DNA probes for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in grasshoppers.** Journal. Invertebrate. Pathology., v.62, p.233-240, 1993b.

HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.C. **Identification of molecular variants in mitochondrial DNAs of members of the genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*,**

Tolypocladium* and *Metarhizium. Applied and Environmental Microbiology, v.59, p.4283-4288, 1993a.

HEGEDUS, D.D.; PFEIFER, T.A.; MACPHERSON, J.M.; KHACHATOURIANS, G.G. **Cloning and analysis of live mitochondrial tRNA - encoding genes from the fungus *Beauveria bassiana***. Gene, v.109, p.149-154, 1991.

HUNG, S.Y.; BOUCIAS, D.G. **Influence of *Beauveria bassiana* on the cellular defense responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua***. Journal Invertebrate Pathology, v.60, p.152-158, 1992.

HUNG, S.Y.; BOUCIAS, D.G.; VEY, A.J. **Effect of *Beauveria bassiana* and *Candida albicans* on the cellular defense response of *Spodoptera exigua***. Journal Invertebrate Pathology, v.61, p.179-187, 1993.

KOSIR, J.M.; MACPHERSON, J.M.; KHACHATOURIANS, G.G. **Genomic analysis of a virulent and a less virulent strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, using restriction fragment length polymorphisms**. Canadian Journal Microbiology, v.37, p.534-541, 1991.

KUCERA, M. **Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. II- Effect of nitrogen Sources on formation of the toxic protease in submerged culture**. Journal Invertebrate Pathology, v.17, p.211-215, 1971.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. **Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown on soil treated with glyphosate herbicide.** Plant and soil, v.273, p.91-99, 2005.

LI, Z.Z.; LI, C.R.; HUANG, B.; FAN, M.Z. **Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. an important entomogenous fungus.** Chinese Science Bulletin, v.46, p.751-753, 2001.

LIMA FILHO, M. & LIMA, J.O.G. **Massas de ovos de *D. saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Pyralidae) em cana-de-açúcar: número de ovos e porcentagem de parasitismo por *Trichogramma spp.* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em condições de campo.** Neotropical Entomology., v.30, p.483-487, 2001.

MAZET, I.; HUNG, S.Y.; BOUCIAS, D.G. **Detection of toxic metabolites in the hemolymph of *Beauveria bassiana* infected *Spodoptera exigua* larvae.** Experientia (Basel), v.50, p.142-147, 1994.

McCOY, C.W.; SAMSON, R.A.; BOUCIAS, D.G. **Entomogenous fungi. In: Ignoffo (Ed.), Handbook of Natural pesticides.** Microbial Insecticides Part A.CRC Press, Florida, 1988.

McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. **Population-dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton.** Can. J. Microbiol, n.41, p.895-901, 1995.

McLEOD, D.M. **Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. And *Tritirachium limber*.** Canadian Journal of Botany, v.32, p.818-893, 1954.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico II.** Editora EMBRAPA, Jaguariúna, 262p, 2000.

MONTEIRO, A.C. **Aspectos fisiológicos de isolados de fungos Entomopatogênicos obtidos na região Amazônica (Manaus).** Tese de Doutorado. São Carlos, SP, p.233, 1988.

MUGNAI, L.; BRIGDE, P.D.; EVANS, H.C. **A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria bassiana*.** Mycological Research, v.92, p.199-209, 1989.

MURRAY, F.R.; LATTCH, G.C.M.; SCOTT, D.B. **Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perene*, using genetically modified *Acremonium* endophyte.** Molecular and Genetics, v.233, p.1-9, 1992.

NEUVÉGLISE, C.; BRYGOO, Y.; VERCAMBRE, B.; RIBA, G. **Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects.** Mycological Research, v.98, p.322-328, 1994.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; AZEVEDO, J.L. **Variabilidade natural no fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*.** Arquivos de . Biologia e. Tecnologia., v.3, n.33, p.657, 1990.

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

PAMPHILE, J.A. & AZEVEDO, J.L. **Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (*Fusarium moniliforme*) From maize (*Zea Mays L.*)**. Word Journal of Microbiology and Biotechnology v.18, p.391-396, 2002.

PEDIGO, L.P.; STONE, J.D.; LENTZ, G.L. **Biological synopsis of the green cloverworm in central Iowa. Journal of Economic Entomology**. College Park, v.66, p.665-673, 1953.

PEIXOTO-NETO, P.A.S.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; **Microrganismos Endofíticos- Interação com Plantas e Potencial Biotecnológico**. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v.29, p.63-76, 2002.

PEKRUL, S.; GRULA, E. A. **Mode of infection of the corn earworm (*Heliothus zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy**. Journal. Invertebrate Pathology, v.34, p.238-247, 1979.

PFEIFER, T.A.; HEGEDUS, D.D.; KACHATOURIANS, G.G. **The mitochondrial genome of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: analysis the ribosomal RNA region**. Canadian. Journal. Microbiology, n.39: p.25-31, 1993.

PFEIFER, T.A.; KACHATOURIANS, G.G. **Eletrophoretic karyotype of the entomopathogenic deuteromycete *Beauveria bassiana***, Journal. Invertebrate Pathology, v.61, p.231-235, 1993.

PIMENTEL, I.C. **Fungos endofíticos de milho (*Zea mays* L.) e da soja (*Glycine max* L. Merrill) e seu potencial biotecnológico no controle de pragas agrícolas**. Tese (doutorado) Curitiba 154p. Universidade Federal do Paraná. 2001.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMONS, L.M.; McDONALD, K.D. & BUFTOR, A.N. **The genetics of *Aspergillus nidulans*** Advances in Genetics, v.5, p.141-238, 1953.

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

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

RAKOTONIRAINY, M.S.; DUTERTRE, M.; BRYGOO, Y.; RIBA, G. **rRNA sequence comparison of *Beauveria bassiana*, *Tolypocladium cylindrosporium*, and *T. Extingues***. Journal. Invertebrate Pathology, n.57, p.17-22, 1991.

RAO, C.U.M.; DEVI, K.U.; KHAN, P.A.A. **Effect of combination treatment with entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Nomuraea rileyi* (Hypocreales) on *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae).** Biocontrol Science. and Technology v.16, p.221-232, 2006.

RIBA, G.; POPRAWSKI, T.J.; MARIANIA, J. **Isoesterase variability among geographical populations of *Beauveria bassiana* (imperfect fungus) isolated from Miridae.** In: SAMSON, R.A.; VLAK, J.M.; PETERS, D. (eds). **Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology.** pp.205-209. **Foundation of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology.** Wageningen, The Netherlands, 1986.

ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A.M. **Controle Biológico de Insetos: O controle Biológico de insetos nocivos à agricultura com o emprego de fungos imperfeitos ou hifomicetos.** Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento, n.6, p.10-12, jul./ago. 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2^o ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.1, 1989.

SAMSINAKOVA, A. **Growth and sporulation of submersed cultures of the fungus *Beauveria bassiana* in various media.** Journal. Invertebrate Pathology, v.8, p.395-400, 1966.

SAMSON, R. A. **Identification of entomopathogenic Deuteromycetes.** In: **BURGES, H. D. Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980.** London, Academic Press, p.93-106, 1981.

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

SAMSON, R.A.; EVANS, H.C.; LATGÉ, L.P. **Atlas of entomopathogenic fungi Springer-Verlag.** Netherlands, p.187, 1988.

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

SHARMA, S.; AGARWAL, G.P.; RAJAK, R.C. **Pathophysiological alterations caused in *Heliothis armigera* by toxic metabolites of *Beauverie* (Bals.) Vuill.** Indian Journal of Experimental Biology, v.32, n.3, p.168-171, 1994.

SHI, L.G. **Study of karyotype of pathogenic *Beuveria bassiana* to *Bombix mori*.** Acta serologica, v.26, p.224-227, 2000.

SHI, L.G.; XU, J.L. **Studies on regeneration-reversion of protoplasts and karyotype of *Beauveria bassiana*.** Mycosystema, v.19, p.223-229, 2000.

SMITH, R.J.; GRULA, E.A. **Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana***. Journal . Invertebrate Pathology, v.37, p.222-230, 1981.

SMITH, R.J.; GRULA, E.A. **Toxic components on the larval surface of the corn earworm (*Heliothus zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana***. Journal Invertebrate Pathology, v.39, p.15-22, 1982.

ST. LEGER, R.J.; ALLEE, L.L.; MAY, B.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.N. **World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria spp.*** Mycological Research, v.96, n.12, p.1007-1015, 1992a.

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

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. **Taxol and taxane production by *Taxonomyces andreane*, an endophytic fungus of Pacific Yew**. Science, v.260, p.214-216, 1993.

TIGANO, M. S.; RIBA, G. **Polimorfismo das esterasas e da patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill.** Ann. Soc. Ent. Brasil., v.19, n.2 p.315-327, 1990.

TRIPLETT, E.W.; DONG, Y.; INIGUEZ, A.L.; AHMER, B.M.M.; **Kinetics and Strain Specificity of Rhizosphere and Endophytic Colonization by Enteric Bacteria on Seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula***. Applied and Environmental Microbiology, v.69, n.3, p.1783-1790, 2003.

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

VENDRAMIN, J. D. **O controle biológico e a resistência de plantas**. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (Edts.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, p.511-519, 2002.

VEY, A.; FARGUES, J. **Histological and ultrastructural studies of *Beauveria bassiana* infection in *Leptinotarsa decemlineata* larvae during ecdysis**. Journal Invertebrate Pathology, v.30, p.207-215, 1977.

VUILLEMIN, P. ***Beauveria*, nouveau genre de Verticilliacées**. *Bulletin de la Société Botanique de France*, n.29, p.34-40, 1912.

WANG, S.B.; MIAO, X.X.; ZHAO, W.G.; HUANG, B.; FAN, M.Z.; LI, Z.Z.; HUANG, Y.P. **Genetic diversity and population structure of the entomopathogenic fungus *Beauveria***

bassiana as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). *Mycological Research*, v. 109, p.1364-1372, 2005.

WHITTAKER, R.H.C. **New concepts of Kingdoms of organisms.** *Science*, v. 163, p.150-160, 1969.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. **Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers.** *Methods in Enzymology*, n.218, p.706-740, 1993.

YAP, I.; NELSON, R.J. **WinBoot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms.** *IRRI Discussion Paper Series*, v.14, 1996.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)