Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Influência da qualidade de diferentes tipos de arroz e inibidores de proteinases no rendimento e na virulência de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales)

Janayne Maria Rezende

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Janayne Maria Rezende
Engenheira Agrônoma

Influência da qualidade de diferentes tipos de arroz e inibidores de proteinases no rendimento e na virulência de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales)

Orientador:
Prof. Dr. **ITALO DELALIBERA JÚNIOR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2009

À Valdecina pela dedicação de mãe prestimosa, pelo ânimo, incentivo e por confiar em mim...

Ao Marcos pelo companheirismo, compreensão e amor...

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por mais esta oportunidade de aprendizado e por sua infalível providência.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade oferecida.

Ao Prof. Dr. Italo Delalibera Júnior pela orientação, atenção e confiança.

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia, pelos conhecimentos compartilhados.

À bióloga Solange Aparecida Vieira Barros, técnica do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, pela atenção, paciência, experiência e pela valorosa colaboração nos experimentos.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Entomologia, em especial a toda a equipe do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, pelo apoio técnico e psicológico.

Ao Prof. Dr. Daniel Scherer de Moura do Departamento de Ciências Biológicas da ESAQL-USP, pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa referente aos inibidores de proteinases.

À Embrapa Arroz e Feijão, à empresa Itaforte Bioprodutos e à Cerealista Gardenali pela doação dos arrozes utilizados nos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

“Tudo tem seu apogeu e seu declínio...

É natural que seja assim, todavia,

quando tudo parece convergir para o que supomos o nada,

eis que a vida ressurge, triunfante e bela!

Novas folhas, novas flores, na infinita benção do recomeço...”

Francisco C. Xavier

SUMÁRIO

RESUMO 13
ABSTRACT 15
1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
2.1 Controle microbiano 19
2.2 O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* 21
2.3 Produção de fungos entomopatogênicos 23
2.4 Importância nutricional do meio de cultivo para *Metarhizium anisopliae* 27
2.5 Inibidores de proteinases e a interação com *Metarhizium anisopliae* 32
Referências 34
3 AUMENTO NA PRODUÇÃO E VIRULÊNCIA DE CONÍDIOS DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* (MESTCH.) SOROKIN (ASCOMYCOTA: HYPOCREALES) POR INIBIDORES DE SERINOPROTEASES TIPO KUNITZ 41
Resumo 41
Abstract 41
3.1 Introdução 42
3.2 Desenvolvimento 45
3.2.1 Material e Métodos 45
3.2.1.1 Efeito de meios de cultura contendo inibidores de proteinase de soja no crescimento vegetativo e esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* 46
3.2.1.1.1 Efeito de inibidores de proteinase de soja e fontes protéicas 46
3.2.1.1.2 Teste com os inibidores fluoreto de fenilmetilsulfonil e leupeptina 47
3.2.1.1.3 Teste com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* 48
3.2.1.2 Virulência do fungo *Metarhizium anisopliae* cultivado em meio com inibidores de proteinase de soja 49
3.2.1.3 Virulência de *Metarhizium anisopliae* aplicado em suspensões contendo inibidores de proteinase de soja 50
3.2.1.4 Análise estatística 51
3.2.2 Resultados 52

3.2.2.1 Efeito de inibidores de proteinase de soja no crescimento vegetativo e esporulação do fungo 52
3.2.2.1.1 Teste com inibidores de proteinase de soja e fontes protéicas 52
3.2.2.1.2 Teste com os inibidores fluoreto de fenilmetilsulfonil e leupeptina e com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* 55
3.2.2.2 Virulência do fungo *Metarhizium anisopliae* cultivado em meio com inibidores de proteinase de soja 58
3.2.2.3 Virulência de conídios de *Metarhizium anisopliae* quando aplicados em suspensões contendo inibidores de proteinase de soja 60
3.2.3 Discussão 62
3.3 Considerações Finais 66
Referências 66
4 INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DE DIFERENTES TIPOS DE ARROZ E ADITIVOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* (MESTCH.) SOROKIN (ASCOMYCOTA: HYPOCREALES) 71
Resumo 71
Abstract 72
4.1 Introdução 72
4.2 Desenvolvimento 74
4.2.1 Material e Métodos 74
4.2.1.1 Produção de conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos de arroz 75
4.2.1.2 Viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* produzidos em diferentes tipos de arroz 76
4.2.1.3 Virulência de *Metarhizium anisopliae* produzido em diferentes tipos de arroz 77
4.2.1.4 Análise microbiológica em grãos de arroz: Contagem padrão de bactérias aeróbicas mesófilas, fungos filamentosos e leveduras 78
4.2.1.5 Análise nutricional do arroz 80
4.2.1.6 Análise de resíduos de agrotóxicos no arroz 81
4.2.1.7 Avaliação de aditivos no sistema de produção de *Metarhizium anisopliae* em arroz 82
4.2.1.8 Virulência de *Metarhizium anisopliae* produzido em arroz com aditivos 83

4.2.1.9 Análise estatística 84
4.2.2 Resultados 85
4.2.2.1 Produção de conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos de arroz 85
4.2.2.2 Viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* produzidos em diferentes tipos de arroz 86
4.2.2.3 Virulência de *Metarhizium anisopliae* produzido em diferentes tipos de arroz 87
4.2.2.4 Análise microbiológica em grãos de arroz: Contagem padrão de bactérias aeróbicas mesófilas, fungos filamentosos e leveduras 89
4.2.2.5 Análise nutricional do arroz 92
4.2.2.6 Análise de resíduos de agrotóxicos no arroz 94
4.2.2.7 Avaliação de aditivos no sistema de produção e virulência de *Metarhizium anisopliae* em arroz 94
4.2.3 Discussão 98
4.3 Conclusões 106
Referências 106

RESUMO

Influência da qualidade de diferentes tipos de arroz e inibidores de proteinases no rendimento e na virulência de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales)

Com o intuito de gerar subsídios para melhoria do processo de produção de *Metarhizium anisopliae*, o presente estudo teve como principais objetivos, determinar os efeitos de inibidores de proteinases de soja no crescimento vegetativo, esporulação e virulência do fungo e comparar a produção, viabilidade e virulência dos conídios produzidos em diferentes tipos de arroz e aditivos. A adição de 5 $g.L^{-1}$ de inibidores de proteinases semi-purificados de soja ou 0,5 $g.L^{-1}$ de inibidor purificado do tipo Kunitz no meio de cultura ME resultou em grande aumento na esporulação (de duas a 75 vezes) sem afetar a viabilidade dos conídios de quatro isolados (ESALQ-1037, IBCB348, E9, F20) de *M. anisopliae*. A presença destes inibidores de proteinases também alterou a morfologia dos conídios produzidos em ME. Os mecanismos responsáveis por estas alterações fisiológicas não foram determinados, mas provavelmente estejam associados à ação anti-nutricional, diminuindo a absorção protéica e estimulando a esporulação. Os conídios produzidos no meio com adição de 0,5 $g.L^{-1}$ de inibidor de proteinase do tipo Kunitz ou com 2,5 $g.L^{-1}$ de albumina de soro bovino e no meio BDA apresentaram virulência superior aos conídios produzido no meio ME sem inibidores. Quando o inibidor de proteinase do tipo Kunitz foi adicionado à suspensão de conídios do fungo antes da pulverização de lagartas de *Diatraea saccharalis*, a eficiência de controle foi 35,1%, inferior ao apresentado pelos demais tratamentos sem a presença deste inibidor. Nos estudos para determinação dos melhores tipos de arroz para produção de *M. anisopliae*, tentou-se correlacionar à produção de conídios com características destes substratos como valor nutricional, teor de resíduos de agrotóxicos e densidade de microorganismos. O arroz parboilizado foi responsável pela maior produção de conídios (4,38 x 10^9 conídios.g^{-1}). Este tipo de arroz apresentou teor de proteína bruta menor do que a maioria dos arrozes e o maior teor de umidade (41,3% após a autoclavagem). Além disto, os grãos após autoclavagem ficaram menos gelatinosos e mais soltos, o que facilita o processo de produção do fungo. Enquanto que os arrozes dos tipos brancos polidos, canjicão e integral ficaram pegajosos e formaram grumos, o que provavelmente deve acarretar em menor superfície de desenvolvimento para o fungo. O segundo melhor arroz, o canjicão, com produção de 3,42 x 10^9 conídios.g^{-1}, teve a maior quantidade de fungos contaminantes nos grãos crus. Quantidades intermediárias de conídios foram produzidas pelos arrozes branco polido irrigado, de terras altas e orgânico. O integral foi o que resultou na menor quantidade de conídios (1,53 x 10^9 conídios.g^{-1}), sendo o mais rico em minerais, proteína bruta e extrato etéreo. Nenhum dos aditivos (farelo de soja, grãos de soja partidos, extrato de soja, peptona de soja, inibidores de proteinases de soja semi-purificados e purificado do tipo Kunitz, polpa cítrica e levedura) resultou em aumento na produção de conídios em comparação com o arroz parboilizado sem aditivos. Os conídios produzidos em todos os arrozes e aditivos apresentam viabilidade superior a 99%. As vantagens da utilização do arroz parboilizado levando-se em consideração custo, facilidade de manuseio e produtividade são discutidas.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*; Controle microbiano; Entomopatógeno; Inibidores de proteinases; Kunitz; Arroz; Produção massal; Esporulação; Virulência

ABSTRACT

Influence of quality of different types of rice and proteinase inhibitors on yield and virulence of conidia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales)

In order to optimize the production process of *Metarhizium anisopliae*, the present study aimed to determine the effects of soybean proteinase inhibitors on growth, sporulation and virulence of the fungus and to compare yield, viability and virulence of *M. anisopliae* conidia produced in different types of rice and additives. The addition of 5 $g.L^{-1}$ of semi-purified soybean proteinase inhibitor or 0.5 $g.L^{-1}$ of Kunitz-type inhibitor purified on the culture medium ME resulted in large increases in sporulation (two to 75 times) without affecting the viability of conidia of four *M. anisopliae* isolates (ESALQ-1037, IBCB348, E9, F20). The presence of proteinase inhibitors altered morphology of conidia produced in ME. Mechanisms responsible for these physiological changes in the fungus have not been determined, but it is probably associated to an anti-nutritional action, reducing the absorption of protein and stimulating sporulation. Spores produced in the medium with the addition of 0.5 $g.L^{-1}$ Kunitz-type inhibitor purified or 2.5 $g.L^{-1}$ of bovine serum albumin (BSA) and PDA medium showed higher virulence of conidia produced in ME without inhibitors. When the Kunitz-type inhibitor was added to conidial suspension of the fungus before spraying larvae of *Diatraea saccharalis*, control efficiency was 35.1% lower than that presented in other inhibitor-free treatments. In the studies aiming to determine the best types of rice for production of *M. anisopliae*, we tried to correlate production of conidia with characteristics of these substrates such as nutritional content, pesticide residues and density of microorganisms. The parboiled rice was responsible for greater production of conidia (4.38×10^9 $conidia.g^{-1}$). This type of rice showed crude protein content lower than most rice and the highest moisture content (41.3% after autoclaving). Besides that, grains became less gelatinous and loose after autoclaving, and these feature favored fungus production. While types of polished white, brown rice and course (broken) rice grain were sticky and formed clumps, providing a smaller area for fungus development. The second best rice, course rice grain, with production of 3.42×10^9 $conidia.g^{-1}$, had the highest amount of fungal contaminants in raw grains. Intermediate amounts of conidia were produced by white irrigated polished rice, upland rice and organic rice. The brown rice was the kind that resulted in fewer conidia (1.53×10^9 $conidia.g^{-1}$), being the richest in minerals, protein and lipids. None of the additives (soybean meal, soybean parties, soy extract, soy peptone, semi-purified soybean proteinase inhibitor, Kunitz-type inhibitor purified, citrus pulp and yeast) resulted in increased production of conidia compared to parboiled rice without additives. Conidia produced in all types of rice and additives presented viability greater than 99%. The advantages of the use of parboiled rice taking into consideration the cost, easy handling and productivity are discussed.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*; Microbial control; Entomopathogen; Proteinase inhibitors; Kunitz; Rice; Mass-production; Sporulation; Virulence

1 INTRODUÇÃO

O controle biológico tem sido explorado desde séculos passados, porém, com a descoberta do DDT em 1939, ocorreu um rápido incremento do emprego de inseticidas químicos na agricultura e um menor interesse pelo controle biológico. Com o aumento do uso dos "defensivos" surgem os efeitos negativos como o desequilíbrio da microbiota do solo, da fauna e flora, além de favorecer a seleção de pragas resistentes, resultantes da forte pressão de seleção exercidas pelos pesticidas. Os problemas ligados ao uso de inseticidas tradicionais despertaram nos pesquisadores um maior interesse por uma agricultura sustentável e pela prática do controle biológico. E é diante desde cenário, de conscientização, que o controle biológico em suas diversas estratégias ressurge com fôlego novo.

O controle microbiano de pragas é uma estratégia de controle biológico merecedora de destaque, já que os bioinseticidas á base de agentes entomopatogênicos, constituem um método efetivo no controle de artrópodes-pragas. Dentre esses agentes, os fungos entomopatogênicos, se adaptam bem à produção *in vitro*, e por não agredirem o meio ambiente, os animais e o homem têm sido utilizados como alternativa aos inseticidas químicos convencionais.

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin tem se destacado nas últimas décadas, porém para ser utilizado no controle microbiano como inseticida, o fungo precisa estar disponíveis em grande quantidade. No Brasil, mesmo para a comercialização, os fungos entomopatogênicos ainda são produzidos em escala semi-industrial, já que o sistema de produção se caracteriza pelo elevado uso de mão-de-obra, e pequena automatização do processo. A produção nacional de *M. anisopliae* se dá sobre o substrato arroz, sendo o arroz polido (branco) o principal tipo utilizado.

Sabe-se que a composição do meio (substrato) de produção exerce influência sobre a produtividade, viabilidade e virulência de conídios, porém os estudos realizados no país têm considerado apenas o aspecto quantitativo da produção ignorando o aspecto qualitativo (viabilidade, virulência). Neste sentido, também existem especulações quanto ao melhor tipo de arroz e utilização de aditivos para se produzir *M. anisopliae*, no entanto faltam informações confiáveis, justificando-se assim, o estudo destes fatores.

Melhorar importantes parâmetros no processo de produção de *M. anisopliae* para garantir maior eficiência no controle de pragas foi o objetivo geral deste trabalho. Especificamente

objetivou-se determinar os efeitos de inibidores de proteinase sobre o desenvolvimento, produção de conídios e virulência de *M. anisopliae*, além de avaliar diferentes tipos de arroz (*Oryza sativa*, L.) e diferentes aditivos a serem utilizados como substrato no sistema de produção do fungo para incrementar seu rendimento e a sua virulência.

Desta forma, este trabalho foi dividido em duas partes. A primeira parte destinou-se ao estudo da ação de inibidores de proteinase sobre *M. anisopliae*, na qual se constatou o efeito destes no crescimento vegetativo e esporulação do fungo. Verificou-se, ainda, que a adição dos inibidores no meio de cultura do fungo, assim como, na suspensão de conídios pode influenciar a virulência do entomopatógeno. A segunda parte do trabalho foi destinada propriamente ao processo de produção do fungo. Nesta fase o objeto de estudo foi a matéria prima utilizada como substrato de produção. Diversos de tipos de arroz (arroz polido branco produzido em sistema irrigado e em sistema de terras altas, arroz integral, arroz parboilizado, arroz orgânico e arroz canjicão) foram testados quanto as variáveis produtividade e qualidade de conídios. Além disso, efetuou-se a análise de resíduos de agrotóxicos, a análise microbiológica e nutricional nas amostras de arroz com intuito de correlacionar a produção de *M. anisopliae* com a qualidade da matéria prima empregada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Controle microbiano

Debach, Fleschner e Dietrick (1951, p.763) definiram o controle biológico como “a ação de inimigos naturais sobre uma população de pragas resultando numa posição geral de equilíbrio mais baixo do que prevaleceria na ausência deste”. O controle microbiano de pragas é um dos métodos de controle biológico que mais tem se desenvolvido na última década, sendo empregado em diversas culturas, devido à sua eficiência, custo e menor risco ambiental, pois, procura preservar, restabelecer e/ou imitar os mecanismos naturais de redução das populações de pragas. Além disso, tem importante contribuição social, gerando empregos em empresas denominadas biofábricas.

Diversos microorganismos podem ser empregados no controle microbiano de pragas, como por exemplo, bactérias, protozoários, vírus, nematóides e fungos. Os fungos patogênicos apresentam certas vantagens em relação aos outros microorganismos já que possuem uma ampla gama de hospedeiros, se encontram amplamente distribuídos no solo e apresentam boa dispersão de um hospedeiro infectado para outro não infectado. A infecção se dá via tegumento não sendo necessária a ingestão. Além disto, os fungos não são infecciosos para humanos ou outros vertebrados. Podem ser facilmente produzidos *in vitro* em laboratório e/ou escala industrial (KAMP; BIDOCHA, 2002; SUN; FUXA; HENDERSON, 2003; WANG; POWELL, 2004).

“Aproximadamente 80% das doenças de insetos conhecidas até o momento têm com agente etiológico os fungos, pertencentes a cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies” (ALVES, 1998, p. 289). Dentre os fungos entomopatogênicos destacam-se espécies dos gêneros, *Lecanicillium*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Paecilomyces*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Neozygites*, *Batkoa*, *Hirsutella*, *Nomurea*, *Sporothrix*, *Metarhizium* e *Beauveria* (ALVES, 1998). *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin são os mais empregados no controle de pragas (ALVES et al., 2008), fato que provavelmente se deva a ampla distribuição geográfica, ampla gama de hospedeiros e a ampla variabilidade genética destas duas espécies.

O primeiro estudo de controle microbiano utilizando um fungo entomopatogênico foi realizado pelo zoologista e patologista russo Ilya Mestchnikoff que, em conjunto com

Krassilstschic, aplicou *M. anisopliae* sobre *Cleonus puctiventris*, curculionídeo praga da beterraba (LATCH, 1965). A partir dessa época, diversas linhagens de *M. anisopliae* vêm sendo estudadas para o controle de várias espécies de insetos (ALVES, 1998).

No Brasil, os fungos entomopatogênicos, vêm sendo estudados desde 1923, quando Pestana identificou duas espécies de cigarrinhas infectadas por *M. anisopliae*, que ele chamou naquela ocasião de *Penicillium anisopliae*. Na década de 40, estudos experimentais sobre o uso de fungos entomopatogênicos para controle de cigarrinhas da cana-de-açúcar voltaram a ser realizados, no estado de Sergipe. O italiano Pietro Guagliumi realizou vários trabalhos de laboratório e de campo, a partir de 1955, sobre controle biológico de cigarrinhas da cana-de-açúcar e das pastagens por meio do fungo *M. anisopliae* (GUAGLIUMI, 1968). Depois disso, vários autores brasileiros passaram a avaliar a viabilidade do uso de fungos para o controle de diferentes espécies de insetos-praga.

Acredita-se que a espécie *M. anisopliae* ocorra naturalmente sobre mais de 300 espécies de artrópodes, em especial insetos e ácaros, incluindo pragas importantes (ROBERTS; St. LEGER, 2004). Atualmente, *M. anisopliae* é utilizado para controle de pragas em muitos países como EUA, Austrália, Irlanda, China e Brasil (LORD, 2005). Segundo Alves (1998), no Brasil os principais programas de controle de pragas empregando este entomopatógeno são o controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata* e *Mahanarva fimbriolata*), das cigarrinhas das pastagens (*Deois* sp. e *Zulia* sp.), do cupim das pastagens (*Cornitermes cumulans*) e da cana-de-açúcar (*Heterotermes* sp.), do gorgulho da cana-de-açúcar (*Metamasuis hemipterus*), da broca da bananeira (*Cosmopolites sordidus*) e da broca dos citrus (*Diploschema rotundicolle*), entre outros ainda em processo de desenvolvimento.

Diversos autores têm demonstrado a patogenicidade de *M. anisopliae* sobre carrapatos de diferentes gêneros e espécies como, por exemplo, *Boophilus microplus*, *Ixodes scapularis* e *Amblyomma variegatum* (BITTENCOURT; MASCARENHAS; FACCINI, 1999; FERNANDES et al., 2004; GINDIN, 2002; KAAYA, 2000; KIRKLAND; WESTWOOD; KEYHANI, 2004; MANGARA et al., 2005; MILNER, 2000). A ação patogênica de *M. anisopliae* sobre vetores de doenças humanas também tem sido alvo de estudos, como por exemplo, o controle do vetor da doença de Chagas (*Triatoma infestans*), da malária (*Anopheles gambiae*) (SCHOLTE; KNOLS; TAKKEN, 2006), da filariose (*Culex quinquefasciatus*), do vetor do vírus da dengue (*Aedes aegypti*) (JUAREZ et al., 2000; SCHOLTE et al., 2003; SCHOLTE; TAKKEN; KNOLS, 2007).

Entretanto, alguns fatos têm limitado o aumento do uso do controle microbiano com fungos em várias culturas. Um dos problemas para a aceitação de micoinseticidas no mercado de controle biológico é o maior tempo necessário entre a aplicação do biopesticida e a morte da praga quando comparado aos pesticidas convencionais. Além disso, é necessário que haja condições ambientais favoráveis como temperatura, umidade e luminosidade para que sejam eficientes, pois a atividade fúngica é fortemente influenciada pelas condições bióticas e abióticas (PELL et al., 2001). Desta forma, pesquisas referentes ao controle microbiano de pragas vêm de encontro à demanda da sociedade, de produtores e consumidores por alimentos mais saudáveis, e podem sobremaneira contribuir para que esta tecnologia alcance a totalidade de seu potencial de uso.

2.2 O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*

Segundo a classificação de Sung et al. (2007), o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin, em sua fase anamórfica, pertence ao filo Ascomycota, a classe Sordariomycetes (Pyrenomycetes), a ordem Hypocreales, família Clavicipitaceae e foi descrito pela primeira vez como *Entomophtora anisopliae*, pelo russo Ilya Mestchnikoff em 1879, quando foi isolado de larvas do besouro do grão do trigo *Anisopliae austriaca* (Coleoptera: Scarabaeidae). Posteriormente, em 1883, Sorokin o classificou como *Metarhizium anisopliae* (ALVES, 1998). Tulloch (1976) com base em caracteres morfológicos admitiu apenas duas espécies *M. flavoviride* e *M. anisopliae*, sendo a última dividida em var. *majus* ou var. *anisopliae*. Posteriormente, Driver, Milner e Trueman (2000) e Pantou, Manvridou e Typas (2003) baseando-se em caracteres morfológicos e moleculares reconheceram três espécies para *Metarhizium*: *M. anisopliae*, variedades *anisopliae*, *majus*, *lepidiotum* e *acridum*; *M. flavoviride*, variedades *flavoviride*, *minus*, *novazealandicum*, *pemphigum* e Tipo E; e *M. album*. Segundo Dong et al. (2007) uma nova variedade para *M. anisopliae* foi descrita na China com a denominação *Dcjhyium*.

Porém recentemente, Bischoff, Rehner, e Humber (2009) fizeram significativas alterações na classificação do complexo *M. anisopliae*. Os autores elevaram ao nível de espécies: *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, e *M. majus*. Adicionalmente, descreveram duas novas espécies *M. globosum* e *M. robertsii*, trazendo de volta

o nome *M. brunneum*, e mostraram que *M. taii* é sinonímia posterior a *M. guizhouense*. A variedade proposta por Dong et al. (2007) foi dada como *nomen nudum*, devido a não designação de um holótipo.

M. anisopliae, a mais comum das espécies, morfologicamente apresenta micélio hialino e septado, com conidióforos característicos ramificados do tipo fiálides, sobre os quais surgem conídios cilíndricos organizados em colunas. As fiálides clavadas ou cilíndricas são originárias do vértice de hifas e se colocam uma ao lado da outra. Os conídios, em geral, são hialinos ou com leve pigmentação, não septados (ALVES, 1998; BOCIAS; PEDLAND, 1998).

O fungo tem ciclo de vida simples, as suas formas de reprodução conhecidas compreendem a fase assexual, própria do desenvolvimento vegetativo da espécie, e a parassexual, como alternativa para troca de material genético, caracterizada por fenômenos como heterocariose e a recombinação somática (ROBERTS; St. LEGER, 2004; WANG; TYPAS; BUTT, 2002). Os teleomorfos são raros, atualmente, três espécies de Metacordyceps, sendo elas *Metacordyceps brittlebankisoides*, *Metacordyceps campsosterni* e *Metacordyceps taii* são conhecidos como teleomorfos de *Metarhizium*. Para a fase teleomórfica *Metacordyceps brittlebankisoides*, o anamorfo é *M. majus* (= *M. anisopliae* var. *major*). (LIANG; LIU; LIU, 1991; LIU et al. 2001; SUNG et al., 2007; ZHANG et al. 2004).

Quando cultivado *in vitro*, normalmente, o desenvolvimento vegetativo ocorre entre 15 e 32°C e pH entre 2,0 e 8,5, estando a temperatura ótima entre 24 e 30°C e o pH ótimo é de 6,9. Apresentam pouca exigência nutricional *in vitro*, sendo o amido uma excelente fonte de carboidrato (ALVES, 1998; DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000).

No hospedeiro, a infecção é iniciada pelos conídios, produzidos assexuadamente, que em contato com a cutícula do hospedeiro suscetível se fixa e germina (SHAH; PELL, 2003). O processo de infecção de *M. anisopliae* ocorre em fases sucessivas de germinação, diferenciação, penetração, colonização, reprodução e disseminação (ALVES, 1998). A infecção inicia-se pela adesão e germinação de conídios do fungo na superfície do artrópode, seguida de penetração da hifa através da cutícula. Na penetração estão envolvidos os fatores físicos (pressão da hifa que rompe áreas membranosas ou esclerosadas) e químicos, resultante da liberação, pelo fungo, de enzimas (esterases, proteases, lipases e quitinases) que facilitam a penetração mecânica.

As proteases produzidas pelo fungo têm importante papel no processo de infecção de insetos, estando estas proteases envolvidas na hidrólise dos componentes cuticulares

(predominância de proteínas) facilitando a penetração da hifa através da cutícula dos insetos. Uma enzima do tipo subtilisina, denominada Pr1, destaca-se entre as principais enzimas produzidas por *M. anisopliae* durante a infecção para degradar o tegumento do hospedeiro (St. LEGER et al., 1989). Os insetos colonizados se tornam rígidos e cobertos por uma camada pulverulenta uniforme de conídios de coloração verde sobre o cadáver, por isso, a doença é conhecida como muscardine verde.

2.3 Produção de fungos entomopatogênicos

A produção de microorganismos entomopatogênicos representa uma importante fase no desenvolvimento desses agentes como produto microbiano. Dependendo do microorganismo, da estratégia de aplicação, do potencial de inóculo necessário, entre outros fatores, a produção pode ser dar em diferentes escalas e processos. Para serem utilizados no controle microbiano como inseticidas, os fungos entomopatógenos precisam estar disponíveis em grande quantidade. A produção pode ser feita *in vivo*, usando o inseto hospedeiro, ou *in vitro*, através de processos fermentativos simples ou complexos, empregando-se meios adequados. Cada um desses processos de produção apresenta vantagens e desvantagens, sendo destacada a praticidade da produção *in vitro*, porém, atualmente, nem todos os fungos entomopatogênicos podem ser produzidos sobre meios artificiais de maneira eficiente.

Os fungos entomopatogênicos apresentam diferentes estruturas de sobrevivência e disseminação que podem ser empregadas no controle microbiano de pragas. A forma de produção, assim, como a escolha da estrutura do fungo a ser utilizada, depende da espécie, do isolado, da praticidade na sua produção, do ambiente onde será aplicado o fungo e do método de aplicação. Na maioria dos fungos, a estrutura utilizada é o conídio, blastosporo ou micélio, sendo as duas primeiras estruturas as preferidas por serem infectivas ao hospedeiro (LEITE et al., 2003).

Os conídios são estruturas com função de reprodução e disseminação e para sua produção fazem-se necessárias condições de aeração, ou seja, são produzidos em meios sólidos ou na superfície do meio liquido. Esses propágulos são adequados para uso no controle microbiano de pragas, pois, são mais resistentes as condições adversas do ambiente. Os blastosporos são produzidos por brotamento, segmentação ou fragmentação da hifa. A escolha pela produção

dessa estrutura se deve a possibilidade de ser produzida submersa no meio de cultura, o que facilita o processo de produção, antecipa o tempo de colheita, além de possibilitar uma maior produção de unidades infectivas por volume de meio (TORRE; CÁRDENAS-COTA, 1996). O micélio que é composto por estruturas ramificadas geradas a partir do tubo germinativo, blastosporo ou corpo hifal é produzido em ambos os processos. A secagem do micélio pode induzir o fungo a um estado de baixo metabolismo, permitindo seu armazenamento por maior período. Por ocasião da aplicação, em condições favoráveis o fungo reabsorve umidade e entra em conidiogênese produzindo o conídio que é a forma infectiva (LEITE et al., 2003).

Dependendo do propágulo desejado e da espécie a ser produzida, segundo Alves e Pereira (1998), os fungos podem ser produzidos sobre meios artificiais utilizando-se três processos ou métodos: 1) meios líquidos ou fermentação submersa; 2) meios sólidos ou semi-sólidos; 3) fermentação bifásica, na qual são utilizados os meios líquidos ou semi-líquidos para o crescimento vegetativo e em seguida substratos sólidos para a conidiogênese. A vantagem da fermentação sólida é que o processo requer poucos equipamentos, é relativamente barata e o substrato pode ser adquirido facilmente (CASTILHO et al., 2000).

Com base no volume e no destino da produção dos fungos, entre os diversos sistemas de produção, são reconhecidas três escalas: 1) laboratorial ou experimental, que visa a produção de pequenas quantidades de material destinadas a experimentos de laboratório; 2) artesanal ou semi-industrial, quando quantidades intermediárias de material são produzidas para experimentos maiores, comercialização e utilização em aplicações de campo; 3) industrial, que visa a obtenção de grandes quantidades de material destinadas ao mercado consumidor.

No Brasil, mesmo para a comercialização, os fungos entomopatogênicos ainda são produzidos em escala semi-industrial, já que o sistema de produção se caracteriza pelo elevado uso de mão-de-obra, e pequena automatização do processo. A produção industrial altamente automatizada está presente em países como os Estados Unidos, onde a mão-de-obra tem custo elevado. Neste sistema os meios de cultura são especialmente preparados e os equipamentos desenvolvidos especificamente para produção de microorganismos a serem utilizados no controle microbiano de pragas (ALVES; PEREIRA, 1998; ALVES et al., 2008).

A produção massal de fungos entomopatogênicos no Brasil é tradicionalmente realizada empregando-se arroz cozido como substrato (FARIA; MAGALHÃES, 2001). Após a colonização do arroz pelo microrganismo, a mistura "arroz + fungo" é triturada e comercializada

na forma de pó molhável. Alternativamente, a mistura "arroz + fungo" é vendida sem trituração, ficando a cargo dos produtores rurais a tarefa de lavar o substrato com água para remoção dos esporos.

Alves et al. (2008) relatam que atualmente a produção de fungos entomopatogênicos está em torno de 2518,5 toneladas de arroz ao ano. Destes, *M. anisopliae* é o mais produzido no país, sendo responsável por aproximadamente 90% do volume produzido. Na Tabela 1 tem-se uma estimativa da área tratada anualmente para o controle de diferentes insetos-pragas. Além das biofábricas, universidades e institutos de pesquisa, algumas usinas de cana-de-açúcar, também produzem os fungos *M. anisopliae*, neste caso para consumo próprio.

Tabela 1.1 - Produção anual de fungos entomopatogênicos no Brasil: Empresas privadas, usinas de açúcar e álcool e órgãos oficiais

(continua)

Local	**Espécie**	**Produção anual (t)**	**Praga-alvo**	**Área tratada (ha)**
		ÓRGÃOS OFICIAIS		
Ceib (SP)	*S. insectorium*	2	Perccevejo-de-renda	2.000 (Sudeste)
IPA (PE)	*M. anisopliae*	5	Cercopídeos	2.500 (Nordeste)
IPA (PE)	*B. bassiana*	1	Moleque-da-bananeira	3.3000 (Nacional)
Asplan (PB)	*M. anisopliae*	40	Cercopídeos	20.000 (Nordeste)
Arpb/GOV	*M. anisopliae*	6	Cercopídeos	4.000 (Nordeste)
Empaer (MT)	*M. anisopliae*	...	Cercopídeos	
	B. bassiana	20	Moleque-da-bananeira	10.000 (Centro-Oeste)
	Sporothrix	...	Perccevejo-de-renda	
Total		74		41.800
		EMPRESAS PRIVADAS		
Biotech (AL)	*M. anisopliae*	450	Cercopídeos	10.00 (Nordeste)
				35.000 (Sudeste)
Bioagro (AL)	*M. anisopliae*	700	Cercopídeos	20.000 (Nordeste)
				50.000 (Sudeste)
	B. bassiana	20	Diversos	2.000 (Nacional)
Fitossan (AL)	*M. anisopliae*	170	Cercopídeos	12.500 (Nordeste)
				5.000 (Sudeste)

Tabela 1.1 - Produção anual de fungos entomopatogênicos no Brasil: Empresas privadas, usinas de açúcar e álcool e órgãos oficiais

(continuação)

Laboratório	**Espécie**	**Produção anual (t)**	**Praga-alvo**	**Área tratada (ha)**
		EMPRESAS PRIVADAS		
Probio (AL)	*M. anisopliae*	60	Cercopídeos	6.000 (Nordeste)
Bioplan (AL)	*M. anisopliae*	10	Cercopídeos	1.000 (Nordeste)
BioCana (SP)	*M. anisopliae*	58	Cercopídeos	12.000 (Sudeste)
Itaforte BioProdutos (SP)	*M. anisopliae*	110	Cercopídeos	50.000 (Nacional)
	B. bassiana	16	Diversos	5.000 (Nacional)
	Lecanicillium	12,5	Orthezia	3.000 (Sudeste)
BioCerto (DF)	*M. anisopliae*	28	Cercopídeos	28.000 (Nacional)
Toyubo do Brasil (SP)	*M. anisopliae*	5	Cercopídeos	1.000 (Sudeste)
	B. bassiana	40	*Sphenophorus levis*	4.000 (Sudeste)
Methavida (SP)	*M. anisopliae*	62	Cercopídeos	15.000 (Sudeste)
Total		1.941,50		319.500
		USINAS DE AÇÚCAR E ÁLCOOL		
Santa Clotilde (AL)	*M. anisopliae*	55	Cercopídeos	3.700 (Nordeste)
Agroserra (MA)	*M. anisopliae*	30	Cercopídeos	3.000 (Nordeste)
Triunfo (AL)	*M. anisopliae*	35	Cercopídeos	3.500 (Nordeste)
Utinga Leão (AL)	*M. anisopliae*	36	Cercopídeos	3.600 (Nordeste)
Santa Antônio (AL)	*M. anisopliae*	14	Cercopídeos	1.195 (Nordeste)
Guaxuma (AL)	*M. anisopliae*	9	Cercopídeos	900 (Nordeste)
Roçadinho (AL)	*M. anisopliae*	9	Cercopídeos	1.663 (Nordeste)
OlhoDágua (PE)	*M. anisopliae*	5	Cercopídeos	6.000 (Nordeste)
Cruangi (PE)	*M. anisopliae*	5	Cercopídeos	2.000 (Nordeste)
	B. bassiana	0,5	Diversos	
Itajobi (SP)	*M. anisopliae*	8	Cercopídeos	2.000 (Sudeste)
Grupo Cosan (SP)	*M. anisopliae*	98	Cercopídeos	49.000 (Sudeste)
CTC (SP)	*M. anisopliae*	3	Cercopídeos	1.000 (Sudeste)
	B. bassiana		*Sphenophorus levis*	

Tabela 1.1 - Produção anual de fungos entomopatogênicos no Brasil: Empresas privadas, usinas de açúcar e álcool e órgãos oficiais

(conclusão)

Laboratório	**Espécie**	**Produção anual (t)**	**Praga-alvo**	**Área tratada (ha)**
		USINAS DE AÇÚCAR E ÁLCOOL		
Outras usinas associadas ao	*M. anisopliae*	22	Cercopídeos	10.000 (Sudeste)
CTC (SP)	*B. bassiana*	7,5	*Sphenophorus levis*	
São João (SP)	*M. anisopliae*	8	Cercopídeos	2.000 (Sudeste)
Jaijoro (AM)	*M. anisopliae*	8	Cercopídeos	2.500 (Norte)
Itamaraty (MT)	*M. anisopliae*	150	Cercopídeos	50.000 (Sudeste)
Total		503		142.058
Total geral		2.518,50		503.358

Fonte: Alves et al. (2008)

Nota: ... dado numérico não disponível.

2.4 Importância nutricional do meio de cultivo para *Metarhizium anisopliae*

A viabilidade, a germinação dos conídios, o desenvolvimento apressorial, o desenvolvimento e crescimento vegetativo, a conidiogênese, o número de conídios produzidos, a virulência, assim como a capacidade de sobreviver a condições adversas de umidade, luz (raios ultravioleta), temperatura e até a estabilidade do produto formulado com conídios de *M. anisopliae*, são alguns dos aspectos que já foram demonstrados serem influenciados pelo meio de cultura e condições de cultivo na produção do fungo.

Li e Holdon (1990) testaram o efeito de oito carboidratos, seis ácidos orgânicos, dezessete fontes de nitrogênio e seis vitaminas sobre a germinação de conídios, crescimento micelial e esporulação em meio sólido de dois isolados de *M. anisopliae*. Os carboidratos foram testados com peptona ou com nitrato de potássio como fonte de nitrogênio. A adição de carboidratos aumentou a esporulação. O crescimento foi drasticamente inibido quando se adicionou sorbose a ambas as fontes de nitrogênio, a germinação de conídios foi inibida em meio onde a fonte de nitrogênio era o nitrato de potássio. Em meio cuja fonte de nitrogênio era a peptona, a adição de amido resultou em grande esporulação, já a glicose, maltose e manose resultaram em maior

esporulação quando o meio tinha nitrato de potássio como fonte de nitrogênio. Os ácidos orgânicos oxálico, sórbico e tartárico inibiram completamente a germinação de conídios, já os ácidos acéticos, cítrico e málico reduziram o crescimento e a esporulação, enquanto que a germinação não foi afetada. Nitrato de sódio e amônia foram utilizados pelo fungo como fonte de nitrogênio, porém, este não foi capaz de aproveitar cisteína, que inibiu o crescimento e a esporulação. A adição de treonina, lisina e sulfato de amônia resultaram em maiores produções de conídios. Quanto às vitaminas, nenhuma aumentou o crescimento e/ou esporulação do fungo.

Os meios de cultura comerciais, sabouraud dextrose ágar (SDA), extrato de malte ágar (MEA), nutriente ágar (NA), farinha de milho ágar (CMA), extrato de levedura peptona dextrose ágar (YPD) e batata dextrose ágar (PDA), foram testados por Kamp e Bidochka (2002) com o propósito de observar a produção de conídios por *M. anisopliae*. No estudo, foram utilizados 10, 15 e 20 mL de cada meio para as colônias. Os autores observaram que a maior produção de conídios ocorreu no meio de batata dextrose ágar com volume de 10 mL, mostrando que a produção ótima de conídios não depende apenas do isolado utilizado, mas também do meio de cultura e do volume utilizado. De forma semelhante, o desenvolvimento vegetativo e esporulação de *M. anisopliae* em resposta à composição nutricional do meio de cultura, foram estudados por Jabor et al. (2003), sendo que os meios analisados foram o meio completo, o meio Sabouraud e meio batata dextrose ágar (PDA). O crescimento vegetativo foi maior em meio Sabouraud para os sete isolados analisados e, para a esporulação, três linhagens responderam melhor ao meio completo e três ao PDA.

Ibrahim, Butt e Jenkinson (2002) observaram que a adição de cloreto de potássio no meio Sabouraud dextrose ágar modificado (SDAM) reduziu significativamente a germinação de conídios de três isolados de *M. anisopliae*. Os autores também testaram o efeito de diferentes meios sobre a virulência do fungo contra *Myzus persicae* e *Meligethes aeneus*. Os conídios provenientes do meio SDAM acrescido com KCL apresentaram decréscimo na germinação e no desenvolvimento apressorial sobre a cutícula dos hospedeiros. Já os conídios produzidos em meio SDAM e no meio mínimo (MM) foram mais agressivos quando comparados aos meios SDA ou YPD.

Para observar a influência do substrato de produção sobre a virulência dos conídios do fungo, Santoro et al. (2007) utilizaram quatro isolados de *B. bassiana* que foram produzidos em meio sintético para geração de esporos, arroz pré-cozido e o próprio inseto. Os autores

verificaram que conídios de dois isolados, produzidos em insetos, foram menos virulentos que os produzidos em arroz e meio sintético. Porém, não foi possível estabelecer qual o melhor substrato, pois cada isolado se comportou de maneira distinta, possivelmente em razão da variabilidade genética entre eles, o que pode ter proporcionado um melhor ou pior aproveitamento dos nutrientes em determinado meio, provocando, assim, diferenças na virulência para os conídios produzidos em diferentes substratos. Este estudo mostrou que o meio de cultura afeta a virulência dos conídios produzidos, por isso, é importante a seleção do meio de cultura que será utilizado para produzir o fungo em larga escala.

A virulência de conídios é fortemente dependente das condições nutricionais durante o cultivo de *M. anisopliae* (SHAH; WANG; BUTT, 2005). Conídios mais virulentos foram obtidos quando o fungo foi cultivado no inseto hospedeiro (*Tenebrio molitor*), em meio de estresse osmótico (5,5% de ágar, 8% de glucose, 2% de peptona e 5,5% de cloreto de potássio), em meio com baixa relação carbono nitrogênio de 1:10 (0,6% de glucose, 1% de peptona e 2% de ágar) e em meios pobres em nutrientes (2% de ágar e 1% de extrato de levedura ou 2% de peptona). A maior virulência foi apresentada por conídios cultivados em meio pobre com 1% de extrato de levedura. Hallsworth e Magan (1994, 1995) observaram que a redução de glicerol, eritritol ou trialose no meio resultou na produção de conídios de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Paecilomyces farinosus* mais virulentos, o que confirma a relação existente entre o meio de produção e a virulência.

Shah, Wang e Butt (2005) observaram que apesar de produzir conídios virulentos, o meio de estresse osmótico não permite que o fungo cresça e a conidiação é drasticamente reduzida. O rendimento máximo de conídios foi alcançado no meio com relação C:N de 35:1, relação semelhante à do meio SDA. Dois isolados de *M. anisopliae*, SQZ-1-21 e RS-4-1, testados por Sun e Liu (2006), diferiram na taxa de crescimento e esporulação, SQZ-1-21 cresceu mais rápido do que o RS-4-1, na maioria dos meios de cultura. Os autores substituíram a glucose de um meio básico de cultura por diversas fontes de carbono, ácidos orgânicos e álcoois. A D-manose e a gelatina foram boas fontes de carbono para o crescimento da colônia de RS-4-1, e para SQZ-1-21, além dessas fontes, a pectina também se mostrou adequada. A fonte de carbono afetou mais a conidiogênese do isolado RS-4-1 do que o isolado SQZ foi-1-21, apenas três fontes de carbono, D-manose, gelatina, e D-frutose, foram boas para o primeiro isolado RS-4-1. A manose e a frutose, que foram ótimas fontes de carbono para o crescimento hifal, também favoreceram a

esporulação. No entanto, a esporulação foi inibida quando a glicose, sacarose, ou xilose foram usadas como a única fonte de carbono, embora que, estes açúcares foram adequados para o crescimento vegetativo do isolado RS-4-1. A agarose foi a fonte mais adequada para RS-4-1 resultando no maior rendimento esporos por grama. Para o isolado SQZ-1-21 diversos monossacarídeos, como D-manose, D-xilose e D-glicose, e muitos dissacarídeos foram bons para a esporulação, porém o maior rendimento de conídios foi conseguido quando adicionou-se metanol.

A influência do estresse sobre a velocidade de germinação dos conídios *in vitro*, a aderência à cutícula do inseto e a virulência ao inseto hospedeiro (*Tenebrio molitor*) foram aspectos estudados por Rangel, Alston e Roberts (2008). Observou-se que os conídios mostraram-se mais virulento, com taxas de germinação mais rápidas e com maior capacidade de adesão ã cutícula do hospedeiro quando foram produzidos em meio mínimo (MM: 0,2% de nitrato de sódio, 0,1% de fosfato de potássio, 0,05% de sulfato de magnésio, 0,05% cloreto de potássio, 0,001% de sulfato ferroso e 1,5% de Bacto Ágar) suplementado com lactose (3g.L^{-1} de α-lactose e sem sucrose). O meio com alta osmolaridade (PDAY com 0,8 M de cloreto de sódio ou cloreto de potássio) produziu conídios com maior virulência e germinação mais rápida do que conídios produzidos sobre o meio controle (PDAY: batata dextrose ágar, acrescido de 1 g.L^{-1} de extrato de levedura), o mesmo não ocorreu para os meios com a menor osmolaridade (PDAY com 0,6 M de cloreto de sódio ou cloreto de potássio). Conídios produzidos a partir de micélio irradiado com UV-A, durante o crescimento vegetativo em PDAY, apresentaram nível de virulência semelhante aos de conídios produzidos no meio mínimo, e a germinação não aumentou. Os tratamentos com peróxido de hidrogênio (PDAY com 5 mM peróxido de hidrogênio) e choque térmico (micélio, em meio PDAY, submetido a 45°C por 40 min) não alteraram a virulência.

A resistência a condições desfavoráveis como, por exemplo, a radiação solar também pode ser alterada em função do meio em que *M. anisopliae* é cultivado. Este fato foi verificado por Rangel, Anderson e Roberts (2006) que cultivaram o fungo em meio de batata dextrose ágar com extrato de levedura (PDAY), em meio mínimo (MM, meio Czapek sem sacarose) ou em meio mínimo com dezesseis diferentes fontes de carbono. Os autores observaram que conídios produzidos sob estresse nutritivo (MM ou MM suplementados com diferentes fontes de carbono não-preferenciais, por exemplo, frutose, galactose, lactose) apresentavam pelo menos duas vezes

maior tolerância do que os conídios produzidos em meio rico (PDAY). A quantidade de trealose e manitol endógenos acumulada em conídios produzidos em meio mínimo ou meio mínimo com MM ou com lactose (fonte de carbono não-preferencial) foi o dobro daquela acumulada quando cultivados em meio mínimo acrescido de glicose. Trealose e manitol, substâncias presentes nos conídios, têm a função de protegê-los contra uma ampla gama de fatores estressantes. Porém, o número de conídios produzidos foi mais abundante em PDAY.

Submeter *M. anisopliae* a condições estressantes durante o desenvolvimento vegetativo, também, pode tornar os conídios mais resistentes a outras condições adversas. Conídios produzidos sob estresse nutritivo (meios pobres), estresse de choque térmico, estresse osmótico (cloreto de sódio ou de potássio adicionado ao PDAY) foram mais resistentes ao calor e mais tolerantes a radiação UV-B do que conídios produzidos em meio rico em nutrientes (PDAY), sem choque térmico e estresse oxidativo (RANGEL; ANDERSON; ROBERTS, 2008). Porém, os conídios cultivados com estresse nutritivo acumularam as maiores concentrações de trealose e manitol, enquanto que o estresse osmótico resultou nos menores níveis de manitol e trealose acumulados. Isso indica que a acumulação destes compostos não é o único mecanismo utilizado por *M. anisopliae* para proteção do calor e da radiação UV-B e que vários mecanismos estão associados ao aumento da tolerância, sendo o acúmulo de trealose e manitol dentro conídios um dos mecanismos. O estresse oxidativo de radiação UV-A ou de peróxido de hidrogênio não elevaram a tolerância ao calor ou a radiação UV-B, sendo os níveis de manitol ou trealose nesses conídios semelhantes aos do controle. Novamente, os autores chamam a atenção para rendimento de conídios que foi reduzido, em alguns casos, severamente, pelo estresse nutritivo e osmótico, já o estresse oxidativo e choque térmico, não alteraram os níveis de produção (RANGEL; ANDERSON; ROBERTS, 2008).

Os trabalhos acima relatam estudos com meios específicos, os quais, não refletem a realidade de produção de fungos entomopatogênicos no Brasil. A produção nacional de *M. anisopliae* se dá sobre o substrato arroz e alguns estudos focando este substrato são relatados em seguida.

Frigo e Azevedo (1986) cultivaram seis isolados de *M. anisopliae* em meio completo (PONTECORVO et al., 1953), em meio de arroz (AQUINO, 1974) e em meios nutricionalmente intermediários. Os mesmos concluíram que para produção de conídios o meio de arroz foi o que produziu melhor resultado quando comparado ao meio mais complexo, sugerindo que meios

muito ricos ou muito pobres, acarretam diminuição na produção enquanto que meios intermediários promovem amento de produção. Em concordância, Rangel, Alston e Roberts (2008), também mostraram que melhores resultados são encontrados em meios nutricionalmente intermediários que permitem um bom crescimento vegetativo, conidiação e virulência, pois meios ricos produzem conídios de *M. anisopliae* com baixa virulência enquanto que meios pobres produzem conídios altamente virulentos, porém a quantidade produzida é limitante.

Utilizando três substratos de produção (arroz, cevada e sorgo) e valores variáveis de pH, umidade e extrato de levedura, Praskash, Padmaja e Kiran (2008) obtiveram o máximo rendimento de conídios, de *M. anisopliae*, com o substrato arroz em um pH de 7,01 com 22,34% de umidade. Cintra, Almeida e Batista Filho (2001) adicionaram ao arroz, para produção do fungo, aditivos como açúcares (sacarose, dextrose e lactose nas quantidades de 1%, 3% e 5%), proteínas (extrato de levedura, caseína e proteína de soja, nas quantidades de 0,01%, 0,1% e 1,0%) e sais minerais ($NaNO_3$ e KCL, nas quantidades de 0,001%, 0,01% e 0,1%). A adição de lactose e caseína em todas as concentrações e NaNO3 a 0,1%. Resultou em aumento na esporulação.

Assim, para viabilizar a produção massal de fungos entomopatogênicos a serem usados no controle microbiano de pragas é importante conhecer as características nutricionais e fisiológicas das espécies e dos isolados e as condições de cultivo que permitam obter bom crescimento com alta esporulação, viabilidade e virulência.

2.5 Inibidores de proteinases e a interação com *Metarhizium anisopliae*

Uma das classes mais abundantes de proteínas, os inibidores de proteinases, são encontrados em praticamente todas as formas de vida existente. Nos vegetais esses polipeptídios possuem a capacidade de se ligar às enzimas proteolíticas dos insetos fitófagos. Produzidos naturalmente, os inibidores de proteinases de plantas já foram extensivamente descritos (RYAN, 1990), sendo identificados em tecidos de plantas há aproximadamente 70 anos (READ; HAAS, 1938). Este grupo de proteínas está amplamente distribuído no reino vegetal, sendo particularmente abundantes em sementes e órgãos de reserva, fazendo parte do mecanismo de defesa das plantas contra o ataque de herbívoros e microorganismos patogênicos (HAQ; ATIF; KHAN, 2004; MOLOSOV; VALUEVA, 2005). As proteínas de defesa podem ser produzidas

constitutivamente em tecidos que são particularmente vulneráveis ao ataque de insetos, como as sementes, ou podem ser induzidos por danos mecânicos (WALKER et al., 1998, 2000).

Os inibidores, de acordo com a homologia entre as estruturas primárias e terciárias, o aspecto evolutivo e principalmente de acordo com a proteinase que inibem, são classificados em: serino, cisteíno, aspártico e metaloproteinaes (HAQ; ATIF; KHAN, 2004). Os inibidores mais estudados são os de serinoproteinases que são compostos por: (i) família Kunitz, (ii) família Bowman-Birk, (iii) família de inibidores tipo I de batatas, (iv) família de inibidores tipo II de batatas, (v) família de inibidores de abóbora e (vi) família de inibidores de tripsina e α-amilase que são característicos de semente de cereais (LASKOWSKI; KATO, 1980; WIECZOREK et al., 1985). Os inibidores de proteinases mais abundantes também são aqueles capazes de inibir as serino-proteases, grupo das tripsinas e quimiotripsinas, enzimas encontradas principalmente em insetos da ordem Lepidóptera (TERRA; FERREIRA, 1994). Eles são encontrados em altas concentrações em sementes de leguminosas e em quantidades menores em cereais e tubérculos. Um dos mecanismos de ação de um inibidor de proteinase baseia-se na inibição competitiva de uma proteinase, via bloqueio de sua atividade proteolítica (FRIZZAS; CUNHA; MACEDO, 2004).

Os inibidores de proteinase do tipo Kunitz e Bowman-Birk estão presentes em plantas de soja. Os do tipo Kunitz apresentam peso molecular aproximadamente de 20 kDa e sua ação ocorre principalmente sobre enzimas tripsinas (LIENIER, 1994). Já os do tipo Bowman-Birk têm atividade predominantemente anti-tripsina e anti-quimiotripsina e possuem peso molecular de 6 a 9 kDa (GARIANI; LEATHERBARROW, 1997).

A interação entre plantas, insetos fitófagos e inibidores de proteinase são a que tem sido comumente alvo de estudo. Simões (2007) estudou o efeito dos inibidores de proteinase de soja purificados e semi-purificados sobre organismos não-alvos. Estes estudos indicaram que a adição de 0,5% (p/v) de inibidores de proteinase de soja semi-purificados e de 0,05% (p/v) de inibidor purificado do tipo Kunitz em dois meios de cultura (ME – meio de esporulação e BDA – batata, dextrose e ágar) resultou em maior crescimento vegetativo e maior produção de conídios de *M. anisopliae*. A adição do inibidor purificado do tipo Kunitz conferiu um aumento médio na produção de conídios de 43% em meio de esporulação, superior a outra fonte protéica (albumina de soro bovino – BSA) usada como controle.

Lorito et al. (1994) observaram a ação antifúngica de inibidores de proteinase, tripsina e quimiotripsina, purificados de repolho (*Brassica oleracea* L.) sobre fungos fitopatogênicos em cultivo *in vitro*. Os inibidores em uma concentração de 150 $\mu g.mL^{-1}$ inibiram em 50% a germinação dos conídios e o alongamento de tubo de germinativo de duas espécies, *Botrysis cinera* (fitopatógeno polifago isolado de uva) e *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (fungo não patogênico a repolho), sendo que a inibição total ocorreu com a concentração de 600 $\mu g.mL^{-1}$. Porém, os mesmos inibidores não apresentaram nenhum efeito sobre o fungo *Alternaria brassicicola*, fitopatógeno específico de repolho. Da mesma forma, ao adicionar inibidores de proteinase de soja, os autores não observaram efeito sobre o crescimento e desenvolvimento dos fungos nas três espécies estudadas. Mosolov et al. (1976) observaram que a adição de inibidor de tripsina de batata reduziu a atividade de proteínas exógenas em filtrados de isolados fúngicos. Já o inibidor de protease do tipo Bowman-Birk, extraído de grãos de trigo foi responsável, em cultivo *in vitro*, por uma forte atividade antifúngica por meio da inibição do crescimento de hifas de diferentes fungos fitopatogênicos, incluindo o *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* e *Septoria tritici* (CHILOSI et al., 2000).

Não há relato na literatura quanto a interação de inibidores de proteases de soja e fungos entomopatogênicos, desta forma pesquisas básicas são necessárias para elucidar o incremento do crescimento e esporulação de *M. anisopliae* em meio de cultura contendo inibidor de protease. O entendimento dos mecanismos de ação deste inibidor no desenvolvimento do micélio assim como na germinação e penetração dos esporos na cutícula do inseto podem abrir novas áreas para o melhoramento da aplicação de *M. anisopliae.*

Referências

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. (Ed.). **Controle microbiano de insetos.** 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 11, p. 289-382.

ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos.** 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 27, p. 845-867.

ALVES, S.B.; LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; MARQUES, E. J. Produção massal de fungos entomopatogênicos na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina:** avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ, 2008. cap. 8, p. 215-238.

AQUINO, M.L.N. O fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no Estado de Pernambuco. **Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas**, Recife, v. 72, p. 1-26, 1974.

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

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 351-354, jun. 1999.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C. **Principles of insect pathology.** Boston: Kluwer Academic, 1998. 568 p.

CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT`ANNA JR., G.L.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal,** Amsterdam, v. 4, p. 239–247, Feb. 2000.

CHILOSI, G.; CARUSO, C.; CAPORALE, C.; LEONARDI, L.; BERTINI, L.; BUZIO, A.; NOBILE, M.; MAGRO, P.; BUONOCORE, V. Antifungal activity of a Bowman-Birk type trypsin inhibitor from wheat kernel. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 148, p. 477-481, Aug. 2000.

CINTRA, E.R.R.; ALMEIDA, J.E.M.; BATSISTA FILHO, A. Efeito de aditivos em meio de cultura de arroz para a produção dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. In: **Arquivos do Instituto Biológico,** São Pailo, v. 68, p. 43, 2001. Apresentado na REUNIÃO DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 14., 2001, São Paulo.

DEBACH, P.; FLESCHNER, C.A.; DIETRICK, E.T. A biological check method for evaluating the effectiveness of entomophagous insects. **Journal of Economic Entomology,** College Park, v. 44, n. 5, p. 763-766, Oct. 1951.

DONG, C.; ZHANG, J.; HUANG, H.; CHEN, W.; HU, Y. Pathogenicity of a new China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *Dcjhyium*) to subterranean termite *Odontotermes formosanus*. **Microbiological Research,** Cambridge, v. 164, n. 1, p. 27-35, Jan. 2009.

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

FARIA, M.R.; MAGALHÃES, B.P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento,** Brasília, v. 2, n. 2, p. 18-21, mar./abr. 2001.

FERNANDES, E.K.; COSTA, G.L.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Brazilian Journal of Microbiology,** São Paulo, v. 44, n. 4, p. 270-274, Oct./Dec. 2004.

FRIGO, S.M.; AZEVEDO, J.L. Meios de cultura e produção de conídios em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin**. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz",** Piracicaba, v. 43, p. 285-293, abr. 1986.

FRIZZAS, M.R.; CUNHA, U.S.da; MACEDO, L.P.M. Plantas transgênicas resistentes a insetos. **Revista Brasileira de Agrociência,** Pelotas, v. 10, n. 1, p. 13-18, jan./mar. 2004.

GINDIN, G.; SAMISH, M.; ZANGI, G.; MISHOUTCHENCO, A.; GLAZER, I. The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenics fungi. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 28, n. 1-4, p. 283-288, May 2002.

GUAGLIUMI, P. As cigarrinhas dos canaviais no Brasil. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 3, p. 34-43, set. 1968.

GUARIANI, T.; LEATHERBARROW, R.J. Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by proteases. **Journal of Peptide Research,** Copenhagen, v. 49, n. 6, p. 467-475, June 1997.

HALLSWORTH, J.E.; MAGAN, N. Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohal and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi. **Microbiology,** Reading, v. 140**,** p. 2705-2713, Dec.1994.

_____. Manipulations of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. **Microbiology,** Reading, v. 141**,** p. 1109-1115, May 1995.

HAQ, S.K.; ATIF, S.M.; KHAN, R.H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pest, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives Biochemistry and Biophysics,** New York, v. 431, n. 1, p. 145-159, Nov. 2004.

IBRAHIM, L.; BUTT, T.M.; JENKINSON, P. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research,** Cambridge, v. 106, p. 705-715, June 2002.

JABOR, I.A.S.; PAMPHILE, J.A.; RODRIGUES, S.B.; MARQUES-SILVA, G.G.; ROCHA, C.L.M.S.C.da. Análise do desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em resposta a fatores nutricionais. **Acta Scientarium Agronomy**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 497-501, jan./jul. 2003.

JUAREZ, M.P.; CRESPO, R.; FERNANDES, G.C.; LECUONA, R.; CAFFERATA, I.F. Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a chagas disease vector. **Journal of Invertebrate Pathology,** New York, v. 76, n. 3, p. 198-207, Oct. 2000.

KAAYA, G.P. Laboratory and field evolution of entomopathogenous fungi for tick control. **Annals of the New York Academy of Sciences,** New York, v. 919, p. 559-564, Sept. 2000.

KAMP, A.M.; BICOCHKA, M.J. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available ágars. **Letters in Applied Microbiology,** Oxford, v. 35, n. 1, p. 74-77, July 2002.

KIRKLAND, B.H.; WESTWOOD, G.S.; KEYHANI, N.O. Pathogenicity of entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species Dermacenter variabilis, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. **Journal of Medical Entomology**, College Park, v. 41, n. 4, p. 705-711, July 2004.

LASKOWSKI, Jr. M.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry,** Palo Alto, v. 49, p. 593-626, July 1980.

LATCH, G.C.M. *Metarhizium anisopliae* Sorokin strains in New Zeland and their possible use for controlling pasture insects. **New Zealand Journal of Agricultural Research,** Wellington, v. 8, p. 384-396, 1965.

LEITE, G.L.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos.** Ribeirão Preto: A.S. Pinto, 2003. 92 p.

LI, D.P.; HOLDOM, D.G. Effects of nutrients on colony formation, growth, and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 65, n. 3, p. 253-260, May 1995.

LINIER, I.E. Implications of antinutricional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** Boca Rota, v. 34, n. 1, p. 31-67, Jan./Feb. 1994.

LIANG, Z.Q.; LIU, A.Y.; LIU, J.L. A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium* anamorph. **Acta Mycologica Sinica,** Pequim, v. 10, n. 4, p. 257–262, Nov. 1991.

LIU, Z.Y.; LIANG, Z.Q.; WHALLEY, A.J.; YAO, Y.J; LIU A.Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grups and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. **Journal of Invertebrate Pathology,** New York, v. 78, n. 2, p. 178-182, Aug. 2001.

LORD, J.D. From Metchnikoff to Monsanto and beyondathe path of microbial control. **Journal of Invertebrate Pathology,** New York, v. 89, n. 1, p. 19-29, May 2005.

LORITO, M.; BRODWAY, M.; HAYES, C.K.; WOO, S.L.; NOVIELLO, C.; WILLIAMS, D.L.; HARMAN, G.E. Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicides. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 7, p. 525-527, July/Aug.1994.

MARANGA R.O.; KAAYA, G.P.; MUEKE, J.M.; HASSANALI, A. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyoma variegatum* (ixodidae) in relation to seazonal changes. **Mycopathologia,** Boston, v. 159, n. 4, p. 527-532, June 2005.

MILNER, R. Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. **Biocontrol News and Information,** Wallinfgord, GB, v. 21, n. 2, p. 47-50, June 2000.

MOSOLOV, V.V.; VALUEVA, T.A. Proteinase inhibitors and their function in plants a review. **Applied Biochemistry and Microbiology,** New York, v. 41, n. 3, p. 227-246, May. 2005.

MOSOLOV, V.V.; LONGINOVA, M.D.; FEDURKINA, N.V.; BENKEN, I.I. The biological significance of proteinase inhibitors in plants. **Plant Science Letters,** Amsterdam, v. 7, n. 2, p. 77-80, Aug. 1976.

PANTOU, M.P.; MAVRIDOU, A.; TYPAS, M.A. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribossomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. **Fungal Genetics and Biology,** San Diego, v. 38, n. 2, p. 159-174, Mar. 2003.

PELL, J.K.; EILENBERG, J.; HAJEK, A.E.; STEINKRAUS, D.C. Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungi as biocontrol agents:** progress, problems and potential. Wallingford: CAB International, 2001. p. 71–153.

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

PRAKASH, G.V.S.B.; PADMAJA, V.; KIRAN, R.R.S. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. **Bioresource Technology,** Essex, v. 99, n. 6, p. 1530-1537, Apr. 2008.

RANGEL, D.E.N; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 93, p.127-134, July 2006.

_____. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycological Research,** Cambridge, v. 112, n. 11, p. 1362-1372, Nov. 2008.

RANGEL, D.E.N.; ALSTON, D.G.; ROBERTS, D.W. Effects of physical and nutritional stress conditions during culture on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. **Mycological Research,** Cambridge, v. 112, n. 11, p. 1355-1361, Nov. 2008.

READ, J. W.; HAAS, W. Studies on the baking quality of flour as affected by certain enzyme actions. V. Further studies conceming potassium bromate and enzyme activite. **Cereal Chemistry,** St Paul, v. 15, p. 59, 1938.

ROBERTS, D.W.; St. LEGER, R.J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. **Advances in Applied Microbiology,** New York, v. 54, p. 1-70, 2004.

RYAN, C.A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopatology**, Palo Alto, v. 28, p. 425-49, Sept. 1990.

SANTORO, P.H.; NEVES, P.M.O.J.; ALEXANDRE, T. M.; ALVES, L.F.A. Interferência da metodologia nos resultados de bioensaios de seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de insetos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v. 42, n. 4, p. 483-489, abr. 2007.

SCHOLTE, E.J.; TAKKEN, W.; KNOLS, B.G. Infection of adult *Aedes aegypti and Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Acta Tropica,** Amsterdam, v. 102, n. 2, p. 151-158, Feb. 2007.

SCHOLTE, E.J.; KNOLS, B.G.; TAKKEN, W. Infection of the mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. **Journal of Invertebrate Pathology,** New York, v. 91, n. 1, p. 43-49, Jan. 2006.

SCHOLTE, E.J.; NJIRU, B.N.; SMALLEGANGE, R.G.; TAKKEN, W.; KNOLS, B.G.J. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Malaria Journal,** London, v.2, n. 29, p. 1-8, Oct. 2003.

SHAH, F.A.; WANG, C.S.; BUTT, T.M. Nutrition influences growth and virulence of the insectpathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters.** Amsterdam, v. 251, n. 2, p. 259-266, Oct. 2005.

SHAH, P.A.; PELL, J.K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 61, n. 5/6, p. 413-423, June 2003.

SIMÕES, R.A. **Efeitos de inibidores de proteinases de soja em organismos não-alvo associados à cultura da cana-de-açúcar.** 2007. 77 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

St. LEGER, R.J.; BUTT, T.M.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, Orlando, v. 13, n. 3, p. 253-262, Sept. 1989.

SUN, L.; FUXA, J.R.; HENDERSON, G. Effects of virulence, sporulation and temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus.* **Journal of Invertebrate Pathology,** New York, v. 84, n. 1, p. 38-46, Sept. 2003.

SUN, M.H.; LIU, X.Z. Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic hyphomycetes as fungal biocontrol agents. **Mycopathologia,** Boston, v. 161, n. 4, p. 295-305, Apr. 2006.

SUNG, H.J.; HYWEL-JONES, N.L.; SUNG, J.M.; LUANGSA-ARD, J.J.; SHRESTHA, B.; SPATAFORA, J.W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology,** Baarn, v. 57, n. 1, p. 5-59, May 2007.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology: Biochemistry and Molecular Biology,** Oxford, v. 109, n. 1, p.1-62, Sept. 1994.

TORRE, M.; CÁRDENAS-COTA, H.M. Production of *Paecilomyces fumosoroseus* conidia in submerged culture. **Entomophaga,** Paris, v. 41, n. 3/4, p. 443-453, sept. 1996.

TULLOCH, H. The genus M*etarhizium anisopliae*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 66, n. 3, p. 407-411. June 1976.

WALKER, A.J.; FORD, L.; MAJERUS, M.E.N.; GEOGHEGAN, I.E.; BIRCH, N.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Characterization of the mid-gut digestive proteinase activity of the two-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.) and its sensitivity to proteinase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology,** Oxford, UK, v. 28, n. 3, p. 173-180, Mar. 1998.

WALKER, D.R.; ALL, J.N.; McPHERSON, R.M.; BOERMA, H.R.; PARROTT, W.A. Field evaluation of soybean engineered with a synthetic *cry*1Ac transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 93, n. 3, p. 613-622, June 2000.

WANG, C.; POWELL, J.E. Cellulose bait improves the effectiveness of *Metarhizium anisopliae* as a microbial control of termites (Isoptera: Rhinotermitidae). **Biological Control,** Orlando, v. 30, n. 2, p. 523-529, June 2004.

WANG, C.; TYPAS, M.A.; BUTT, T.M. Detection and characterization of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters,** Amsterdam, v. 213, n. 2, p. 251-255, Feb. 2002.

WIECZOREK, M.; OTLEWSKI, J.; COOK, J.; PARKS, K.; LELUK, J.; WILIMOWSKA-PELC, A.; POLANOSXSKI, A.; WILUSZ, T.; LASKOWSKI, Jr.,M. The squash family of serine proteinase inhibitors. Amino acid sequences and association equilibrium constants of inhibitors from squash, summer squash, zucchini, and cucumber seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** Orlando, v. 126, n. 2, p. 646-651, Jan. 1985.

ZHANG, W.M.; LI, T.H; CHEN, Y.Q.; QU, L.H. *Cordyceps campsosterna*, a new pathogen of *Campsosternus auratus*. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 17, p. 239-242, Oct. 2004.

3 AUMENTO NA PRODUÇÃO E VIRULÊNCIA DE CONÍDIOS DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* (MESTCH.) SOROKIN (ASCOMYCOTA: HYPOCREALES) POR INIBIDORES DE SERINOPROTEASES TIPO KUNITZ

Resumo

O presente estudo foi realizado com o intuito de determinar os efeitos de inibidores de proteinases de soja no crescimento vegetativo, esporulação e virulência do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. A adição de 5 $g.L^{-1}$ de inibidores de proteinases semi-purificados de soja ou 0,5 $g.L^{-1}$ de inibidor purificado do tipo Kunitz no meio de cultura ME resultou em grande aumento na esporulação (de duas a 75 vezes) sem afetar a viabilidade dos conídios de quatro isolados (ESALQ-1037, IBCB348, E9, F20) de *M. anisopliae*. Os conídios produzidos no meio com adição de 0,5 $g.L^{-1}$ de inibidor de proteinase do tipo Kunitz ou com 2,5 $g.L^{-1}$ de albumina de soro bovino (BSA) e no meio de batata dextrose ágar (BDA) apresentaram virulência superior aos conídios produzido no meio ME sem inibidores. Os conídios produzidos em ME apresentaram coloração amarela enquanto que as colônias cultivadas na presença de inibidores de proteinase apresentaram coloração verde típica de *M. anisopliae*. Os mecanismos responsáveis por estas alterações fisiológicas no fungo não foram determinados, mas devem estar associados à ação anti-nutricional, diminuindo a absorção protéica e conseqüentemente estimulando a esporulação. Os inibidores de proteinase fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e leupeptina, assim como a adição de outras fontes protéicas usadas como controle, não influenciaram o crescimento vegetativo nem a esporulação do fungo no meio ME. Quando o inibidor de proteinase do tipo Kunitz foi adicionado à suspensão de conídios do fungo antes da pulverização de lagartas de *Diatraea saccharalis*, a eficiência de controle foi 35,1% inferior ao apresentado pelos demais tratamentos sem a presença deste inibidor. A redução da eficiência do fungo pela adição de inibidor do tipo Kunitz nas suspensões de conídios deve ser devido ao bloqueio das enzimas proteolíticas do fungo impedindo a digestão da cutícula dos insetos.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*; Inibidores de proteinases; Kunitz; Entomopatógeno; Esporulação; Virulência

Abstract

This study was carried out in order to determine the effects of soybean proteinase inhibitors on vegetative growth, sporulation and virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. The addition of 5 $g.L^{-1}$ of semi-purified soybean proteinase inhibitor or 0.5 gL^{-1} of purified Kunitz-type inhibitor on culture medium ME resulted in large increases in sporulation (two to 75 times) without affecting the viability of conidia of four isolates (ESALQ-1037, IBCB348, E9, F20) of *M. anisopliae*. Conidia produced on the medium with the addition of 0.5 $g.L^{-1}$ purified Kunitz-type inhibitor or 2.5 gL-1 of bovine serum albumin (BSA) and in the medium of potato dextrose agar (PDA) showed higher virulence than that of the conidia produced in ME without inhibitors. Conidia produced in ME were yellow while the colonies grown in the presence of proteinase inhibitors showed green color typical of *M. anisopliae*. Mechanisms responsible for these physiological changes in the fungus have not been determined, but it must be linked to an anti-nutritional action, reducing the absorption of protein and stimulating

sporulation. Proteinase inhibitors phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and Leupeptin, as well as the addition of other protein sources used as controls did not affect vegetative growth or sporulation of the fungus in ME medium. When the Kunitz-type inhibitor was added to the suspension of conidia of the fungus before spraying larvae of *Diatraea saccharalis*, control efficiency was 35.1% lower than that presented in other inhibitor-free treatments. The efficiency reduction of the fungus by the addition of Kunitz-type inhibitor in conidia suspensions should be connected to blockage and inactivation of the proteolytic enzymes of the fungus preventing the digestion of the cuticle of insects.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*; Entomopathogen; Proteinase inhibitors; Kunitz; Sporulation; Virulence

3.1 Introdução

Com base nos sítios ativos, mecanismos de ação e estrutura tridimensional, as proteinases são classificadas, de acordo com a União Internacional de Bioquímica, em quatro grandes classes: proteinases serínicas; cisteínicas; aspárticas e metaloproteinases (NEURATH, 1996). As proteinases realizam várias funções fisiológicas complexas em animais e humanos, participam ativamente em processos fisiológicos e patológicos, participam do catabolismo de proteínas, coagulação sanguínea, crescimento e migração celular, liberação de hormônios entre outras atividades (GODFREY; WEST, 1996). Nos insetos, as proteinases desempenham papel importante na digestão, já que estes obtêm muitos dos aminoácidos essenciais utilizando proteinases extracelulares que atuam no lúmem de seu aparelho digestório (TERRA; FERREIRA, 1994; XAVIER-FILHO, 1992). Nos vegetais podem atuar na regulação da expressão gênica, morte celular programada e na resistência de plantas. Nos microrganismos desempenham importantes papeis na esporulação, liberação conidial e germinação (BEERS; JONES; DICKERMAN, 2004; TORNERO et al., 1996).

Muitas famílias de plantas possuem inibidores de proteinases em seus órgãos reprodutivos, órgãos de reserva e tecidos vegetativos. A maioria desses inibidores são moléculas pequenas, estáveis, abundantes e fáceis de purificar, podendo atuar como proteínas de reserva, como reguladores de enzimas endógenas e podem também estar envolvidos nos processos de defesa de plantas contra o ataque de pragas e/ou patógenos (WALKER et al., 1998). O número de inibidores de proteinases de plantas identificados e isolados é grande, sendo os inibidores de proteinases serínicas e cisteínicas os mais bem conhecidos. Dentre as famílias de inibidores de

serinoproteinases de plantas mais representativas estão: (i) família Kunitz, (ii) família Bowman-Birk, (iii) família de inibidores tipo I de batatas, (iv) família de inibidores tipo II de batatas, (v) família de inibidores de abóbora e (vi) família de inibidores de tripsina e α-amilase que são característicos de semente de cereais (LASKOWSKI; KATO, 1980; WIECZOREK et al., 1985). A família de inibidores de proteinases do tipo Kunitz, uma das famílias mais importantes, compreende proteínas de plantas com atividade inibitória sobre várias enzimas proteolíticas, como as tripsina, quimiotripsina, subtilisina, cisteinoproteases e asparticoproteases.

A interação entre plantas, insetos fitófagos e inibidores de proteinases tem sido objeto de muitos estudos. Para realizar a hidrólise das proteínas ingeridas é necessário que os insetos produzam uma grande variedade de proteinases intestinais. Sabe-se que algumas plantas apresentam proteínas capazes de inibir a ação das proteinases de insetos, ao alimentarem-se destas plantas, os insetos ingerem quantidades significativas desses inibidores, e conseqüentemente, observa-se uma inibição do desenvolvimento e crescimento provocada pela má nutrição e índices de mortalidade significantes podem ser observados (McMANUS; BURGESS, 1995). A transgenia pode ser considerada um passo crucial no desenvolvimento de plantas resistentes a insetos, já que os inibidores de proteinases apresentam grande potencial por reduzirem ou impedirem a atividade das enzimas digestivas dos insetos, provocando-lhes desnutrição, redução do desenvolvimento larval, podendo até causar-lhes a morte (AUGUSTYNIAK; DABERT; WYPIJEWSKI, 1997). A primeira planta transgênica expressando um gene de inibidor de proteinase, foi obtida em 1987 e tratava-se da planta de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) contendo o gene que codifica para o inibidor de proteinase serínica de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*). As plantas de tabaco que são naturalmente susceptíveis ao inseto *Heliothis virescens* após a transformação genética adquiriram altos níveis de resistência ao mesmo (GATEHOUSE; GATEHOUSE, 1998).

Desde então, estudos começaram a ser desenvolvidos com intuito de se conhecer o papel de inibidores de proteinases nas interações com fungos fitopatogênicos, para a obtenção de plantas modificadas para a expressão de genes de resistência específicos a fungos fitopatogênicos. Lorito et al. (1994) observaram a ação antifúngica de inibidores de proteinase purificados de tripsina e quimiotripsina, de repolho (*Brassica oleracea* L.), sobre os fungos fitopatogênicos *Botrytis cinera* e *Fusarium solani* f. sp. *pisi* em cultivo *in vitro*. Mosolov et al. (1976) observaram que a adição de inibidor de tripsina de batata reduziu atividade de

serinoproteinases em filtrados de isolados fúngicos. Já o inibidor de proteinase do tipo Bowman-Birk, extraído de grãos de trigo foi responsável, em cultivo *in vitro*, por uma forte atividade antifúngica por meio da inibição do crescimento de hifas de diferentes fungos fitopatogênicos, incluindo o *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* e *Septoria tritici* (CHILOSI et al., 2000).

Em *M. anisopliae* as enzimas proteolíticas, além de estarem envolvidas nos processos de formação e germinação dos conídios, têm funções nutricionais importantes, sendo capazes de hidrolisar as cadeias polipeptídicas em cadeias menores, que são absorvidas pelas células. Porém, a produção de proteinases pelo fungo tem sido estudada principalmente correlacionando-a com os processos de especificidade, patogenicidade e virulência do entomopatógeno. Para penetrar no hospedeiro o fungo libera várias enzimas, como esterases, proteases, lipases e quitinases. O papel das proteinases no processo de infecção de insetos por fungos deve ser ressaltado, já que o principal componente estrutural da cutícula dos insetos é proteína e as proteases estão envolvidas na hidrólise dos componentes cuticulares facilitando a penetração da hifa através da cutícula do hospedeiro. Dentre as proteases identificadas para este fungo podemos destacar a enzima do tipo subtilisina, denominada Pr1, que é a principal enzima produzida por *M. anisopliae* durante a infecção para degradar o tegumento do inseto, e outra com atividade tipo tripsina designada Pr2 pertencente ao grupo das serinoproteinases (St. LEGER; CHARNLEY; COOPER, 1986). Além das enzimas já citadas, *M. anisopliae* produz uma metaloproteinase (St. LEGER; BIDOCHKA; ROBERTS, 1994), duas aminopeptidases extracelulares (CHARNLEY; St. LEGER, 1991), uma cisteína proteinase designada Pr4 (COLE; CHARNLEY; COOPER, 1993) e uma aspartilprotease (St. LEGER; JOSHI; ROBERTS, 1998).

Simões (2007) estudou o efeito dos inibidores de proteinase de soja purificados e semi-purificados sobre o fungo *M. anisopliae*. Estes estudos indicaram que a adição de 0,5% (p/v) de inibidores de proteinase de soja semi-purificados e de 0,05% (p/v) de inibidor purificado do tipo Kunitz em dois meios de cultura (ME – meio de esporulação e BDA – batata, dextrose e ágar) resultou em maior crescimento vegetativo e maior produção de conídios de *M. anisopliae*. A adição do inibidor purificado do tipo Kunitz conferiu um aumento médio na produção de conídios de 43% em meio de esporulação, superior a outra fonte protéica (albumina de soro bovino – BSA) usada como controle. Estes foram os primeiros estudos onde se observaram efeitos benéficos de inibidores de proteinases em fungos, mas o mecanismo da ação dos

inibidores não foi elucidado. Várias questões científicas foram levantadas no trabalho de Simões (2007) que foram abordadas nos estudos descritos abaixo.

Pesquisas básicas são necessárias para elucidar o incremento do crescimento e esporulação de *M. anisopliae* em meio de cultura contendo inibidor de proteinase do tipo Kunitz. O entendimento dos mecanismos de ação deste inibidor no desenvolvimento do micélio assim como na germinação e penetração dos esporos na cutícula do inseto podem abrir novas áreas para o melhoramento da aplicação de *M. anisopliae.* Assim, este estudo objetivou determinar o efeito de inibidores de proteinases no crescimento vegetativo, esporulação e virulência do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* quando os inibidores foram adicionados ao meio de cultivo ou diretamente em suspensão de conídios.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil. Foram utilizadas as seguintes linhagens do fungo *M. anisopliae*: ESALQ-1037 (isolado de *Solenopsis* sp. procedente de Porto Alegre - RS); IBCB 348 (isolado de *Mahanarva fimbriolata* procedente de Sertãozinho - SP); E9 (isolado de *Deois flavopicta*, procedente do Espírito Santo) e F20 (isolado proveniente do banco de fungos do Centro de Tecnologia Canavieira – CTC, Piracicaba - SP). As linhagens encontram-se armazenadas em freezer (-40 °C) na forma de conídios puros no Banco de Patógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ/USP. Para obter a suspensão inicial de inóculo os conídios de *M. anisopliae*, foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar - BDA (Potato Dextrose Agar, Difco™, USA) e espalhados com auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D (Biological Oxigen Demand) por 7 dias, a 26 ± 1°C e doze horas de fotofase.

Testes de virulência foram realizados com lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae). As lagartas utilizadas foram obtidas em uma criação mantida no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ/USP e se encontravam

sadias, livres do patógeno *Nosema* sp. Os lepidópteros foram mantidos durante a fase imatura em tubos de vidro contendo dieta artificial de King e Hartley (1985) e acomodados em câmara climatizada do tipo B.O.D (Biological Oxigen Demand) com temperatura de 26 ± 1°C e doze horas de fotofase. As pupas e os adultos foram transferidos para gaiolas acomodadas em sala de criação, sendo que para os adultos ofereceu-se apenas água.

3.2.1.1 Efeito de meios de cultura contendo inibidores de proteinase de soja no crescimento vegetativo e esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae*

3.2.1.1.1 Efeito de inibidores de proteinase de soja e fontes protéicas

O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado, composto por oito tratamentos e cinco repetições, sendo cada unidade experimental composta por uma placa de Petri plástica estéril (60 mm de diâmetro por 20 mm de altura) contendo 10 mL de meio e uma colônia de *M. anisopliae*. O experimento foi repetido três vezes no tempo. Os seguintes tratamentos foram testados: 1. Meio de cultura Batata Dextrose Ágar - BDA (39 $g.L^{-1}$ - Potato Dextrose Agar, Difco™, USA); 2. Meio de Esporulação (ME – 0,36 g de KH_2PO_4; 1,05 g de Na_2HPO_4 $7H_20$; 0,60 g de $MgSO_4$ $7H_20$; 1,00 g de KCL; 10,0 g de glucose; 1,58 g de $NaNO_3$; 5,00 g de extrato de levedura; 20,0 g de ágar e; 1000 mL de água destilada) descrito em Alves et al. (1998); 3. ME com o extrato de levedura substituído por peptona de soja na mesma proporção; 4. ME acrescido de 2,5 $g.L^{-1}$ de peptona de soja; 5. ME acrescido de 2,5 $g.L^{-1}$ de albumina de soro bovino (BSA); 6. ME acrescido de 5 $g.L^{-1}$ de inibidores de proteinases semi-purificados de soja (IPS); 7. ME acrescido de 0,5 $g.L^{-1}$ de inibidor de tripsina do tipo Kunitz (Sigma-Aldrich®, USA); 8. ME acrescido de 2,5 $g.L^{-1}$ de inibidor de tripsina do tipo Kunitz.

A semi-purificação dos inibidores de proteinases de soja foi realizada no Departamento de Genética da ESALQ-USP, Piracicaba, São Paulo. A forma de extração foi adaptada de Pompermayer et al. (2003). Foram homogeneizados 100 gramas de sementes de soja (variedade Conquista) em um litro de solução salina (NaCl 0,15 M), em seguida filtrou-se a mistura resultante em gaze. A parte líquida foi centrifugada a 3000 x g durante 20 minutos a 4 °C para coleta do sobrenadante, o volume foi medido e ajustado a 70% com acetona gelada, sendo novamente centrifugado a 6000 x g por 20 minutos a 4 °C. Para remoção completa da acetona e

do macerado o material decantado foi liofilizado, resultando nos inibidores de proteinases semi-purificados. A atividade enzimática para tripsina e quimotripsina foi de 3,4 e 0,34%, respectivamente, do total da proteína da semente.

Em todos os meios acrescentou-se 0,5 $g.L^{-1}$ de antibiótico (Pentabiótico Veterinário Reforçado, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda). Os meios foram preparados com 90% da água recomendada, pois os inibidores de proteinases e as proteínas foram dissolvidos na água restante e adicionados ao meio quando este apresentava a temperatura de 45°C. Posteriormente, alíquotas de 10 mL dos meios foram distribuídas em placas de Petri plásticas e após a solidificação inoculou-se os conídios num ponto central da placa com auxílio de alça de platina. As placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D a 26 ± 1°C e fotofase de 12 horas.

Após sete e 10 dias de incubação avaliou-se o crescimento vegetativo, medindo o diâmetro das colônias. Para quantificar a esporulação, cada colônia foi retirada por completo rente ao meio de cultura e transferida para um tubo de vidro (85 mm de altura por 25 mm de diâmetro) contendo 10 mL de água mais 0,05 % de espalhante adesivo (Tween 20®). O número de conídios em suspensão foi determinado através de contagens em câmara de Neubauer.

3.2.1.1.2 Teste com os inibidores fluoreto de fenilmetilsulfonil e leupeptina

Os inibidores fluoreto de fenilmetilsulfonil, inibidor químico geral de serinoproteinases e a leupeptina, inibidor da tripsina, foram testados para observar se o incremento na esporulação de *M. anisopliae* estaria restrito aos inibidores de proteinases de soja (inibidores de serinoproteases, do tipo tripsina e quimotripsina) ou se outros inibidores seriam capazes de provocar o mesmo efeito. Para este teste o delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado, composto por quatro tratamentos e seis repetições, cada unidade experimental constou de uma placa de Petri plástica estéril (60 mm de diâmetro por 20 mm de altura) contendo 10 mL de meio e uma colônia do isolado ESALQ-1037 de *M. anisopliae*. Os seguintes tratamentos foram testados: (1) Meio de Esporulação (ME); (2) ME acrescido de 5,25 $g.L^{-1}$ de inibidores de proteinases de soja semi-purificados (IPS); (3) ME acrescido de 4,48 $mg.L^{-1}$ de inibidor de proteinase purificado PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil (Sigma-Aldrich®, USA) e; 4. ME acrescido de 12,18 $mg.L^{-1}$ de inibidor de proteinase purificado leupeptina (Sigma-Aldrich®, USA). Devido à indisponibilidade do inibidor de tripsina do tipo Kunitz (Sigma-Aldrich®, USA) utilizou-se apenas o inibidor de proteinase semi-purificado (IPS). A quantidade de inibidor adicionada ao meio de esporulação foi

padronizada com base no peso molecular de cada substância. O procedimento de preparo dos meios de cultura, plaqueamento do fungo e avaliação do experimento foi semelhante ao descrito acima.

3.2.1.1.3 Teste com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*

Para avaliar a respostas de outros isolados à ação de inibidores de proteinase outros dois testes foram conduzidos. No primeiro teste o delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado, composto por um fatorial 3x3, ou seja, três isolados e três meios de cultura com quatro repetições. Foram testados os seguintes isolados de *M. anisopliae*: IBCB 348; E9 e ESALQ-1037 e os seguintes meios de cultura: (1) Meio de Esporulação (ME); (2) ME acrescido de 0,5 $g.L^{-1}$ de inibidor de tripsina do tipo Kunitz (Sigma-Aldrich®, USA), e; (3) ME acrescido de 2,5 $g.L^{-1}$ de albumina de soro bovino.

No segundo teste, foi incluído o isolado F - 20 que era usado em larga escala no controle de cigarrinhas, mas que passou a apresentar reduzida esporulação. Devido à indisponibilidade de inibidor de tripsina do tipo Kunitz foi substituído pelos inibidores de proteinases de soja semi-purificados (IPS). Desta forma, o delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado, composto por um fatorial de 2x2, ou seja, dois isolados e dois meios de cultura com seis repetições. Foram testados os seguintes isolados de *M. anisopliae*: ESALQ-1037 e F20 e os seguintes meios de cultura: (1) Meio de Esporulação (ME) e; (2) ME acrescido de 5 $g.L^{-1}$ de inibidores de proteinases semi-purificados (IPS). Nos dois testes, cada unidade experimental foi composta por uma placa de Petri plástica estéril (60 mm de diâmetro por 20 mm de altura) contendo 10 mL de meio e uma colônia das linhagens *M. anisopliae* testadas. O isolado ESALQ-1037 foi utilizado em todos os experimentos para servir de parâmetro de comparação. O procedimento de preparo dos meios de cultura, plaqueamento das linhagens e avaliação dos experimentos foi conduzido conforme descrito acima.

3.2.1.2 Virulência do fungo *Metarhizium anisopliae* cultivado em meio com inibidores de proteinase de soja

Os conídios utilizados foram produzidos nos diferentes meios de cultura descritos acima. O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado, composto por nove tratamentos e seis repetições. Os tratamentos foram compostos por conídios produzidos em diferentes meios de cultura e aplicados sobre lagartas de *D. saccharalis*: (1) meio de cultura Batata Dextrose Ágar - BDA (Potato Dextrose Agar, Difco™, USA); (2) Meio de Esporulação (ME); (3) ME com o extrato de levedura substituído por peptona de soja na mesma proporção; (4) ME acrescido de 2,5 $g.L^{-1}$ de peptona de soja; (5) ME acrescido de 2,5 $g.L^{-1}$ de albumina de soro bovino; (6) ME acrescido de 5 $g.L^{-1}$ de inibidores de proteinases semi-purificados (IPS); (7) ME acrescido de 0,5 $g.L^{-1}$ de inibidor de tripsina do tipo Kunitz (Sigma-Aldrich®, USA); (8) ME acrescido de 2,5 $g.L^{-1}$ de inibidor de tripsina do tipo Kunitz e; (9) testemunha (pulverizado apenas com água destilada mais espalhante adesivo Tween 20® a 0,05%).

Cada tratamento foi composto por seis repetições com 10 lagartas de *D. saccharalis* em terceiro ínstar. Foram preparadas suspensões na concentração de 8 x 10^7 $conídios.mL^{-1}$, de *M. anisopliae* produzido nos diferentes meios. As lagartas foram separadas da dieta e com auxílio de uma peneira foram lavadas rapidamente com água destilada para eliminar os resíduos de fungicidas utilizados como anti-contaminantes na dieta. Após a lavagem, as lagartas foram colocadas em papel toalha a fim de retirar o excesso de água. Sessenta lagartas por tratamento foram acondicionadas em placas de Petri (14 cm de diâmetro) e pulverizadas (Torre de Potter – 15 $libras.pol^{-1}$) com alíquotas de 2 mL de suspensão fúngica. A testemunha recebeu 2 mL de água estéril mais 0,05% de espalhante adesivo (Tween 20®). Após a pulverização, as lagartas foram mantidas por quinze minutos sobre a superfície pulverizada, a fim de aumentar o contato com os conídios de *M. anisopliae*. Posteriormente, grupos de 10 lagartas foram acondicionados em placas de Petri (60 mm de diâmetro por 20 mm de altura), sendo alimentadas diariamente com dieta artificial de King e Hartley (1985) sem anti-contaminantes (formaldeído e nipagin).

Para determinação da viabilidade dos conídios, uma alíquota de 100 µL da suspensão proveniente de cada tratamento foi plaqueada em meio Batata Dextrose Ágar - BDA (Potato Dextrose Agar, Difco™, USA), e após 16 horas de incubação em câmara climatizada do tipo

B.O.D. a 26 ± 1°C, realizou-se a contagem de conídios germinados em dois campos por placa, em duas placas de Petri (9 cm de diâmetro) por tratamento.

3.2.1.3 Virulência de *Metarhizium anisopliae* aplicado em suspensões contendo inibidores de proteinase de soja

Neste experimento os inibidores de proteinase foram adicionados a suspensões de conídios de *M. anisopliae* para determinar o efeito na germinação e penetração dos conídios. O fungo *M. anisopliae* foi plaqueado em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar - BDA (Potato Dextrose Agar, Difco™, USA) sem a presença de inibidores; e espalhado com auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram mantidas por sete dias em câmara climatizada do tipo B.O.D a 26 ± 1°C e doze horas de fotofase para produção dos conídios. A suspensão do patógeno foi preparada misturando-se conídios, retirados das culturas, em água estéril mais espalhante adesivo a 0,05% (Tween 20®) e a suspensão de 1 x 10^8 conídios.mL^{-1} foi padronizada após contagem em câmara de Neubauer.

Às alíquotas destas suspensões foram adicionados os inibidores de proteinases ou fontes protéicas usadas como controle e as misturas foram então agitadas por inversão. O tempo decorrido entre a mistura da suspensão de conídios com os inibidores ou fontes protéicas e a pulverização sobre as lagartas foi de até 10 minutos. Para determinação da viabilidade dos conídios, uma alíquota da suspensão proveniente de cada tratamento, com inibidores ou fontes protéicas, foi plaqueada em meio BDA, e após 16 horas de incubação em câmara tipo B.O.D (26 ± 1 °C) realizou-se a contagem de conídios germinados em dois campos por placa, em duas placas de Petri (9 cm de diâmetro) por tratamento. A viabilidade média foi superior a 90% em todas as amostras.

O experimento com delineamento inteiramente aleatorizado foi composto por sete tratamentos: (1) água estéril mais 0,05% de espalhante adesivo Tween® (testemunha); (2) suspensão de conídios; (3) suspensão de conídios mais 2,5 $g.L^{-1}$ de peptona de soja; (4) suspensão de conídios mais 2,5 $g.L^{-1}$ de albumina de soro bovino; (5) suspensão de conídios mais 2,5 $g.L^{-1}$ de inibidor de proteinase de soja purificado do tipo Kunitz (Sigma-Aldrich®, USA); (6) suspensão de conídios mais 2,5 $g.L^{-1}$ de inibidor de proteinase de soja purificado do tipo Bowman-Birk (Sigma-Aldrich®, USA); (7) suspensão de conídios mais 5 $g.L^{-1}$ de inibidores de

proteinases de soja semi-purificados. Cada tratamento foi composto por cinco repetições. As unidades experimentais constaram de uma placa de Petri (60 mm de diâmetro por 20 mm de altura) contendo dez lagartas de *D. saccharalis* em terceiro ínstar.

As lagartas provenientes de criação em laboratório foram separadas da dieta e com auxílio de uma peneira foram lavadas rapidamente com água para eliminar os resíduos de fungicidas utilizados como anti-contaminantes na dieta. Após a lavagem, as lagartas foram colocadas em papel toalha a fim de retirar o excesso de água. Cinquenta lagartas por tratamento foram acondicionadas em placa de Petri (14 cm de diâmetro) e pulverizadas (Torre de Potter – 15 libras.pol^{-1}) com alíquotas de 2 mL das respectivas suspensões fúngicas. Após a pulverização, as lagartas foram mantidas por 15 minutos sobre a superfície pulverizada, a fim de aumentar o contato com os conídios de *M. anisopliae*. Posteriormente, as lagartas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D a temperatura de 26 ± 1 ^{0}C e fotofase de doze horas, sendo diariamente alimentadas com dieta artificial de King e Hartley (1985) sem anti-contaminantes. Avaliações diárias foram realizadas para verificar a mortalidade. As lagartas mortas foram mantidas em câmara úmida para confirmar a infecção pelo patógeno.

3.2.1.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SAS® 9.1.3 (SAS, Institute Inc., 2003). Os dados referentes ao efeito de inibidores de proteinase de soja e fontes protéicas e os resultados dos testes com inibidores fluoreto de fenilmetilsulfonil e leupeptina foram transformados em $\sqrt{x}$ e x^{-2}, respectivamente e então submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Os dados provenientes dos testes com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* foram analisados por modelos fatoriais. Os dados de esporulação dos três isolados de *M. anisopliae* em resposta a diferentes meios de cultura foram transformados em log x, submetidos a análise de variância as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P<0,05$). Na avaliação da esporulação do isolado F 20 em resposta a adição de inibidor de proteinase de soja os dados não transformados foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P<0,05$). As porcentagens de mortalidade referentes aos testes de virulência do fungo *M. anisopliae* cultivado em meio com adição de inibidores ou fonte protéicas, sofreram transformação angular, arc sen $\sqrt{((x+0,5)/100)}$,

já os dados referentes aplicação de suspensão de *M. anisopliae* com inibidores ou fonte protéicas, sofreram transformação angular, arc seno √((x)/100) e posteriormente foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan (P<0,05). A eficiência dos tratamentos foi estimada pela fórmula de Schneider-Orelli (1947). Para o cálculo da TL_{50}, os valores das mortalidades acumuladas foram submetidos à análise de Probit (FINNEY, 1971), com o auxílio do programa computacional Polo Plus.

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 Efeito de inibidores de proteinase de soja no crescimento vegetativo e esporulação do fungo

3.2.2.1.1 Teste com inibidores de proteinase de soja e fontes protéicas

A Tabela 3.1 apresenta o crescimento vegetativo e a produção de conídio por colônia em resposta a diferentes composições do meio. Ao ser cultivado em meio de esporulação (ME) o fungo teve um bom desenvolvimento vegetativo, porém uma baixa esporulação. Enquanto que no meio batata dextrose ágar (BDA) ocorreu um menor crescimento vegetativo da colônia, aos sete ($F_{7;36}$ = 16,47; P< 0,0001) e dez dias ($F_{7;36}$ = 20,12; P< 0,0001), mas a esporulação foi maior que no ME.

Ao substituir o extrato de levedura, fonte protéica original do ME, por outra proteína, a peptona de soja, a produção de conídios não foi alterada ($F_{7;35}$=132,27; P<0,0001). Quando adicionalmente ao extrato de levedura, a peptona de soja foi incorporada ao mesmo meio, a esporulação e o crescimento vegetativo também foram estatisticamente semelhantes. Quando a albumina de soro bovino (BSA) foi adicionada ao ME provocou um aumento de dez vezes na produção de conídios por colônia. Da mesma forma, a adição dos inibidores de proteinases de soja, purificado ou semi-purificados, resultaram em grande aumento na esporulação em relação aos meios ME e BDA, não diferindo do tratamento de ME com BSA. A adição de 5 $g.L^{-1}$ de IPS e 0,5 $g.L^{-1}$ de Kunitz resultou em incremento de 12,2 e 11,0 vezes na quantidade de conídios produzidos por *M. anisopliae* isolado ESALQ-1037 em meio ME. A viabilidade dos conídios provenientes dos diferentes meios de cultura foi semelhante.

Observou-se que quando cultivado em meio de esporulação o isolado ESALQ-1037 apresentou conídios amarelos, enquanto que ao ser cultivado em meio BDA produziu conídios verdes, coloração característica deste fungo (Figura 3.1). Ao trocar a fonte protéica do ME ou adicionar mais proteína ao meio os conídios continuaram amarelos, já a adição de BSA ao meio resultou na produção de conídios amarelos e verdes na mesma colônia. Porém a adição de inibidores de proteinase levou a colônia a produzir apenas conídios verdes, semelhantes aos produzidos no meio BDA.

Tabela 3.1 - Crescimento vegetativo (diâmetro em cm) e esporulação (conídios x 10^7 por colônia) de *Metarhizium anisopliae* isolado ESALQ-1037 em resposta a diferentes meios de cultura após 10 dias a 26 ± 1°C

Tratamentos [1]	N° de conídios por colônia ($x10^7$)	Diâmetro de colônia (cm) após 7 dias	Diâmetro de colônia (cm) após 10 dias	Viabilidade dos conídios (%) [ns]
ME + 5 $g.L^{-1}$ IPS	15,87 ± 0,79 a	2,40 ± 0,07 b	3,86 ± 0,08 ab	99,0 ± 0,58
ME + 0,5 $g.L^{-1}$ Kunitz	14,69 ± 0,48 a	2,55 ± 0,03 ab	3,75 ± 0,03 bc	97,5 ± 1,84
ME + 2,5 $g.L^{-1}$ Kunitz	14,26 ± 0,79 a	2,61 ± 0,03 a	3,68 ± 0,07 c	98,5 ± 0,64
ME + 2,5 $g.L^{-1}$ BSA	13,82 ± 1,18 a	2,68 ± 0,04 a	3,98 ± 0,04 a	98,25 ± 1,18
BDA	6,95 ± 1,08 b	1,87 ± 0,13 c	3,03 ± 0,12 d	97,25 ± 0,85
ME + 2,5 $g.L^{-1}$ Peptona	2,10 ± 0,22 c	2,60 ± 0,02 a	3,93 ± 0,04 a	97,5 ± 1,55
ME	1,30 ± 0,22 cd	2,60 ± 0,03 a	4,0 ± 0,03 a	98,0 ± 0,91
ME (Peptona)	1,13 ± 0,24 d	2,57 ± 0,07 a	3,68 ± 0,05 c	97,0 ± 1,08
C.V.	10,29	4,75	3,65	2,36

[1]ME: Meio de Esporulação; IPS: inibidores semi-purificados de soja; BSA: albumina de soro bovino; ME (Peptona): Meio de Esporulação com o extrato de levedura substituído por peptona de soja na mesma proporção; BDA: meio de cultura Batata Dextrose Ágar (Potato Dextrose Agar, Difco™).
Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). ns: não significativo.

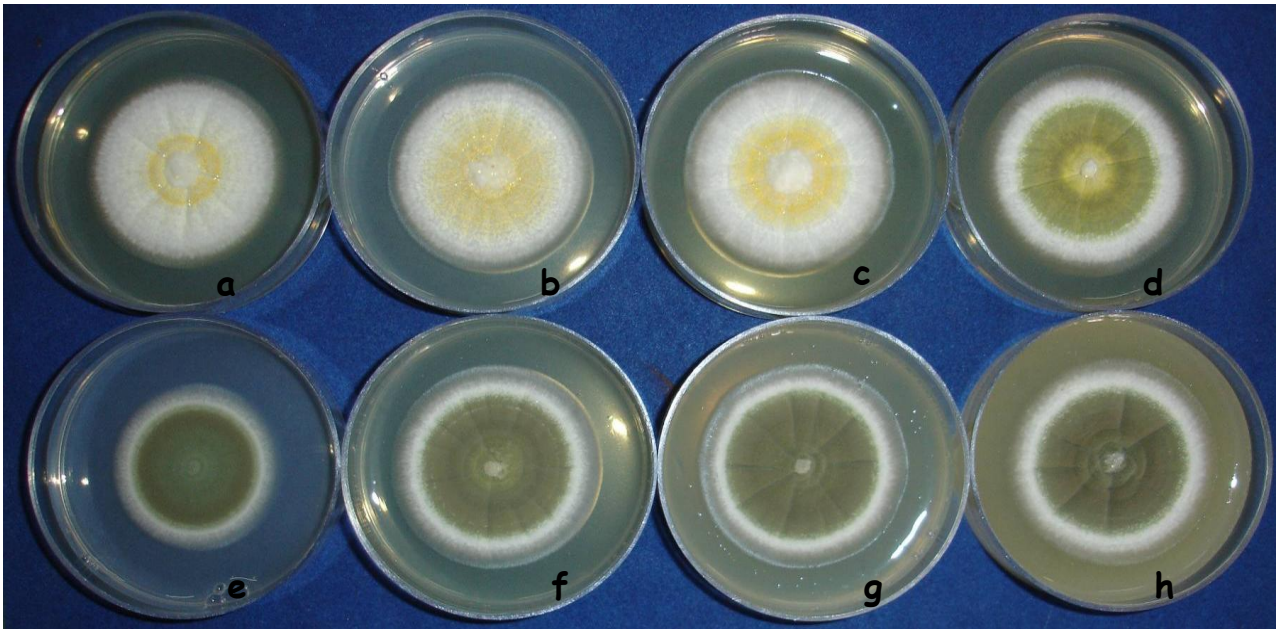

Figura 3.1 - Crescimento de *Metarhizium anisopliae* (isolado ESALQ-1037) em diferentes meios de cultura após 10 dias a 26 ± 1°C. a. Meio de Esporulação (ME), **b.** ME com peptona de soja em substituição a extrato de levedura, **c.** ME + 2,5 $g.L^{-1}$ de peptona, **d.** ME + 2,5 $g.L^{-1}$ de albumina de soro bovino, **e.** Meio Batata Dextrose Ágar, **f.** ME + 0,5 $g.L^{-1}$ de inibidor de proteinase do tipo Kunitz, **g.** ME + 2,5 $g.L^{-1}$de Kunitz, **h.** ME + 5 $g.L^{-1}$ inibidores de proteinases semi-purificados de soja

3.2.2.1.2 Teste com os inibidores fluoreto de fenilmetilsulfonil e leupeptina e com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*

Os inibidores de proteases fluoreto de fenilmetilsulfonil e leupeptina adicionados ao meio de esporulação não influenciaram, o crescimento vegetativo avaliado aos sete ($F_{3;20}$ = 4,70; P< 0,0122) e 10 dias ($F_{3;20}$ = 23,11; P< 0,0001). Estes inibidores também não afetaram a esporulação do fungo ($F_{3;20}$ = 42,57; P< 0,0001), enquanto que a adição de inibidores de proteinase de soja semi-purificado (IPS) dobrou a produção de conídios por colônia (Tabela 3.2).

A Tabela 3.3 mostra que a ação do inibidor de proteinase purificado do tipo Kunitz não está restrita ao isolado ESALQ-1037, outros dois isolados testados, E9 e IBCB348, também tiveram a produção de conídios expressivamente incrementada quando o inibidor foi adicionado ao meio de esporulação. A adição de Kunitz induziu um aumento de 24,3 vezes na quantidade de

conídios produzidos pelos isolado ESALQ-1037 e de 31,1 e 76,2 vezes nos isolados E9 e IBCB348, respectivamente.

Tabela 3.2 - Avaliação do crescimento vegetativo e da esporulação de colônias de *Metarhizium anisopliae* (isolado ESALQ-1037) crescidas por 10 dias a 26 ± 1°C na presença de diferentes inibidores de proteinase adicionados ao meio de esporulação (ME)

Tratamento	Diâmetro da colônia (cm) após 7 dias	Diâmetro da colônia (cm) após 10 dias	Nº de conídios por colônia ($x10^9$)[1]
ME+5,25 $g.L^{-1}$ IPS	2,08 ± 0,04 a	3,48 ± 0,04 a	2,01 ± 0,13 a
ME+12,18 $mg.L^{-1}$ Leupeptina	1,95 ± 0,03 b	3,12 ± 0,06 b	1,11 ± 0,02 b
ME	1,88 ± 0,05 b	3,07 ± 0,42 b	1,04 ± 0,01 b
ME+ 4,48 $mg.L^{-1}$ PMSF	1,88 ± 0,05 b	3,18 ± 0,02 b	1,04 ± 0,05 b
C.V.	21,35	5,37	2,93

[1]Dados originais apresentados; para análise estatística os dados foram transformados em x^{-2}. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Tabela 3.3 - Esporulação de três isolados de *Metarhizium anisopliae* cultivados por 10 dias a 26 ± 1°C, 12 horas de fotofase em diferentes meios de cultura

Isolados	Produção de conídios por colônia ($x10^7$)		
	ME	ME + 2,5 $g.L^{-1}$ de BSA	ME + 0,5 $g.L^{-1}$ Kunitz
ESALQ-1037	3,47 ± 0,14 Ab	6,23 ± 1,9 ABb	84,5 ± 4,4 Aa
E9	2,13 ± 0,32 Ac	8,17 ± 0,60 Ab	66,3 ± 3,5 Aa
IBCB348	0,024 ± 0,002 Bb	2,94 ± 0,27 Ba	1,83 ± 0,03 Ba

ME: Meio de Esporulação; BSA: albumina de soro bovino; Kunitz: inibidor purificado de proteinase de soja. CV: 25,2. Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna e seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Observa-se que existe uma interação entre o isolado e o meio de cultivo ($F_{4;18}$ = 76.25; P< 0,0001). O isolado ESALQ-1037 é o mais produtivo e o isolado IBCB348 apresenta a menor produção de conídios em ambos os meios ($F_{2;18}$ = 521,11; P< 0,0001). O meio ME resultou em menor esporulação para todos os isolados. Os isolados ESALQ-1037 e E9 produziram quantidades intermediárias de conídios no meio com adição de albumina de soro bovino. Porém, para o isolado IBCB348 não houve diferença na esporulação em meio com a adição de albumina de soro bovino ou a adição do inibidor Kunitz ($F_{2;18}$ = 521,11; P< 0,0001).

O isolado F20, que normalmente não produz conídios satisfatoriamente em meio de esporulação, teve sua esporulação multiplicada por 50,8 vezes quando a este meio foi adicionado os inibidores semi-purificados de soja (IPS) (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Avaliação da esporulação do isolado F20 de *Metarhizium anisopliae* em resposta a adição de inibidor de proteinase de soja ao meio de cultura pelo número de conídios das colônias crescidas por 10 dias a 26 ± 1°C, 12 horas de fotofase

Isolados	Produção de conídios por colônia ($x10^7$)	
	ME	ME + 5 $g.L^{-1}$ IPS
F20	0,91 ± 0,10 Bb	46,2 ± 7,1 Ba
ESALQ-1037	104 ± 5,0 Ab	201 ± 13 Aa

ME: Meio de Esporulação; IPS: inibidores de proteinases de soja semi-purificados. CV: 21,9; Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna e seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Com base nos resultados das tabelas acima é possível observar que o incremento na produção de conídios de *M. anisopliae* não é provocado por qualquer tipo de inibidor de protease. A esporulação foi afetada de forma expressiva pelos inibidores de proteinase proveniente de soja, purificado do tipo Kunitz ou semi-purificados. Além disso, vários isolados se mostraram sensíveis a ação destes inibidores.

3.2.2.2 Virulência do fungo *Metarhizium anisopliae* cultivado em meio com inibidores de proteinase de soja

A composição do meio de cultura influenciou a eficiência dos conídios de *M. anisopliae* (Tabela 3.5). Conídios produzidos no meio de esporulação (ME) apresentaram a menor eficiência entre os tratamentos ($F_{7;\ 40}$ =8,52; P< 0,0001), enquanto que conídios produzidos nos meios ME com adição de 0,5 $g.L^{-1}$ de inibidor de proteinase de soja purificado do tipo Kunitz (ME + 2,5 $g.L^{-1}$ K), com adição de albumina de soro bovino (BSA), com substituição do extrato de levedura por peptona (ME - Peptona) e no meio de batata dextrose ágar (BDA) apresentaram maior virulência. A mortalidade confirmada nestes meios variou de 43,3 ± 3,3% em BDA a 63,3 ± 5,6% em ME + 0,5 $g.L^{-1}$ K. A eficiência de controle dos conídios produzidos em ME + 2,5 $g.L^{-1}$ K (60,3 ± 5,2%) foi quase 10 vezes superior ao meio ME sem o inibidor (6,7 ± 4,9%).

A adição de peptona de soja em ME, ou a substituição do extrato de levedura do meio ME pela peptona de soja resultou em aumento na virulência dos conídios ($F_{7;\ 40}$ =8,52; P< 0,0001) quando comparada a conídios produzidos no meio de esporulação.

Tabela 3.5 - Mortalidade total, mortalidade confirmada e eficiência dos conídios de *Metarhizium anisopliae* produzidos em diferentes meios de cultura sobre *Diatraea saccharalis*, após treze dias a 26 ± 1 °C e fotofase de 12 horas

Tratamentos[1]	Mortalidade Total(%)	Mortalidade Confirmada(%)	% Eficiência[2]
ME + 0,5 $g.L^{-1}$ K	65 ± 6,19 a	63,3 ± 5,57 a	60,30 ± 5,17 a
ME + 2,5 $g.L^{-1}$ BSA	56,7 ± 4,94 ab	56,7 ± 4,94 ab	51,33 ± 3,11 ab
ME (Peptona)	53,3 ± 9,89 abc	53,3 ± 9,89 abc	48,45 ± 11,62 ab
ME + 2,5 $g.L^{-1}$ K	43,3 ± 3,33abc	43,3 ± 3,33 abc	38,47 ± 4,73 abc
BDA	43,3 ± 3,33 abc	43,3 ± 3,33 abc	38,47 ± 4,73 abc
ME + 5 $g.L^{-1}$ IPS	36,7 ± 6,15 bc	36,7 ± 6,14 bc	31,78 ± 6,56 bc
ME + 2,5 $g.L^{-1}$ Peptona	33,3 ± 8,43 c	33,3 ± 8,43 c	20,33 ± 5,78 c
ME	11,67 ± 5,43d	11,67 ± 5,42 d	6,68 ± 4,94 d
Testemunha	5,0 ± 3,41 d	-	..
C.V.	27,94	25,54	29,79

[1]ME: Meio de Esporulação; ME (Peptona): Meio de Esporulação com o extrato de levedura substituído por peptona de soja na mesma proporção; BSA: Meio de albumina de soro bovino; IPS: inibidores de proteinases semi-purificados; K: inibidor purificado do tipo Kunitz; BDA: Batata Dextrose Ágar (Potato Dextrose Agar, Difco™). [2]A eficiência dos tratamentos foi estimada pela fórmula Scheider-Orelli (1947).
Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Nota: Sinais convencionais utilizados:
- Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento.
.. não se aplica dado numérico.

3.2.2.3 Virulência de conídios de *Metarhizium anisopliae* quando aplicados em suspensões contendo inibidores de proteinase de soja

Em meio de cultura (BDA) os inibidores ou fontes protéicas, em suspensão com os conídios, não alteraram a viabilidade dos mesmos, sendo superior a 90% em todos os tratamentos. A presença do inibidor de proteinase de soja purificado do tipo Kunitz nas suspensões de conídios de *M. anisopliae* reduziu significativamente a eficiência do fungo no controle de *D. saccharalis*. Enquanto as pulverizações de conídios de *M. anisopliae* isoladamente resultaram em 85,8% de controle, a eficiência de *M. anisopliae* + Kunitz foi de apenas 35,1%, valor inferior a eficiência apresentada pelos demais tratamentos ($F_{6;\ 28} = 22{,}50$; $P<0{,}0001$).

As adições das proteínas, peptona de soja ou albumina de soro bovino, usadas como controle positivo não afetaram a eficiência das suspensões de conídios ($F_{6;\ 28} = 22{,}5$; $P<0{,}0001$). Da mesma forma, as mortalidades corrigidas de lagartas de *D. saccharalis* na presença de inibidores de proteinase de soja do tipo Bowman-Birk não diferiram da mortalidade apresentada pelo tratamento que continha apenas *M. anisopliae*, mostrando que estes inibidores, assim como outras fontes protéicas não afetaram a virulência dos conídios do fungo entomopatogênico (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 - Mortalidade corrigida de lagartas de *Diatraea saccharalis* 22 dias após a pulverização de *Metarhizium anisopliae* em suspensão contendo inibidores de proteinase de soja ou fontes de proteína

Tratamentos	**% Mortalidade Corrigida[1]**
M. anisopliae	85,8 ± 7,4 a
M. anisopliae + Pepetona de soja	85,1 ± 5,6 a
M. anisopliae + Bowman-Birk (BBI)	85,3 ± 5,2 a
M. anisopliae + Albumina de Soro Bovino (BSA)	73,5 ± 11,5 a
M. anisopliae + Inibidores Semi-Purificados (IPS)	69,1 ± 6,2 a
M. anisopliae + Kunitz	35,1± 4,7 b
C.V	23,23

[1]Médias ± erro padrão seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (P = 0,05).
A mortalidade foi corrigida fórmula Scheider-Orelli (1947).

Embora a adição de inibidores de proteinase de soja semi-purificados na suspensão de conídios tenham resultado em uma eficiência de apenas 69,1 ± 6,2 %, este valor não diferiu estatisticamente do controle sem inibidores. Os conídios em suspensão com inibidores de proteinase de soja semi-purificados levaram mais tempo para causar a morte das lagartas (Figura 3.1 e Tabela 3.7). O tempo letal médio passou de 4,7 (3,4 - 5,8) dias no tratamento controle para 24,2 (14,4 -148,9) dias no tratamento com inibidores do tipo Kunitz.

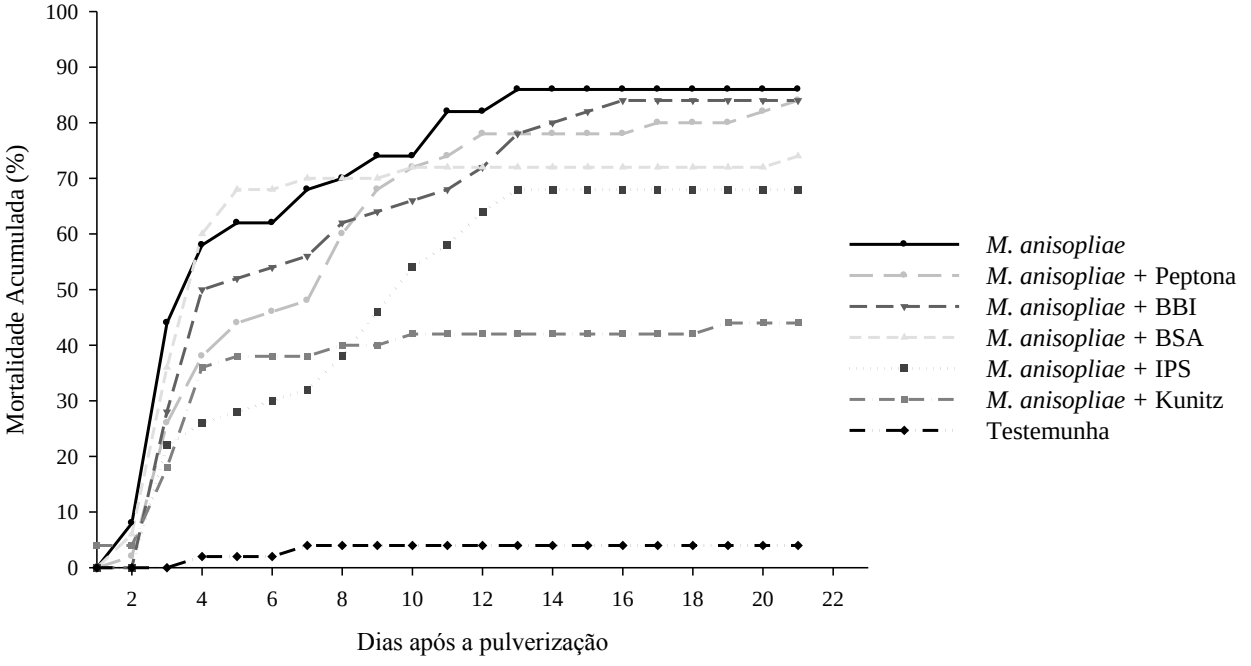

Figura 3.1 - Mortalidade diária acumulada de lagartas de *Diatraea saccharalis* pulverizadas com suspensões de *Metarhizium anisopliae* contendo inibidores de proteinase de soja ou proteínas

A velocidade da infecção por *M. anisopliae* foi semelhante para os tratamentos com suspensão apenas de conídios puros e suspensão de conídios com adição de peptona de soja ou albumina de soro bovino ou inibidor de proteinase de soja purificado do tipo Bowman-Birk (BBI).

Tabela 3.7 - Tempos letais medianos (TL_{50}) em dias, intervalo de confiança (IC) (P>0,05), equações de regressão linear e valores de x^2 obtidos pela análise de Probit, para os conídios aplicados em suspensão contendo inibidores de proteinase de soja ou fontes de proteína

Substância adicionada a suspensão de *M. anisopliae*	**TL_{50}**	**IC**	**Equação**	**x^2**
Controle	4,7	(3,4;5,8)	Y= 3,44+2,32x	4,11
Peptona de Soja	6,5	(5,0;8,0)	Y=3,17+2,24x	4,48
Albumina de Soro Bovino	5,1	(2,9;7,0)	Y=4,06+1,33x	10,98
Inibidor Purificado Kunitz	24,2	(14,4;148,9)	Y=3,74+0,91x	7,65
Inibidor Purificado BBI	6,3	(4,7;7,7)	Y=3,34+2,09x	5,08
Inibidores Semi-Purificados	9,6	(7,7;11,7)	Y=2,89+2,15x	3,44

[ns] x^2 não significativo (P<0,05).

3.2.3 Discussão

Alguns inibidores de tripsina e quimotripsina podem se ligar a enzimas digestivas de fungos afetando o desenvolvimento destes microrganismos. A maioria dos estudos sobre as interações entre fungos e inibidores de proteinase foi conduzida com fitopatógenos. Por exemplo, Molosov et al. (1976), mostrou que os inibidores de tripsina e quimotripsina semi-purificados de feijão, soja e batata suprimiram a atividade de serinoproteinases extracelular do fungo fitopatogênico *Fusarium solani*. Lorito et al. (1994) trabalhando com fungos fitopatogênicos indicaram que inibidores de proteinases do tipo tripsina e quimiotripsina, semi-purificados de repolho foram responsáveis pela inibição de enzimas necessárias ao desenvolvimento microbiológico. Resultados semelhantes foram obtidos com inibidor de tripsina extraído de trigo que suprimiu a atividade das proteinases do fungo *Alternaria alternata* (Dunaevskii et al., 1996). Ievleva et al. (2006) também mostraram que inibidores de quimotripsina extraídos de batata interferiram no crescimento e desenvolvimento do fungo *Phytophthora infestans*. Os inibidores de proteases parecem regular a proteólise das proteínas de reserva durante a germinação e, paralelamente também apresentam ação inibitória sobre proteínas de patógenos (XAVIER-

FILHO, 1992). Verifica-se então que os inibidores enzimáticos apresentam papel importante na resistência de plantas contra fitopatógenos.

Neste estudo, demonstramos que os inibidores de proteinase de soja semi-purificados e especialmente o inibidor purificado do tipo Kunitz afetaram positivamente a produção e virulência de conídios de *M. anisopliae* quando os inibidores foram adicionados ao meio de crescimento do fungo e também afetaram negativamente a capacidade do fungo de causar a morte de lagartas de *D. saccharalis* quando estes foram adicionados às suspensões de conídios. A adição destes inibidores resultou num aumento considerável na produção de conídios. Os fatores associados à maior indução na esporulação de *M. anisopliae* não foram determinados, mas uma possibilidade é de que estes inibidores estejam bloqueando as proteases de origem fúngicas, diminuindo a absorção protéica e consequentemente estimulando a esporulação. O aumento de proteínas no meio pode estimular o crescimento vegetativo em detrimento da esporulação. Por exemplo, maiores quantidades de conídios foram obtidos por Shah, Wang e Butt (2005) em meio com 35:1 C:N (4% glicose + 1% peptona = SDA). O meio ME utilizado apresenta apenas 0,5% de proteína (extrato de levedura) e o teor de inibidor de proteinase do tipo Kunitz utilizado foi de somente 0,5 $g.L^{-1}$. É pouco provável que os aumentos de até 76 vezes, em um dos isolados do fungo, na quantidade de esporos seja atribuído ao efeito nutricional, como uma fonte protéica extra, promovido pela adição desta pequena porcentagem de Kunitz. Alguns resultados obtidos neste estudo corroboram a hipótese levantada acima sobre a atividade anti-nutricional dos inibidores de proteinase em *M. anisopliae*. A adição de peptona de soja ao meio como outra fonte protéica não afetou a produção de conídios significativamente, como obtido pela adição de inibidores de proteinases de soja. Isto poderia rejeitar a hipótese de que os inibidores de proteinases estariam sendo utilizados pelo fungo com uma fonte extra de proteína.

Por outro lado, a adição de BSA como outra fonte protéica utilizada como controle no experimento, também estimulou a esporulação de *M. anisopliae*, embora em menor escala do que os IPS dependendo do isolado. BSA pode então estar desempenhando um papel nutricional ou anti-nutricional assim como sugerido para o inibidor de proteinase do tipo Kunitz. BSA apresenta uma série de propriedades em vários organismos, podendo inclusive se ligar a ácidos graxos, outros lipídeos e outros compostos. Paterson et al. (1993) observaram um aumento de aproximadamente 15 vezes na atividade Pr2 por mg de peso seco do micélio quando o fungo foi

cultivado na presença de albumina de soro bovino, porém não foi observado o efeito desta fonte protéica sobre a produção de conídios.

Não somente as características fisiológicas, mas também as características morfológicas de *M. anisopliae* variam em função dos meios de cultura. Variações na coloração dos conídios pela composição nutricional dos meios de cultura já foram documentadas por Jabor et al. (2003), porém, não há relato na literatura quanto a influência de inibidores de proteinase sobre as características morfológicas de *M. anisopliae.* Observou-se neste trabalho que a adição dos inibidores de proteinase de soja ao meio ME alterou a pigmentação dos conídios para tons verde oliva mais escuros com maior higroscopicidade, diferentes dos conídios amarelos produzidos em ME sem os inibidores.

Os fungos entomopatogênicos utilizam peptidases para romper a cutícula dos insetos hospedeiros. A intensidade da produção destas peptidases durante a germinação dos conídios está associada à virulência do patógeno, entre outros fatores (St. LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1987; St. LEGER et al., 1989). Uma das proteases mais estudadas em *M. anisopliae* é a Pr1, que é reprimida na presença de excesso de nutrientes e induzida em condições de stress como, por exemplo, em meios pobres nutricionalmente (FREIMOSER; HU; St. LEGER, 2005; SHAH; WANG; BUTT, 2005; St. LEGER; STAPLES; ROBERTS, 1991; WANG; TYPAS; BUTT, 2002). Estes últimos autores mostraram que a nutrição do fungo influencia a composição de carbono e nitrogênio dos conídios, a taxa de germinação, os níveis de Pr1 e que esses parâmetros podem predizer a virulência do inóculo. Em geral, meios que proporcionam maiores produções de conídios resultam em conídios pouco virulentos e vice-versa (SHAH; WANG; BUTT, 2005). A hipótese de que os inibidores de proteinase de soja do tipo Kunitz agem como fatores anti-nutricionais tornando o meio nutricionalmente mais pobre é corroborada pelos resultados que revelam que os conídios de *M. anisopliae* produzidos em meios com estes inibidores são mais virulentos do que aqueles produzidos na ausência dos inibidores. Entretanto, outros fatores podem estar associados ao aumento da virulência. Observou-se que os conídios provenientes dos meios com adição de inibidores de proteinase de soja purificados ou semi-purificados apresentavam maior hidrofobia que os produzidos em meio de esporulação. Conídios mais hidrofóbicos apresentam maior capacidade de adesão ao tegumento do inseto e consequentemente causam maior mortalidade.

A redução da eficiência do fungo pela adição de inibidor do tipo Kunitz nas suspensões de conídios no momento da aplicação sobre lagartas de *D. saccharalis*, pode ser devido a ação do inibidor bloqueando as enzimas proteolíticas do fungo e impedindo a digestão da cutícula dos insetos. A adição de inibidores semi-purificados pode ter causado um atraso na secreção de enzimas fúngicas, que auxiliam o processo de infecção e colonização do hospedeiro A infecção por *M. anisopliae*, cuja principal via é o tegumento, é dificultada ou mesmo impossibilitada caso a barreira protéica da cutícula não seja vencida. Sasaki et al. (2008) descreveram um inibidor de subtilisina, o BmSI-7, proveniente de ovos do carrapato *Boophilus microplus*. Foi verificado que este inibidor é capaz de inibir a protease Pr1 de *M. anisopliae*. Como é a principal enzima produzida durante a infecção para degradar o tegumento do hospedeiro, a produção de um inibidor pode conferir maior proteção aos ovos do carrapato perante o entomopatógeno.

Uma das dificuldades no desenvolvimento de novos meios de cultura para produção de *M. anisopliae* é que em geral, a eficiência na produção de conídios está negativamente correlacionada à virulência dos conídios produzidos. As alterações fisiológicas em *M. anisopliae* por inibidores de serinoproteases do tipo Kunitz induzindo maiores produções de conídios com alta virulência traz uma nova perspectiva no desenvolvimento de novos meios de cultura para produção industrial deste fungo.

St. Leger, Charnley e Cooper (1987) mostraram que o fungo *M. anisopliae* produz um mistura de proteases extracelulares, sendo as peptidases já caracterizadas. Existem basicamente dois tipos, uma quimoelastase, a Pr1 responsável pela degradação da cutícula dos insetos e a Pr2, que tem especificidade muito maior. A Pr2 hidrolisa caseína e substratos sintéticos contendo arginina ou lisina, porém tem pouca ou nenhuma atividade contra a cutícula do inseto hospedeiro. Proteinases extracelulares de vários fungos filamentosos (saprofitícos e fitopatogênicos) foram inibidas pelo PMSF (DUNAEVSKII et.al, 2006), da mesma forma as proteases serinicas, que são fatores determinantes da patogenicidade de fungos nematófagos, são altamente sensíveis a este inibidor. Porém, nenhum desses trabalhos relacionou a inibição da atividade proteolítica com aumento da esporulação e virulência dos fungos.

3.3 Considerações Finais

A adição de inibidores de proteinase de soja em meio ME aumenta a produção de conídios de *M. anisopliae*. Conídios aplicados em suspensão com inibidor de proteinase de soja purificado do tipo Kunitz tem sua virulência reduzida. Porém estudos mais detalhados são necessários para esclarecer o mecanismo de ação destes inibidores.

Referências

ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO JR. A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos.** 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 20, p. 637-710.

AUGUSTYNIAK, J.; DABERT, M.; WYPIJEWSKI, K. Transgenes in plants: protection against viruses and insects. **Acta Physiologiae Plantarum,** Heidelberg, v. 19, n. 4, p. 561-569, Dec. 1997.

BEERS, E. P.; JONES, A.M.; DICKERMAN, A. W. The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease familes in Arabidopis, **Phytochemistry,** New York, v. 65, n. 1, p. 43-58, Jan. 2004.

CHARNLEY, A.K.; St. LEGER, R.J. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: COLE, G.T.; HOCH, M.C. (Ed.). **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York: Plenum, 1991. p. 267-286.

CHILOSI, G.; CARUSO, C.; CAPORALE, C.; LEONARDI, L.; BERTINI, L.; BUZIO, A.; NOBILE, M.; MAGRO, P.; BUONOCORE, V. Antifungal activity of a Bowman-Birk type trypsin inhibitor from wheat kernel. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 148, p. 477-481, Aug. 2000.

COLE, S.C.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Purification and partial characterization of a novel trypsin-like cysteine protease from *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.113, n. 2, p. 189-196, Oct. 1993.

DUNAEVSKII, YA.E.; PAVLYUKOVA, E.B.; GRUBAN,T.N.; BELYAKOVA, G.A.; BELOZERSKII, M.A. Extracellular protease in the micromycete *Alternaria alternata.* **Biokhimiya,** Moscow, v. 61, n. 10, p.1904-1910, 1996.

DUNAEVSKII, YA.E.; GRUBAN,T.N.; BELYAKOVA, G.A.; BELOZERSKII, M.A. Extracellular proteinases of filamentous fungi as potential markers of phytopathogenesis **Microbiology,** Reading, v. 75, n. 6, p. 747–751, Dec. 2006.

FINNEY, D.J. **Probit analisis**. 3rd ed. London: Cambridge University Press, 1971. 333p.

FREIMOSER, F.M.; HU, G.; St. LEGER, R.J.; Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation *in vitro*. **Microbiology,** Reading, v. 151, p. 361-371, Feb. 2005.

GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. **Pesticide Science**, London, v. 52, n. 2, p. 165-175, Feb. 1998.

GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial Enzymology.** 2nd ed. New York: MacMillan Publishers, 1996. 73 p.

IEVLEVA, E.V.; REVINA, T.A.; KUDRYAVTSEVA, N.N.; SOF'IN, A.V.; VALUEVA, T.A., Extracellular proteinases from the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum.* **Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya,** Moscow, v. 42, n. 3, p. 338–344. May 2006.

JABOR I.A.S.; PAMPHILE, J.A.; RODRIGUES, S.B.; MARQUES-SILVA, G.G.; ROCHA, C.L.M.S.C.da. Análise do desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em resposta a fatores nutricionais. **Acta Scientarium Agronomy**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 497-501, jan./jul. 2003.

KING, E.G.; HARTLEY, G.G. *Diatraea saccharalis*. In: SINGH, P.; MOORE, R.F. (Ed.). **Handbook of insect rearing**. New York: Elsevier, 1985. p. 265-270.

LASKOWSKI Jr., M.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry,** Palo Alto, v. 49, p. 593-626, July 1980.

LORITO, M.; BRODWAY, M.; HAYES, C.K.; WOO, S.L.; NOVIELLO, C.; WILLIAMS, D.L.; HARMAN, G.E. Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicides. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 7, p. 525-527, July/Aug.1994.

McMANUS, M.T.; BURGESS, E.P.J. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larval of *Spodoptera litura*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 41, n. 9, p.731-738, Sept. 1995.

MOLOSOV, V.V.; LONGINOVA, M.D.; FEDURKINA, N.V.; BENKEN, I.I. The biological significance of proteinase inhibitors in plants. **Plant Science Letters,** Amsterdam, v. 7, n. 2, p. 77-80, Aug. 1976.

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R.J.; BOND, J.S. (Ed.). **Proteolytic enzimes:** a pratical approach. New York: Oxford University Press, 1996. chap. 1, p. 1-14.

PATERSON, I.C.; CHARNLEY, A.K; COOPER, R.M.; CLARKSON, J.M. Regulation of production of a trypsin-like protease by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters,** Amsterdam, v. 109, p. 323-327, May 1993.

POMPERMAYER, P.; FALCO, M.C.; PARRA, J.R.P.; SILVA-FILHO, M.C. Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz-type soybean proteinase inhibitor effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 109, n. 3, p. 217-224, Dec. 2003.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**: version. 9.1.3, Cary, 2003. 1167 p.

SASAKI, S.D.; LIMA, C.D. DE; LOVATO, D.V.; JULIANO, M.A.; TORQUATO, R.J.S.; TANAKA, A.S. BmSI-7, a novel subtilisin inhibitor from *Boophilus microplus*, with activity toward Pr1 proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Parasitology,** San Diego, v. 118, n. 2, p. 214–220, Feb. 2008.

SCHEIDER-ORELLI, O. **Entomologisches Praktikum:** Einfuehrung in die land – un forstwirtschaftliche Insektekunde. Ararau: Zweite Aufl., 1947. 237 p.

SHAH, F.A.; WANG, C.S.; BUTT, T.M. Nutrition influences growth and virulence of the insectpathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters.** Amsterdam, v. 251, n. 2, p. 259-266, Oct. 2005.

SIMÕES, R.A. **Efeitos de inibidores de proteinases de soja em organismos não-alvo associados á cultura da cana-de-açúcar.** 2007. 77 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

St. LEGER, R.J.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 313, n. 1, p. 1-7, Aug. 1994.

St. LEGER R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. **Journal of Invertebrate pathology**, San Diego, v. 48, n. 1, p. 85-95, July 1986.

St. LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 133, p. 1371-1382, May 1987.

St. LEGER, R.J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 2, p. 709-713, Feb. 1998.

St. LEGER, R.J.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Changes in translatable mRNA species associated with nutrient deprivation and protease synthesis in *Metarhizium anisopliae*. **Journal of General Microbiology.** London, v. 137, p. 807-815, Apr. 1991.

St. LEGER, R.J.; BUTT, T.M.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, Orlando, v.13, n. 3, p. 253-262, Sept. 1989.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology: Biochemistry and Molecular Biology,** Oxford, v. 109, n. 1, p.1-62, Sept. 1994.

TORNERO, P.; MAYDA, E.; GOMEZ, M.D.; CANAS, L.; CNEJERO, V.; VERA, P. Characterisation of LRP, a leucine-rich repeat (LRR) protein from tomato plantas that is processed during pathogenesis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 315-330, Aug. 1996.

WALKER, A.J.; FORD, L.; MAJERUS, M.E.N.; GEOGHEGAN, I.E.; BIRCH, N.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Characterization of the mid-gut digestive proteinase activity of the two-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.) and its sensitivity to proteinase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology,** Oxford, v. 28, n. 3, p. 173-180, Mar. 1998.

WANG, C.; TYPAS, M.A.; BUTT, T.M. Detection and characterisation of Pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 213, n. 2, p. 251-255, Aug. 2002.

WIECZOREK, M.; OTLEWSKI, J.; COOK, J.; PARKS, K.; LELUK, J.; WILIMOWSKA-PELC, A.; POLANOSXSKI, A.; WILUSZ, T.; LASKOWSKI Jr.,M. The squash family of serine proteinase inhibitors. Amino acid sequences and association equilibrium constants of inhibitors from squash, summer squash, zucchini, and cucumber seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** Orlando, v. 126, n. 2, p. 646-651, Jan. 1985.

XAVIER-FILHO, J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inibitors in plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 4, n. 1, p. 1-6, jan./abr. 1992.

4 INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DE DIFERENTES TIPOS DE ARROZ E ADITIVOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* (MESTCH.) SOROKIN (ASCOMYCOTA: HYPOCREALES)

Resumo

O sucesso do uso do entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* é representado pelo grande volume de produção e comercialização deste agente para o controle de diversas pragas, especialmente para o controle da cigarrinha da cana-de-açúcar. O volume de produção de fungos entomopatogênicos no Brasil é de 3000 toneladas de arroz mais fungo, sendo o arroz o único ingrediente usado, principalmente para produção de *M. anisopliae*. Com o intuito de gerar subsídios para melhoria do processo de produção de *M. anisopliae* em arroz e garantir maior eficiência no controle microbiano de pragas, foram realizados estudos comparando a produção, viabilidade e virulência dos conídios produzidos em diferentes tipos de arroz e aditivos. Posteriormente, tentou-se correlacionar a produção de conídios com as características dos diferentes tipos de arroz como o valor nutricional, o teor de resíduos de agrotóxicos e a densidade de microorganismos. O arroz parboilizado foi responsável pela maior produção de conídios (4,38 x 10^9 conídios.g^{-1}). Este tipo de arroz apresentou teor de proteína bruta (8,9 ± 0,1%) menor do que a maioria dos arrozes e o maior teor de umidade (41,3% após a autoclavagem). Além disto, os grãos deste arroz após autoclavagem não ficaram gelatinosos e ficaram mais soltos, o que facilita o processo de produção do fungo. Enquanto que os arrozes dos tipos branco polido, canjicão e integral ficaram pegajosos e formaram grumos, o que provavelmente deve acarretar em menor superfície de desenvolvimento para o fungo. O segundo melhor arroz, o canjicão, com produção de 3,42 x 10^9 conídios.g^{-1}, teve a maior quantidade de fungos contaminantes nos grãos crus. Quantidades intermediárias de conídios foram produzidas pelos arrozes do tipo branco polido irrigado, branco polido de terras altas e branco polido orgânico, 2,68 x 10^9, 2,53 x 10^9, 2,50 x 10^9 conídios.g^{-1}, respectivamente. O integral foi o tipo de arroz que resultou na menor quantidade de conídios (1,53 x 10^9 conídios.g^{-1}) e foi o mais rico em minerais, proteína bruta e extrato etéreo. Não foram detectados resíduos de agrotóxicos em nenhum dos tipos de arroz. Nenhum dos aditivos (farelo de soja, grãos de soja partidos, extrato de soja, peptona de soja, inibidores de proteinases de soja semi-purificados, inibidor de proteinase purificado do tipo Kunitz, polpa cítrica e levedura) resultou em aumento na produção de conídios em comparação com o arroz parboilizado sem aditivos. Os conídios produzidos em todos os tipos de arroz e aditivos apresentam viabilidade superior a 99%. Os tipos de arroz e aditivos exceto polpa cítrica, utilizados como substratos de produção do entomopatógeno, não mostraram ter influência significativa sobre a eficiência dos conídios quando aplicados em *Diatraea saccharalis*. A polpa cítrica apresentou ligeira redução na virulência do fungo. As vantagens da utilização do arroz parboilizado levando-se em consideração o custo, facilidade de manuseio e produtividade são discutidas.

Palavras-chave: Controle microbiano; Produção de *Metarhizium anisopliae*; Arroz

Abstract

The successful use of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in Brazil is represented by the large volume of production and marketing of this agent for the control of various pests, especially *M. anisopliae* used in the control of sugar cane spittlebug. The production of entomopathogenic fungi in Brazil is about 3,000 tons of rice plus fungus, being rice the only ingredient used, mostly for production of *M. anisopliae*. In order to improve the production of *M. anisopliae* in rice and ensure greater efficiency in the microbial control of pests, studies were carried out to compare the production, viability and virulence of conidia produced in different types of rice and additives. Later, we tried to correlate the production of conidia with the characteristics of different types of rice as the nutritional value, the residues of pesticides and the density of microorganisms. The parboiled rice was responsible for greater production of conidia (4.38×10^9 conidia.g^{-1}). This type of rice had crude protein content lower than that of most rice and the highest moisture content (41.3% after autoclaving), and a feature that favors fungus production is to have less gelatinous and loose grains. While types of polished white, brown rice and course rice grain were sticky and formed clumps, providing a smaller area for fungus development. The second best rice, course rice grain, with production of 3.42×10^9 conídia.g^{-1} had the highest amount of fungal contaminants in raw grains. Intermediate amounts of conidia were produced by white irrigated polished rice, upland rice and organic rice, 2.68×10^9, 2.53×10^9, 2.50×10^9 conidia.g^{-1}, respectively. The brown rice was the kind that resulted in fewer conidia (1.53×10^9 conídios.g^{-1}), being the richest in minerals, protein and lipids. There were no detectable residues of pesticides in all types of rice. None of the additives (soybean meal, soybean parties, soy extract, soy peptone, semi-purified soybean proteinase inhibitor, Kunitz-type inhibitor purified, citrus pulp and yeast) resulted in increased production of conidia compared to parboiled rice additive-free. Conidia produced in all types of rice and additives presented greater than 99% viability. The types of rice and additives, except citrus pulp, used as substrates for production of the entomopathogenic fungus, did not show any significant influence on the efficiency of conidia when applied against *Diatraea saccharalis*. The citrus pulp had a slight reduction in virulence of the fungus. The advantages of the use of parboiled rice regarding cost, easy handling and productivity are discussed.

Keywords: Microbial control; Production of *Metarhizium anisopliae*; Rice

4.1 Introdução

Biopesticidas microbianos constituem um método efetivo de controle de artrópodes-pragas. Dentre esses agentes, os fungos entomopatogênicos, se adaptam bem à produção *in vitro*, e por não causarem efeitos negativos ao homem, aos animais e ao meio ambiente, estes têm sido utilizados como alternativa aos inseticidas químicos convencionais.

Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin tem sido utilizado no controle de pragas em várias culturas. O sucesso do uso deste entomopatógeno no Brasil é representado pelo grande

volume de produção e comercialização deste agente de controle por cerca de onze empresas de biopesticidas privadas e por mais de vinte laboratórios ligados às usinas de cana-de-açúcar que produzem o fungo para consumo próprio.

Na década de 60, o programa de controle da cigarrinha-das-folhas (*Mahanarva posticata*) na região Nordeste impulsionou as pesquisas com o fungo *M. anisopliae.* A tecnologia de produção, que já envolvia a utilização do arroz cozido, foi importada de Trinidad & Tobago e ainda é o substrato usado no sistema de produção em diversos países da América Latina. Duas importantes mudanças no sistema de produção ocorrem desde então: a substituição da produção em garrafas de vidro por sacos de polipropileno autoclaváveis em 1977 e posteriormente pela produção em bandejas proposta por Alves e Pereira em 1989 (ALVES; PEREIRA, 1989). Desde então, não ocorreram alterações importantes no processo de produção e o sistema mais usado ainda é o de arroz em sacos de polipropileno (ALVES et al., 1998, 2008).

A produção de álcool combustível se consolidou como alternativa renovável e pouco poluente ao uso de combustíveis fósseis como o petróleo. A projeção é de que para suprir a demanda interna e externa o Brasil deverá dobrar a sua produção de álcool nos próximos cinco a sete anos, o que requer entre outras coisas um crescimento da área cultivada com cana-de-açúcar e melhoria no manejo de pragas e doenças. A cana-de-açúcar é a cultura que mais explora o controle microbiano no Brasil, com a utilização do fungo *M. anisopliae.* O aumento da mecanização da colheita e consequentemente a redução da queimada da cana tem sido responsável por um aumento das populações de cigarrinha exigindo intervenções mais frequentes de controle. Associado a isto nos últimos anos ocorreu uma forte expansão da área plantada com cana o que refletiu numa maior demanda por produtos a base de *M. anisopliae*. O aumento da escala de produção do fungo usando arroz como substrato é limitado pela dificuldade em se evitar contaminantes quando o volume de arroz utilizado diariamente ultrapassa algumas toneladas por dia. Desta forma, uma alternativa é aumentar a eficiência de produção através do aperfeiçoamento dos processos e do controle de qualidade da produção.

A composição do meio (substrato) de cultivo exerce forte influência sobre a produtividade, viabilidade e virulência dos conídios de *M. anisopliae*. Estudos realizados no país têm considerado apenas o aspecto quantitativo da produção ignorando o aspecto qualitativo (viabilidade, virulência). Em outros países estes aspectos têm sido estudados conjuntamente, porém o método de produção empregado é geralmente de fermentação líquida ou bifásica que

difere do sistema de fermentação sólida em arroz, empregado no Brasil. Aproximadamente 3.000 toneladas de arroz são usadas anualmente para a produção de fungos entomopatogênicos no Brasil principalmente para cultivo de *M. anisopliae* usado no controle da cigarrinha da cana-de-açúcar (ALVES et al., 2008).

Aumentos na produção de conídios de *M. anisopliae* têm sido observados por diversos autores quando nutrientes extraídos de sementes de soja são adicionados aos meios de cultura. Li e Holdon (1995) observaram grande acréscimo na produção de conídios ao adicionar peptona de soja ao meio, como fonte de nitrogênio. Os mesmos autores reportam que a niacina (vitamina disponível em grãos de soja) também tem efeito positivo. Entretanto, nesses estudos, os aditivos foram incorporados em meios de cultura semi-sólidos e não a grãos de arroz. Sabe-se que o amido presente no grão de arroz é uma excelente fonte de carboidrato para *M. anisopliae* e a adição de ingredientes que disponibilizem outros nutrientes como, por exemplo, proteínas e vitaminas poderiam enriquecer o substrato e resultar em acréscimo na produção de conídios. Porém, tem sido observado que meios ricos em nutrientes geralmente dão origem a conídios com menor capacidade de adesão e virulência, enquanto que conídios produzidos em meios pobres ou sob condições de estresse são altamente virulentos, mas a produtividade nestes meios é baixa (FRIGO; AZEVEDO, 1986; IBRAHIM; BUTT; JENKINSON, 2002; JABOR et al., 2003; KAMP; BIDOCHKA, 2002; RANGEL; ALSTON; ROBERTS, 2008; SHAH; WANG; BUTT, 2005).

Com o intuito de gerar subsídios para melhoria do processo de produção de *M. anisopliae* em arroz e garantir maior eficiência no controle microbiano de pragas foram realizados estudos comparando a produção, viabilidade e virulência dos conídios produzidos em diferentes tipos de arroz. Os parâmetros obtidos no desempenho do fungo foram então correlacionados com as características nutricionais e microbiológicas dos tipos de arroz utilizados. Posteriormente, foram avaliados os efeitos de aditivos no sistema de produção de *M. anisopliae* em arroz parboilizado.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, Piracicaba, São Paulo,

Brasil. O fungo utilizado foi *M. anisopliae* (linhagem ESALQ-1037), isolado de *Solenopsis* sp. procedente de Porto Alegre-RS, que encontra-se armazenado em freezer (-40 °C) na forma de conídios puros no Banco de Patógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ/USP. Para obter a suspensão inicial de inóculo, os conídios foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar – BDA (Potato Dextrose Agar, Difco™) e espalhados com auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D por sete dias, a 26 ± 1°C e doze horas de fotofase.

Os diferentes tipos de arroz utilizados durante a pesquisa foram provenientes de um único lote para cada tipo. O arroz polido orgânico e o arroz polido branco produzido em sistema irrigado foram adquiridos em supermercados em Piracicaba-SP, o arroz polido branco produzido em sistema de Terras Altas foi cedido pela Embrapa Arroz e Feijão, localizada em Santo Antônio de Goiás-GO, os tipos Canjicão (arroz quebrado) e o parboilizado foram doados pela empresa Itaforte Bioprodutos, Itapetininga-SP e o arroz tipo Integral foi cedido pela Cerealista Gardenali, Tietê-SP.

4.2.1.1 Produção de conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos de arroz

Os tratamentos foram compostos por seis tipos de arroz: (1) arroz branco polido irrigado; (2) arroz integral; (3) arroz parboilizado; (4) arroz branco polido orgânico; (5) arroz branco polido de terras altas e (6) arroz tipo canjicão. O experimento foi realizado duas vezes (repetição no tempo). Lotes de 250 g de grãos de cada tipo de arroz foram colocados em Becker de vidro contendo 300 mL de água destilada. Os grãos permaneceram em molho por 50 minutos, sendo em seguida escorridos em peneira de malha fina. Por diferença de peso dos grãos, antes e após o molho, determinou-se a quantidade de água absorvida em cada tratamento. O peso do arroz úmido foi divido igualmente em cinco frascos de vidro (frascos redondos para reagentes em vidro borossilicato, graduado, com tampa rosqueável e dispositivo anti-gota da marca Schott com capacidade de 250 mL). O experimento foi inteiramente aleatorizado, composto por seis tratamentos e cinco repetições.

Os frascos foram então fechados e esterilizados em autoclave a 120°C por 30 minutos. Após o resfriamento os grãos foram inoculados, em câmara de fluxo vertical, com 5 mL de uma suspensão com concentração de 1×10^8 conídios.mL^{-1} de *M. anisopliae*. Para uma completa

distribuição da suspensão os frascos foram agitados manualmente. Para verificar a viabilidade dos conídios do inóculo inicial, procedeu-se conforme descrito no item 4.2.1.2.

As unidades experimentais foram incubadas por quatorze dias em câmara climatizada do tipo B.O.D com temperatura de 26 ± 1°C e 12 horas de fotofase. Após este período, em cada frasco contendo arroz e fungo, adicionou-se 150 mL de água destilada estéril mais 0,05% de espalhante adesivo (Tween 80®). Para desprender os conídios do substrato, os recipientes foram agitados manualmente por cinco minutos e em seguidas colocados em uma mesa agitadora orbital (modelo: MA 140 CFT, Marconi) programada para 300 rotações por minuto, onde permaneceram por 30 minutos. A contagem de conídios foi feita em câmara de Neubauer a partir de diluições da suspensão original. A quantidade de conídios produzidos foi expressa por grama de substrato.

4.2.1.2 Viabilidade de conídios de *Metarhizum anisopliae* produzidos em diferentes tipos de arroz

Os mesmos seis tratamentos do experimento anterior foram usados. O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado composto por seis tratamentos e quatro repetições, cada unidade experimental constou de um frasco de vidro, conforme citado acima, contendo 50 gramas de grãos de arroz.

Em Becker de vidro contendo 250 mL de água destilada foram adicionados 200 g de grãos de arroz, dos respectivos tratamentos. Os grãos ficaram de molho por 50 minutos, sendo em seguida escorridos em peneira de malha fina. O arroz umedecido foi pesado novamente e pela diferença de peso dos grãos, antes e após a hidratação, determinou-se a quantidade de água absorvida em cada tratamento. O peso do arroz úmido foi divido igualmente em quatro frascos.

Os frascos, contendo o arroz umedecido, foram fechados e esterilizados em autoclave a 120°C por 30 minutos. Após o resfriamento os grãos foram inoculados, em câmara de fluxo vertical, com 5 mL de uma suspensão com concentração de 1 x 10^8 conídios.mL^{-1}. Para uma completa distribuição da suspensão os frascos foram agitados manualmente. A viabilidade dos conídios do inóculo inicial foi verificada conforme descrito anteriormente.

As unidades experimentais foram incubadas por quatorze dias em câmara climatizada do tipo B.O.D com temperatura de 26 ± 1°C e doze horas de fotofase. Após este período foi adicionado a cada frasco, contendo arroz e conídios, 150 mL de água destilada estéril mais 0,05%

de espalhante adesivo (Tween 80®). Para separar os conídios do arroz, os recipientes foram agitados manualmente por cinco minutos e em seguidas colocados em uma mesa agitadora orbital (modelo: MA 140 CFT, Marconi) programada para 300 rotações por minuto, onde permaneceram por 30 minutos. Foi feita a contagem de conídios em câmara de Neubauer e as suspensões de todos os frascos foram acertadas para 1 x 10^6, sendo então destinadas ao teste de viabilidade.

Cada tipo de arroz foi produzido em quatro frascos e para verificar a viabilidade dos conídios produzidos, preparou-se para cada frasco três placas Rodac contendo 4 mL de meio Batata Dextrose Ágar mais 0,5% de antibiótico veterinário (Pentabiótico Veterinário Reforçado, Fort Dodge Saúde Animal Ltda®) e 0,01% de Derozal® (Bayer Cropscience, composição: Methyl benzimidazol-2-ylcarbamato e Tetramethylthiuram dissulfide). No centro de cada placa foi dispensada uma alíquota de 150 µL da suspensão fúngica diluída para a concentração de 1 x 10^6 conídios.mL^{-1}, após a secagem, as placas foram acondicionadas em câmara climatizada do tipo B.O.D a 26 ± 1°C por 24 horas. A porcentagem de viabilidade foi avaliada em microscópio invertido Carl Zeiss (modelo Axioskop 20) contando-se o número de conídios germinados e não germinados em quatro quadrantes da placa.

4.2.1.3 Virulência de *Metarhizum anisopliae* produzido em diferentes tipos de arroz

As lagartas de *D. saccharalis* utilizadas nos experimentos de virulência foram obtidas em uma criação mantida no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ/USP e se encontravam sadias, livres do patógeno *Nosema* sp. Os lepidópteros foram mantidos durante a fase imatura em tubos de vidro contendo dieta artificial de King e Hartley (1985) e acomodados em câmara climatizada do tipo B.O.D com temperatura de 26 ± 1°C e 12 horas de fotofase. As pupas e os adultos foram transferidos para gaiolas acomodadas em sala de criação, sendo que para os adultos ofereceu-se apenas água.

Os tratamentos consistiram na pulverização de suspensões de 5 x 10^8 conídios.mL^{-1} de *M. anisopliae* produzidos nos seis diferentes tipos de arroz, conforme descrito acima. As suspensões foram pulverizadas sobre lagartas de *D. saccharalis* em torre de Potter calibrada a 15 libras.pol^{-2} utilizando-se 2,5 mL da suspensão de conídios. Na testemunha as lagartas foram pulverizadas apenas com água destilada mais 0,05% espalhante adesivo Tween 80®.

Cada tratamento foi composto por seis repetições com 10 lagartas de *D. saccharalis* em terceiro ínstar. Após a pulverização, as lagartas foram mantidas por 10 minutos sobre a superfície pulverizada, a fim de aumentar o contato com os conídios. Posteriormente, grupos de 10 lagartas foram acondicionados em placas de Petri (6 cm de diâmetro), sendo alimentadas diariamente com dieta artificial de King e Hartley (1985) sem anti-contaminantes (Formaldeído e Nipagin). O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado. O experimento foi repetido duas vezes no tempo.

A verificação da viabilidade das suspensões fúngicas, foi realizada conforme descrito anteriormente. Observações diárias foram efetuadas para determinação da mortalidade. Os insetos mortos foram coletados, colocados em câmara úmida e mantidos à temperatura de 26 ± 1°C e doze horas de fotofase. O critério adotado para confirmar a contaminação foi a análise visual da exteriorização dos micélios e conidiogênese do fungo sobre o cadáver do inseto.

4.2.1.4 Análise microbiológica em grãos de arroz: Contagem padrão de bactérias aeróbicas mesófilas, fungos filamentosos e leveduras

a) Grãos crus

As amostras foram preparadas seguindo-se a metodologia indicada por Silva et al. (2001) e Siqueira (1995). Foram selecionados aleatoriamente três sacos de 5 kg para cada tipo de arroz. A área externa das embalagens foi desinfetada com etanol 70%, para remover os contaminantes externos. De forma asséptica, no interior de uma câmara de fluxo laminar, de cada saco foi retirada , uma amostra de 25 g de grãos de arroz, e transferidas para frascos Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, previamente esterilizados. Em cada frasco adicionou-se 225 mL de solução salina a 0,85%, sendo a amostra homogeneizada manualmente.

Para quantificação de bactérias aeróbicas mesófilas empregou-se o meio de cultura “ágar para contagem padrão – PCA” (composição: 5% de triptona, 2,5% de extrato de levedura, 1% de dextrose e 15% de ágar). Em cada placa de Petri estéril (100 x 20 mm) foi colocado 20 mL de PCA e após a solidificação do meio foram transferidas alíquotas de 100 µL das suspensões por placa e cada amostra foi plaqueada três vezes. O tempo entre o preparo da diluição e o plaqueamento da amostra foi inferior a três minutos. A solução salina também foi plaqueada para

descartar a possibilidade de contaminação da mesma. O inóculo foi espalhado, com auxílio de alça de Drigalski, em toda a superfície do meio e esperou-se até todo excesso de líquido ser absorvido para que as placas secas pudessem ser invertidas e incubadas. A incubação foi feita a 35 ± 1°C e 12 horas de fotofase por 48 horas em câmara climatizada do tipo B.O.D. As colônias foram quantificadas e os resultados expressos em unidades formadoras de colônias por grama de grãos de arroz ($UFC.g^{-1}$).

As bactérias encontradas foram isoladas e amostras das colônias puras foram colocadas em microtubos (Eppendorf) contendo água ultrapura, em seguida foram armazenadas em freezer a -40 °C. Para a extração do DNA genômico dos microorganismos armazenados, centrifugou-se 100 µL de cada amostra. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100µL de InstaGene Matrix (Bio-Rad®) às amostras. Para a extração do DNA foi seguido o protocolo do fabricante. Após a extração foi realizada a amplificação por PCR da região 16S do DNA ribossômico (rDNA). Para amplificar utilizou-se dois iniciadores universais de eubactéria, o 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991).

Para as reações de PCR de 50µL foram adicionados os seguintes ingredientes: 20µL de DNA , 1,5µL de cada iniciador (concentração final 0,3µM), 1µL dNTPs (concentração final de 0,2mM), 0,5µL de Taq polimerase (2,5 unidades) e 5µL de tampão (10mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 1,5µL de $MgCl_2$ (concentração final de 1,5mM) e 19µL de água ultrapura. As condições das reações no termociclador foram: 95 °C por 3 min, 35 ciclos a 95 °C por 1 min, 54 °C por 1 min e 72 °C por 1,5 min, e extensão final a 72 °C por 10 min. Para a confirmação do sucesso da amplificação dos genes pela amplificação por PCR, foi feita a eletroforese em gel de agarose 1% a 100 V (7,5 V/cm) por 45 minutos, juntamente com o marcador molecular Low Range 100pb DNA Ladder (Norgen®). Os produtos de PCR foram purificados usando QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen®), seguindo o protocolo do fabricante. A região do 16S rDNA foi sequenciada usando o iniciador UN518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) da Esalq – Piracicaba, São Paulo. A qualidade das sequências obtidas foi avaliada pelo programa Bioedit e alinhadas pelo programa Clustal W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). Em seguida foi feita uma busca de similaridade no banco de dados do GenBank através do programa BLASTn (ALTSCHUL et al. 1990). Assim,

determinou-se a identidade das sequências das bactérias isoladas do arroz comparado-as com sequências já caracterizadas existentes no banco de dados.

Para quantificar os fungos filamentosos e leveduras foi escolhido o meio de cultura Batata Dextrose Ágar – BDA (Potato Dextrose Agar, Difco™) acrescido de 0,5% do antibiótico Pentabiótico Veterinário Reforçado (Fort Dodge Saúde Animal Ltda®). Em cada placa de Petri estéril (100 x 20 mm) foi colocado 20 mL de BDA e após a solidificação do meio foram transferidas alíquotas de 100 µL das suspensões por placa e cada amostra foi plaqueada três vezes. O tempo entre o preparo da diluição e o plaqueamento da amostra foi de 30 minutos. Alíquotas da solução salina foram plaqueadas para descartar a possibilidade de contaminação da mesma. O inóculo foi espalhado, com auxilio de alça de Drigalski, em toda a superfície do meio e esperou-se até todo excesso de líquido ser absorvido para que as placas secas pudessem ser invertidas e incubadas. A placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D a 26 ± 1°C e 12 horas de fotofase por cinco dias. O número de colônias foi determinado e os resultados expressos em unidades formadoras de colônias por grama de grãos de arroz ($UFC.g^{-1}$). Os fungos foram identificados por avaliação morfológica.

b) Grãos autoclavados

As amostras foram preparadas conforme descrito para a análise de grãos crus, porém as alíquotas de 25 g, retiradas dos sacos contendo grãos de arroz cru, foram adicionadas a frascos de vidro (descritos no item 4.2.1.1) previamente esterilizados. Amostras dos seis diferentes tipos de arroz foram colocadas em três frascos e submetidas à autoclavagem por 30 minutos a 120°C. Após as amostras estarem frias adicionou-se 225 mL de solução salina 0,85% em cada frasco. Em seguida, realizou-se o procedimento conforme descrito para os grãos crus.

4.2.1.5 Análise nutricional do arroz

Amostras dos seis tipos de arroz foram preparadas conforme a rotina descrita no item 4.2.1.1 para produção de *M. anisopliae* até a etapa anterior a inoculação do fungo. De cada tipo de arroz foram retirados 20 g que foram enviados ao Laboratório de Nutrição Humana – LAN 3 no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ-USP, Piracicaba – São Paulo

para realização de análise centesimal. A metodologia seguida foi a descrita em Association of Official Analytical Chemists (1995).

A determinação de minerais (cálcio, potássio e sódio) foi realizada pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas – São Paulo. As determinações dos teores de cálcio, sódio e potássio por espectrometria de absorção atômica foram feitas apenas para amostras do arroz parboilizado e do arroz branco polido irrigado. Segundo o Laboratório executor das análises, a técnica utilizada foi a de espectrometria de absorção atômica e o equipamento foi o AnalytikJena Nova 300, sendo adotado o seguinte procedimento: transferiu-se 100 mg das amostras, com precisão de 0,1 mg, para tubos de abertura em forno microonda. Adicionou-se 3 mL de HNO_3. Em seguida, submeteram-se os tubos em forno microonda com o seguinte programa: potência de inicial de 0 W, com rampa de 20 minutos, potência final de 400 W, com isobárica de 15 minutos, seguido de potencial inicial de 400 W, com rampa de 20 minutos, potência final de 0 W e isobárica de 15 minutos. Transferiu-se as soluções resultantes para balões volumétricos de 25 mL e completou-se o volume com água deionizada. Em seguida, efetuaram-se a determinações das concentrações dos elementos em espectrômetro de absorção atômica contra curvas analíticas construídas com as soluções padrões. As soluções padrões utilizadas foram: solução padrão de sódio 1001 $\mu g.mL^{-1}$, marca Ultra Scientific; solução padrão de cálcio 1000 $\mu g.mL^{-1}$, marca Accu Trace; solução padrão de potássio 1001 $\mu g.mL^{-1}$, marca Ultra Scientific.

4.2.1.6 Análise de resíduos de agrotóxicos no arroz

Quinze amostras de 100 g foram retiradas dos sacos contendo os seis tipos de arroz. Para formação de uma amostra composta estas foram juntadas e homogeneizadas, formando uma amostra de 1,5 kg por tipo de arroz estudado. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e enviadas ao Laboratório de Ensaio AgroSafety Monitoramento Agrícola Ltda, Piracicaba – São Paulo, para a realização das análises de multiresíduos de pesticidas.

Os resíduos dos seguintes compostos foram analisados, com seus respectivos métodos de análise: acefato, aldicarbe, bendiocarb, benfuracarb, carbedazim, eotprofos, fenpiroximat, meotmil, propoxur, tiabendazol, tiodicarbe (método de análise: determinação de multiresíduos em cereais por LC/MS); ditiocarbamatos (mancozebe, manebe e tiram) (método de análise:

determinação de resíduos de ditiocarbamatos em matrizes vegetais por GC/FPD); aletrina, alfacipermetrina, azoxistrobina, betaciflutrina, betacipermetrina, bifentrina, bitertanol, bromuconazol, cadusafos, carbaril, carbofurano, carbosulfano, carboxina, ciflutrina, cipermetrina, ciproconazole, clorotalonil, clorpirifos, cresoxim, deltametrina, diazinona, diclorvos, difeconazol, dimetoato, epoxiconazol, esfenvalerato, etiona, fenamifos, fenitrotiona, fenpropatrina, fentiona, fentoato, fenvalerato, fipronil, fluquinconazol, flutriafol, forato, fosalona, fosmete, gama-cialotrina, hexaconazol, lambda-cialotrina, malationa, metamidofos, metidationa, metiocarbe, mevinfos, miclobutanil, nalede, parationa metilica, permetrina, piraclostrobina, piradafentiona, pirimifos-metilicom, profenofos, propiconazol, protiofos, tebuconazol, terbufos, tetraconazol, triadimefon, triadimenol, triazofos, triciclazole, triclorfom, trifloxistrobina, zeta-cipermetrina (método de análise: determinação de multiresíduos em cereais por CG/MS). O limite de quantificação foi de 0,01 $mg.kg^{-1}$ e o limite de detecção de 0,003 $mg.kg^{-1}$ para todos os compostos analisados.

4.2.1.7 Avaliação de aditivos no sistema de produção de *Metarhizum anisopliae* em arroz

Neste estudo, foram comparados diferentes aditivos (fontes protéicas, subprodutos agrícolas e inibidores de proteinase de soja) incorporados ao arroz parboilizado antes da autoclavagem. Os tratamentos foram os seguintes: (1) arroz parboilizado sem aditivo (testemunha); (2) 5% farelo de soja; (3) 5% de grãos de soja partidos; (4) 5% de extrato de soja; (5) 0,5% de peptona de soja; (6) 0,5% de inibidores de proteinases de soja semi-purificados; (7). 0,05 % de inibidor de proteinase de soja purificado do tipo Kunitz (Sigma-Aldrich™); (8)5% de polpa cítrica; (9) 1% de levedura (*Saccharomyces cerevisae*) usada no sistema de produção de etanol. O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado, composto por nove tratamentos e cinco repetições, cada unidade experimental constou de um frasco de vidro “Schott” (capacidade de 250 mL), descrito anteriormente, contendo 50 gramas de grãos de arroz parboilizado mais os aditivos testados.

O extrato de soja e a soja em grãos, ambos da marca Mãe Terra Produtos Naturais® foram adquiridos em um supermercado na cidade de Piracicaba – SP, o farelo de soja e a levedura foram fornecidos pela Walmon Comercial Ltda, São Paulo – SP. A polpa cítrica foi fornecida pelo Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, Piracicaba – SP. Os inibidores semi purificados

foram extraídos de grãos de soja no Departamento de Genética conforme descrito por Simões (2008). O inibidor purificado do tipo Kunitz e a albumina de soro bovino foram adquiridos da Sigma-Aldrich™.

O farelo de soja, os grãos de soja quebrados, o extrato de soja, a polpa cítrica e a levedura de cana foram pesados em conjunto com o arroz e distribuídos em cinco copos plásticos em porções de 50 g (arroz + aditivo). À estes recipientes adicionou-se 60 mL de água destilada, onde os substratos permaneceram por 50 minutos de molho. Para os demais tratamentos apenas o arroz foi pesado, pois os aditivos (inibidores e peptona de soja) foram inoculados juntamente com a suspensão fúngica. O substrato úmido foi colocado em frascos tipo "Schott", que foram fechados e esterilizados em autoclave a 120°C por 30 minutos. Após o resfriamento os grãos foram inoculados, em câmara de fluxo vertical, com 5 mL de uma suspensão de 1×10^8 conídios.mL^{-1}. Para uma completa distribuição da suspensão os frascos foram agitados manualmente.

Para verificar a viabilidade dos conídios do inóculo inicial da suspensão apenas com conídios, da suspensão de conídios mais inibidor de proteinase de soja purificado do tipo Kunitz (Sigma-Aldrich™); da suspensão de conídios mais inibidores de proteinase de soja semi-purificados e da suspensão de conídios mais peptona de soja procedeu-se conforme descrito no item 4.2.1.2.

As unidades experimentais foram incubadas por quatorze dias em câmara climatizada do tipo B.O.D com temperatura de 26 ± 1°C e doze horas de fotofase. Após este período, foi adicionado, 150 mL de água destilada estéril mais 0,05% de espalhante adesivo (Tween 80®) a cada frasco contendo arroz mais aditivos e conídios. Para remover os conídios do substrato, os recipientes foram agitados manualmente por cinco minutos e em seguida colocados em uma mesa agitadora orbital (modelo: MA 140 CFT, Marconi) programada para 300 rotações por minuto, onde permaneceram por 30 minutos. Após três diluições a partir da suspensão original, foi feita a contagem de conídios em câmara de Neubauer. Determinando, assim, a quantidade de conídios produzidos por grama de substrato.

4.2.1.8 Virulência de *Metarhizum anisopliae* produzido em arroz com aditivos

Os conídios foram produzidos em arroz parboilizado mais aditivos, conforme descrito acima, sendo retirados do substrato por lavagem com água destilada estéril com 0,05% de

espalhante adesivo Tween 80®. O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado, composto por dez tratamentos e seis repetições. Os tratamentos foram os mesmos do item 4.2.1.7. mais o tratamento testemunha (pulverizado apenas com água destilada mais 0,05% do espalhante adesivo). Para verificar a interferência da polpa cítrica na virulência do fungo foi realizado um teste adicional, onde, além da suspensão originada da lavagem do substrato (arroz parboilizado ou arroz parboilizado mais polpa cítrica) realizou a extração seca dos conídios, os quais foram utilizados na suspensão para pulverizar os insetos. Para a extração seca dos conídios, após a esporulação do fungo, o substrato foi colocado em um cano plástico, cuja extremidade continha uma peneira fina e várias camadas de um pano fino tipo Voal. Uma das extremidades do recipiente foi colocado um saco plástico para coletar os conídios. O recipiente foi tampado e agitado manualmente para a extração dos conídios.

Cada tratamento foi composto por seis repetições contendo em cada, 10 lagartas de terceiro ínstar de *D. saccharalis*. As suspensões na concentração de 5×10^8 conídios.mL^{-1} foram pulverizadas sobre lagartas de *D. saccharalis* em torre de Potter como descrito no item 4.2.1.7.

A viabilidade das suspensões fúngicas foi verificada conforme descrito anteriormente. Observações diárias foram efetuadas para determinação da mortalidade. Os insetos mortos foram coletados, colocados em câmara úmida e mantidos à temperatura de 26 ± 1°C e doze horas de fotofase.

4.2.1.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SAS® 9.1.3 (SAS, Institute Inc., 2003). As porcentagens de mortalidade referentes aos testes de virulência do fungo *M. anisopliae* produzido em diferentes tipos de arroz e aditivos foram transformados em $\sqrt{x}$ e posteriormente submetidos à análise de variância e ao teste F ($P<0,05$). Os dados de mortalidade provocada pelos conídios produzidos em arroz com ou sem a presença da polpa cítrica, e extraídos de formas diferentes, foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste LSD ($P<0,05$). A eficiência dos tratamentos acima foi estimada pela fórmula de Schneider-Orelli (1947). Para o cálculo da TL_{50}, os valores das mortalidades acumuladas foram submetidos à análise de Probit (FINNEY, 1971), com o auxílio do programa computacional Polo Plus. Os dados referentes à produção do fungo em arroz mais aditivos foram submetidos à análise de variância e a média do tratamento padrão (arroz parboilizado sem aditivos) foi comparada aos

demais tratamentos empregando o teste de Dunnett (P<0,05). Os demais dados foram submetidos à análise de variância e posteriormente as médias foram testadas pelo teste LSD (P<0,05).

4.2.2 Resultados

4.2.2.1 Produção de conídios do fungo *Metarhizum anisopliae* em diferentes tipos de arroz

Em um grama de arroz parboilizado foi produzido 4,38 x 10^9 conídios de *M. anisopliae*, a maior produção entre os tipos testados (Tabela 4.1). O arroz tipo canjicão resultou na segunda maior produção com 3,42 x 10^9 conídios.g^{-1}. Quantidades intermediárias de conídios foram produzidas pelos arrozes do tipo branco polido irrigado, de terras altas e orgânico. O integral foi o tipo de arroz que produziu a menor quantidade, resultando em 1,53 x 10^9 conídios.g^{-1} ($F_{5;54}$= 39,59; P<0,0001).

Tabela 4.1 – Produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos de arroz

Tipo de arroz	**Produção de conídios por grama de arroz (x10^9)[1]**
Parboilizado	4,38 ± 0,18 a
Canjicão	3,42 ± 0,15 b
Branco Polido Irrigado	2,68 ± 0,18 c
Branco Polido de Terras Altas	2,53 ± 0,15 c
Branco Polido Orgânico	2,50 ± 0,15 c
Integral	1,53 ± 0,09 d
C.V.	17,06

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de LSD (P < 0,05).
[1]Média de dois experimentos, repetidos no tempo.

A quantidade de conídios resultante do arroz polido proveniente do sistema irrigado foi semelhante a do arroz polido, cujo sistema de produção foi o de terras altas. Desta forma, o sistema de produção de arroz, seja irrigado ou de terras altas não influenciou a qualidade da matéria prima para a produção do fungo entomopatogênico.

O preço médio dos tipos de arroz testados para a produção de *M. anisopliae* é apresentado na tabela 4.2. O arroz orgânico é o mais caro, enquanto que o canjicão é o mais barato.

Tabela 4.2 - Preço médio em reais do arroz no Estado de São Paulo no mês de setembro de 2009

Tipo de Arroz	**Preço médio por kg (R$)**	
	Atacado	**Varejo**
Branco Polido tipo 1	1,15	1,96
Parboilizado tipo 1	1,38	2,14
Integral tipo 1	2,00	...
Branco Polido Orgânico tipo 1	...	6,02
Canjicão (quebrado)	0,45	0,96

Fonte: Planeta Arroz (www.planetaarroz.com.br/) - preço no atacado,
Arroz Brasileiro (www.arroz.agr.br) - preço no varejo.

Nota: Sinal convencional utilizado:
... dado numérico não disponível.

4.2.2.2 Viabilidade de conídios de *Metarhizum anisopliae* produzidos em diferentes tipos de arroz

Os conídios produzidos no arroz tipo canjicão apresentaram porcentagem de germinação menor que a dos demais tratamentos ($F_{5;66}$= 10,27; P<0,0001), porém a viabilidade neste e em todos os outros tipos de arroz foi muito alta (> 99%) (Tabela 4.3). Desta forma, o tipo de arroz não influenciou a capacidade de germinação dos conídios de *M. anisopliae*, visto que valores superiores a 90% são considerados ótimos para índices de viabilidade.

Tabela 4.3 – Avaliação da germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* produzidos em diferentes tipos de arroz

Tipo de Arroz	Germinação dos conídios (%)
Parboilizado	99,92 ± 0,08 a
Canjicão	99,77 ± 0,11 a
Branco Polido Irrigado	99,96 ± 0,04 a
Branco Polido de Terras Altas	99,85 ± 0,06 a
Branco Polido Orgânico	98,88 ± 0,06 a
Integral	99,18 ± 0,15 b
C.V.	0,32

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de LSD ($P < 0,05$).

4.2.2.3 Virulência de *Metarhizum anisopliae* produzido em diferentes tipos de arroz

A eficiência dos conídios de *M. anisopliae* produzidos em arroz sobre *D. saccharalis* variou de 71,2 ± 8,1% em arroz branco polido orgânico a 83,1 ± 5,7% em branco polido irrigado, porém não houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 4.4). A eficiência dos conídios provenientes dos arrozes integral e parboilizado ficou próxima a 74%. Desta forma, o tipo de arroz utilizado como substrato de produção do entomopatógeno não influenciou significativamente a eficiência dos conídios sobre *D. saccharalis* ($F_{6;35}$= 0,81; P=0,55).

A virulência dos conídios de *M. anisopliae* produzidos nos diferentes tipos de arroz foi medida pelo tempo letal mediano (TL_{50}) em lagartas de *D. saccharalis.* Os conídios provenientes de arroz polido de terras altas apresentaram TL_{50} de 4,44 dias, o menor valor entre os tratamentos, enquanto que os conídios produzidos em arroz canjicão levaram o maior tempo, 6,96 dias para matar 50% dos insetos tratados. Com exceção do maior e menor valor, em todos os outros tratamentos ocorreu a sobreposição dos intervalos de confiança, mostrando não haver diferenças significativas entre estes.

Tabela 4.4 – Eficiência de conídios, tempos letais medianos (TL_{50}) em dias, intervalo de confiança (IC) (P>0,05), equações de regressão linear e valores de x^2 obtidos pela análise de Probit, para os diferentes tipos de arroz utilizados para a produção de *Metarhizium anisopliae*

Tipo de Arroz	**% de Eficiência[1] ns**	**TL_{50}**	**IC**	**Equação**	**x^2**
Parboilizado	74,5 ± 3,5	6,81	(5,56; 8,25)	Y=2,44+3,07x	2,05 ns
Canjicão	72,9 ± 6,9	6,96	(5,69; 8,47)	Y=2,41+3,07x	5,24 ns
Branco Polido Irrigado	83,1 ± 5,7	5,6	(4,50; 6,64)	Y= 2,46+3,40x	5,09 ns
Branco Polido de Terras Altas	83,1 ± 4,3	4,44	(3,51; 5,26)	Y=2,52+3,84x	8,17 ns
Branco Polido Orgânico	71,2 ± 8,1	6,4	(5,11; 7,85)	Y=2,74+2,81x	5,49 ns
Integral	74,6 ± 6,3	5,37	(4,23; 6,48)	Y=32,79+3,03x	4,1 ns

[1]A eficiência foi estimada pela fórmula de Schneider-Orelli (1947); ns não significativo pelo teste F (P=0,05); C.V.=9,6.
ns x^2 não significativo (P<0,05).
gl= 11, número de insetos por tratamento = 60.

4.2.2.4 Análise microbiológica em grãos de arroz: Contagem padrão de bactérias aeróbicas mesófilas, fungos filamentosos e leveduras

Na análise com grãos de arroz crus, o maior número de unidades formadoras de colônias de bactérias foi apresentado pelo arroz integral (Tabela 4.5 e 4.6), enquanto que o maior número de fungos mais leveduras foi apresentado pelo arroz tipo canjicão (Tabela 4.7). O arroz orgânico foi o tipo que apresentou menor quantidade de microorganismos. A maior diversidade de microorganismos foi encontrada no arroz tipo integral, não sendo possível identificar apenas dois morfotipos de bactérias presentes no arroz branco polido.

Tabela 4.5 – Quantificação de bactérias em diferentes tipos de grãos de arroz utilizados na produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*

Tipo de arroz	**Bactérias (x10^3) UFC.g^{-1}**	**Diversidade de Bactérias**
Integral	11,8	*Pantoea ananatis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Pantoea eucalypti*, *Methylobacterium* sp., *Bacillus sporothermodurans*
Canjicão	5,44	*Pantoea ananatis*, *Virgibacillus* sp., *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Pantoea eucalypti*, *Bacillus aerophilus*, *Bacillus sporothermodurans*, *Paenibacillus cookii*, *Escherichia coli*, *Bacillus aquimaris*
Branco Polido de Terras Altas	2,52	*Pantoea ananatis*, *Bacillus pumilus*, *Pantoea eucalypti*
Branco Polido Irrigado	1,12	*Pantoea ananatis*, *Bacillus pumilus*, *Pantoea eucalypti*, *Methylobacterium* sp., *Bacillus sporothermodurans*, *Bacillus* sp.
Parboilizado	1,03	*Pantoea ananatis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Pantoea eucalypti*
Branco Polido Orgânico	0,32	*Pantoea ananatis*, *Virgibacillus* sp., *Methylobacterium* sp., *Acinetobacter calcoaceticus*

Tabela 4.6 – Identificação dos morfotipos de bactérias encontradas em grãos de arroz cru pela sequência parcial da região 16S rDNA obtida com o Blastn

Morfotipo	**Identificação[1]**	**E-Value[2]**	**GenBank[3]**	**Identidade[4]**
1	*Pantoea ananatis*	1e-57	EF178449	124/124
2	*Virgibacillus* sp.	3e-60	EU135675	137/140
3	*Bacillus pumilus*	4e-69	GQ281050	148/149
4	*Bacillus cereus*	8e-50	FJ608120	118/121
5	*Pantoea eucalypti*	4e-58	EF688009	126/127
6	*Bacillus aerophilus*	9e-55	AJ831844	124/126
7	*Acinetobacter calcoaceticus*	4e-58	GQ178061	132/135
8	*Bacillus sporothermodurans*	2e-46	FJ188308	112/115
9	*Paenibacillus cookii*	1e-57	DQ153950	124/124
10	*Bacillus aerophilus*	2e-51	AJ831844	123/127
11	*Bacillus pumilus*	2e-55	FJ481961	120/120
12	*Bacillus aquimaris*	4e-58	FJ188294	125/125
13	*Klebsiella* sp.	3e-48	FJ828890	107/107
14	*Bacillus* sp.	2e-41	EF428971	107/112
17	*Methylobacterium* sp.	1e-63	FJ919619	138/139

[1] Identificação: organismo que possui a sequência com a qual a sequência parcial do gene 16S rDNA da estirpe estudada apresentou maior homologia. [2] E-Value: estatísca de similaridade. [3]GenBank: número de acesso da sequência do organismo relacionado. [4] Identidade: identidade entre a sequência das estirpes estudadas e o organismo relacionado.

Na análise com grãos autoclavados foi possível observar o crescimento da bactéria morfotipo 1 (*Pantoea ananatis*) em amostras dos arrozes tipo canjicão e integral, porém a identificação foi realizada apenas com aspectos morfológicos. Fungos e leveduras não foram observados nas amostras após a autoclavagem.

Tabela 4.7 – Quantificação de fungos e leveduras e diversidade de fungos em diferentes tipos de grãos de arroz utilizados para produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*

Tipo de arroz	**Fungos e Leveduras ($x10^2$) $UFC.g^{-1}$**	**Gêneros dos Fungos encontrados[1]**
Integral	3,22	*Aspergillus; Penicillium; Fusarium; Cladosporium; Rhizopus*
Canjicão	15,56	*Aspergillus; Penicillium; Cladosporium; Rhizopus*
Branco Polido de Terras Altas	0,44	*Aspergillus e Rhizopus*
Branco Polido Irrigado	0,89	*Aspergillus e Cladosporium*
Parboilizado	3,11	*Aspergillus e Rhizopus*
Branco Polido Orgânico	-	-

Nota: Sinal convencional utilizado:
- Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

4.2.2.5 Análise nutricional do arroz

O arroz integral tem maior quantidade de extrato etéreo, matéria mineral (Tabela 4.8) e apesar de não ter sido analisado, dados de literatura mostram que este tipo de arroz apresenta uma quantidade maior de fibras totais, em média 11% na matéria seca (STORCK; SILVA; COMARELLA, 2005). Em uma estimativa, a quantidade superior de fibras totais do arroz integral resulta em menor quantidade de carboidrato por unidade de peso em relação aos demais tipos de arroz.

Tabela 4.8 – Porcentagens de umidade, extrato etéreo, proteína bruta e matéria mineral em grãos cozidos de diferentes tipos de arroz utilizados como substrato para produção de *Metarhizium anisopliae*

Arroz	**Umidade (%)**	**Extrato Etéreo[2] (%)**	**Proteína Bruta[2] (%)**	**Matéria Mineral[2] (%)**
Parboilizado	41,33 ± 0,18 a	0,93 ± 0,02 b	8,92 ± 0,11 c	0,41 ± 0,01 b
Canjicão	31,76 ± 0,7 b	0,49 ± 0,01 c	9,00 ± 0,06 c	0,20 ± 0,01 c
Polido (Irrigado)	30,37 ± 0,07 c	0,34 ± 0,01 e	7,42 ± 0,05 d	0,21 ± 0,01 c
Polido (Terras Altas)	29,37 ± 0,13 d	0,41 ± 0,01 d	9,93 ± 0,03 a	0,18 ± 0,01 c
Polido Orgânico	29,03 ± 0,03 d	0,33 ± 0,01 e	9,63 ± 0,03 b	0,17 ± 0,01 c
Integral	22,20 ± 0,17 e	1,29 ± 0,01 a	9,68 ± 0,13 ab	1,11 ± 0,04 a
C.V.	0,69	3,23	1,54	8,54
F	2858	1093,13	127,17	389,22
P<	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

[1] Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de LSD ($P < 0,05$).
[2] % na matéria seca ($g.100g^{-1}$).

Em termos nutricionais, o integral parece ser o mais rico, porém apresentou a menor produção de conídios do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* (Tabela 4.1). O teor de umidade do arroz parece estar positivamente correlacionado com a produção de conídios. O arroz parboilizado apresentou o maior teor de umidade, 41,3 ± 0,2% e foi responsável pela maior produção de conídios. Os arrozes do tipo polido irrigado, de terras altas e orgânico apresentaram valores intermediários de umidade e produção de conídios. A menor umidade (22,2 ± 0,2 %) e a menor produção de conídios foram observadas no arroz integral.

A análise dos minerais (cálcio, potássio e sódio) foi realizada apenas para os arrozes parboilizado e branco polido irrigado por se tratar de uma análise dispendiosa e por estes arrozes contrastarem no tipo de beneficiamento. Dentre os minerais analisados a única diferença significativa observada foi o maior teor de potássio no arroz parboilizado ($F_{1;4=}$ 166,5; P=0,0002). Este arroz apresentou 702,8 $mg.kg^{-1}$ de potássio, ou seja, praticamente o dobro do valor identificado para o arroz polido de sistema irrigado (Tabela 4.9). Os valores de cálcio e sódio encontrados no parboilizado também foram superiores quando comparados ao arroz polido, porém as diferenças não foram significativas (cálcio: $F_{1;4}$= 2,81; P = 0,169 e sódio: $F_{1;4}$= 4,45; P=0,1027).

Tabela 4.9 – Composição mineral em grãos de arroz parboilizado e arroz branco polido utilizados como substrato para produção de *Metarhizium anisopliae*

Arroz	**Macronutrientes ($mg.kg^{-1}$)**		
	Sódio^{ns}	**Potássio**	**Cálcio^{ns}**
Parboilizado	36,57 ± 3,01 a	702,80 ± 23,18 a	111,47 ± 7,87 a
Polido Irrigado	28,25 ± 2,55 a	359, 39 ± 13,07 b	95, 74 ± 5,12 a
C.V.	14,91	6,14	11,1

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de LSD (P < 0,05).

4.2.2.6 Análise de resíduos de agrotóxicos no arroz

Não foi detectado nenhum resíduo de pesticida nos diferentes tipos de arroz, com limite de quantificação de 0,01 $mg.kg^{-1}$ e limite de detecção de 0,003 $mg.kg^{-1}$.

4.2.2.7 Avaliação de aditivos no sistema de produção e virulência de *Metarhizum anisopliae* em arroz

Baseado no resultado dos testes de produção de conídios (Tabela 4.1) o arroz parboilizado foi selecionado como o substrato a ser usado nos experimentos do uso de aditivos objetivando obter melhorias no sistema de produção de *M. anisopliae*. Entretanto, nenhum dos aditivos testados proporcionou incrementos na produção de conídios em comparação com o arroz parboilizado sem aditivos (Tabela 4.10). A produção de conídios variou de 3,07 x 10^9 no arroz parboilizado mais extrato de soja a 4,86 x 10^9 no arroz parboilizado + inibidor purificado Kunitz. Os inibidores de proteinase de soja semi-purificados ou purificado do tipo Kunitz quando adicionados ao meio de esporulação incrementaram expressivamente a produção de conídios (Tabela 3.1), porém o mesmo efeito não foi verificado quando estes inibidores foram adicionados ao arroz. A adição de 5% de polpa cítrica ou 5% de extrato de soja ao arroz parboilizado reduziu a produção de conídios ($F_{8;36}$=5,13; P=0,0003). A viabilidade dos conídios não foi influenciada pelo tipo de aditivo usado, pois todos os tratamentos produziram conídios com porcentagem de germinação superior a 99% ($F_{8;18}$=0,33; P= 0,94).

A mortalidade causada em *D. saccharalis* pelos conídios de *M. anisopliae*, não foi influenciada significativamente pelos aditivos contidos no substrato de produção do fungo ($F_{8;45}$ = 0,86; P = 0,55). Apesar disso o menor valor numérico de mortalidade, 75% foi causado pelos conídios cultivados em arroz mais polpa cítrica. Para verificar se compostos presentes na polpa cítrica poderiam reduzir a germinação dos conídios e consequentemente a mortalidade provocada pelo fungo nas lagartas, foi realizado um teste adicional, onde, além da suspensão proveniente da lavagem do substrato (arroz parboilizado ou arroz parboilizado mais polpa cítrica) realizou-se também a extração seca dos conídios, os quais foram utilizados na suspensão para pulverizar os insetos. Os tempos letais medianos (TL_{50}), resultantes da aplicação em *D. saccharalis*, dos conídios produzidos em arroz com aditivos podem ser observados nas tabelas 4.11.

Tabela 4.10 – Produção, viabilidade e virulência de conídios produzidos em arroz parboilizado com diferentes tipos de aditivos

Tratamento	**Produção de conídios ± EPM ($x10^9$)**	**Viabilidade dos conídios ± EPM (%)^{ns}**	**Mortalidade confirmada ± EPM (%)^{ns}**
Arroz parboilizado + 0,05% de Inibidor purificado Kunitz	4,86 ± 0,41	99,5 ± 0,3	85 ± 6,2
Arroz parboilizado + 1% de Levedura	4,6 ± 0,20	99,7 ± 0,2	85 ± 2,2
Arroz parboilizado + 5% de Soja quebrada	4,04 ± 0,06	99,7 ± 0,2	88,3 ± 6,0
Arroz parboilizado + 0,5% de Peptona de Soja	3,94 ± 0,14	99,7 ± 0,2	86,7 ± 3,3
Arroz parboilizado + 5% de Farelo de Soja	3,83 ± 0,24	99,7 ± 0,2	81,3 ± 6,0
Arroz parboilizado + 0,5% de Inibidores semi-purificados	3,85 ± 0,21	99,7 ± 0,2	80 ± 7,3
Arroz parboilizado + 5% de Polpa Cítrica	3,7 ± 0,16*	99,8 ± 0,2	75 ± 5,0
Arroz parboilizado + 5% de Extrato de Soja	3,07 ± 0,37*	99,4 ± 0,1	83,3 ± 4,2
Tratamento padrão (Arroz parboilizado)	4,73 ± 0,27	99,5 ± 0,5	90 ± 5,2
C.V.	13,83	0,43	15,44

* significativo e inferior ao tratamento padrão (arroz parboilizado), pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).
^{ns} não significativo pelo teste F (P=0,05).

Tabela 4.11 – Tempos letais medianos (TL_{50}) em dias, intervalo de confiança (IC) (P>0,05), equações de regressão linear e valores de x^2 obtidos pela análise de Probit, para os diferentes aditivos incorporados ao arroz parboilizado para a produção de *Metarhizium anisopliae*

Substrato	**TL_{50} (dias)**	**IC**	**Equação**	**x^2**
Arroz Parboilizado	2,46	(1,57; 3,23)	Y=3,95+2,68x	5,09 ^{ns}
Arroz Parboilizado + Farelo de Soja	3,5	(2,27; 4,61)	Y=3,83+2,16x	2,79 ^{ns}
Arroz Parboilizado + Soja Quebrada	2,38	(1,50; 3,14)	Y=4,00+2,67x	5,94 ^{ns}
Arroz Parboilizado + Extrato de Soja	2,81	(1,59; 3,84)	Y=4,09+2,02x	5,28 ^{ns}
Arroz Parboilizado + Inibidores Semi Purificados	2,81	(1,59; 3,67)	Y=4,09+2,02x	5,28 ^{ns}
Arroz Parboilizado + Inibidor Purificado Kunitz	3,09	(2,06; 3,99)	Y=3,76+2,53x	3,27 ^{ns}
Arroz Parboilizado + Polpa Cítrica	3	(1,39; 4,34)	Y=4,25+1,58x	6,85 ^{ns}
Arroz Parboilizado + Peptona de Soja	3,57	(1,93; 3,87)	Y=3,84+2,45x	3,56 ^{ns}
Arroz Parboilizado + Levedura	2,24	(1,33; 3,00)	Y=4,11+2,54x	6,05 ^{ns}

^{ns} x^2 não significativo (P<0,05), gl= 9, número de insetos por tratamento = 60.

A exposição de lagartas de 3º ínstar ao fungo *M. anisopliae* resultou em um tempo letal mediano (TL_{50}) entre 3,6 dias (arroz parboilizado + peptona de soja) e 2,2 dias (arroz parboilizado + levedura). Os aditivos testados para produção do entomopatógeno não alteraram o tempo gasto pelo fungo para causar a mortalidade de 50% dos insetos tratados, isso pode ser verificado com a sobreposição dos intervalos de confiança dos tratamentos.

A mortalidade provocada pelos conídios extraídos por lavagem do arroz mais polpa cítrica (71,7%) foi menor que a mortalidade provocada pelos conídios extraídos por lavagem apenas do arroz (95,0%) (Tabela 4.12). O mesmo foi observado para a mortalidade dos tratamentos de conídios extraídos por peneiramento ($F_{3;20}$=4,46; P=0,015).

Tabela 4.12 – Mortalidade confirmada, tempos letais medianos (TL_{50}) em dias, intervalo de confiança (IC) (P>0,05), equações de regressão linear e valores de x^2 obtidos pela análise de Probit, para diferentes substratos e formas de extração de conídios de *Metarhizium anisopliae*

Substrato de Produção	**Forma de Extração**	**Mortalidade confirmada (%)**	**TL_{50} (dias)**	**IC**	**Equação**	**x^2**
Arroz	Lavagem	95,0 ± 3,4 a	3,06	(2,61; 3,50)	Y=0,41+9,45x	2,41 ^{ns}
Arroz	Peneiramento	88,3 ± 6,0 ab	2,93	(2,00; 3,75)	Y=3,74+2,73x	6,28 ^{ns}
Arroz + Polpa Cítrica	Lavagem	71,7 ± 4,8 c	5,9	(4,63; 7,23)	Y=2,87+2,76x	5,9 ^{ns}
Arroz + Polpa Cítrica	Peneiramento	75,0 ± 6,2 bc	4,64	(3,52; 5,70)	Y=3,14+2,79x	4,99 ^{ns}

[1] Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de LSD (P < 0,05). C.V. = 15,49.
^{ns} x^2 não significativo (P<0,05),
gl= 11, número de insetos por tratamento = 60.

Observou-se que o TL_{50} do tratamento com conídios extraídos por lavagem do arroz com polpa cítrica (5,9 dias, 4,6 - 7,2 dias) foi mais longo do que no tratamento sem a presença de polpa (3,1 dias, 2,6 - 3,5 dias). Isto demonstra que a polpa cítrica gerou a produção de conídios menos virulentos com uma menor velocidade do fungo para causar a morte dos insetos.

4.2.3 Discussão

O fungo entomopatogênico *M. anisopliae* começou a ser produzido no Nordeste do Brasil em larga escala em 1969, até hoje a produção se dá quase que exclusivamente sobre o arroz, tecnologia antiga, importada de Trinidad & Tobago (ALVES et al., 2008). Desde então muitos trabalhos tem sido conduzidos com a finalidade de encontrar novos meios de cultura que proporcionem um bom rendimento de conídios de *M. anisopliae*. O presente estudo objetivou determinar dentre as opções de arrozes existentes no mercado o que melhor se adaptasse ao cultivo do entomopatógeno. O arroz parboilizado foi responsável pela maior produção de conídios, seguido pelo arroz tipo canjicão e pelos tipos brancos polidos. O arroz integral resultou na menor produção de conídios. Estes resultados discordam do trabalho de Ottati-de-Lima (2007) que não observou diferença significativa na produção de conídios do fungo em arroz parboilizado, arroz branco polido e arroz quebrado (canjiquinha).

Camargo (1983) testou os substratos arroz polido, dois tipos de milho (*Zea mays* L.) moído, e soja (*Glycine max* (L.) Merrill) quebrada na produção de conídios, e os resultados mostraram que no arroz polido foi onde houve maior produção de conídios, seguido pelo milho moído e por último pela soja quebrada. Com o objetivo de baratear os custos de produção Vilas Boas, Andrade e Oliveira (1996) utilizaram quatro substratos facilmente encontrados em larga escala em Pernambuco, como caupi (*Vigna unguiculata* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), fava (*Phaseolus lunatus* L.) e sorgo (*Sorgum bicolor* L.) para a produção de *M. anisopliae*. Os autores observaram diferenças significativas e superiores quando o entomopatógeno cresceu em fava e caupi em comparação ao arroz, já no sorgo e feijão a diferença foi significativa e inferior aos demais tratamentos. Dorta et al. (1990) observaram um acréscimo de cinco a quinze vezes, dependendo do isolado, quando se adicionou 50% de casca de arroz aos grãos de arroz. Com estes exemplos observa-se que alguns substratos podem ser superiores ao arroz no quesito produção, porém nem um deles foi adotado no sistema de produção, pois trocar o arroz por um substrato

diferente implica na adequação de todo um sistema e isso gera um custo que pode não ser compensatório.

Em uma segunda etapa, procurou-se determinar quais os fatores inerentes aos tipos de arroz eram os responsáveis pelas diferenças na produção de conídios. A hipótese inicial era de que fatores nutricionais, presença de resíduos de agrotóxicos e contaminação por microorganismos nos grãos poderiam interferir na qualidade da matéria prima para a produção do fungo. Estes fatores podem ser influenciados ainda, por exemplo, pelo tipo de beneficiamento, pelo sistema de cultivo e manejo.

Existem três tipos principais de sistemas de produção de arroz no Brasil: várzeas, irrigado por inundação e terras altas. Porém, a produção de conídios nos arrozes brancos polidos, seja de sistema irrigado, terras altas ou orgânico foi semelhante, o que indica que o sistema de cultivo do arroz não tenha influência no processo de produção de *M. anisopliae.*

A aplicação de agrotóxicos é maior no cultivo irrigado do que no de terras altas. Em ambos os sistemas de produção a maioria dos agrotóxicos utilizados são herbicidas, seguidos de fungicidas e inseticidas (BARRIGOSSI; LANNA, 2004). Sabe-se que vários pesticidas registrados para a cultura do arroz são incompatíveis com *M. anisopliae* (LI; HOLDOM, 1994; MOHAMED; PRATT; NELSON, 1987; RACHAPPA; LINGAPPA; PATIL, 2007), a presença deste tipo de substância poderia prejudicar o crescimento e esporulação do fungo. Alguns produtores de *M. anisopliae* têm associado a perda de grandes lotes de fungos devido à qualidade do arroz, sendo os resíduos de pesticidas uma das hipóteses atribuída. Entretanto, não foi detectada a presença de nenhum resíduo de agrotóxicos nos grãos de arroz sem casca utilizados no experimento. É possível que os resíduos de agrotóxicos se limitem aos grãos de arroz com casca, porém esta não é a forma que o arroz é utilizado no sistema de produção de fungos. Porém, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos coordenado pela Anvisa, analisou 136 amostras de arroz, sendo que 4,41% (6 amostras) foram consideradas insatisfatórias, apresentando resíduos de ingredientes ativos (metamidofós, flutriafol, ciproconazol e miclobutanil) não autorizados para a cultura. A coleta das amostras foi feita em supermercados, ou seja, amostrou-se o arroz sem casca (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2009).

O arroz é constituído principalmente por amido, apresentando quantidades menores de proteínas, lipídios, fibras e minerais. A proporção destes nutrientes no grão pode variar em função

da variedade, variações ambientais, tipo de cultivo, de processamento e de armazenamento (ZHOU et al., 2002). Dentre os tipos de arroz estudados foi possível observar que o teor de matéria mineral foi mais elevado no arroz integral do que no parboilizado e maiores neste do que no branco, corroborando com os dados da literatura (COFFMAN; JULIANO, 1987; PARK; KIM; KIM, 2001). O teor de potássio no arroz parboilizado foi o dobro do encontrado no arroz branco polido. A maior quantidade de conteúdo mineral está relacionada à migração de minerais das camadas externas para o endosperma durante o processo de parboilização (JULIANO, 1993; HEINEMANN et al., 2005). O maior conteúdo de matéria mineral no arroz integral deve-se ao fato de que no beneficiamento deste arroz, apenas a casca é retirada do grão; já no caso dos arrozes que passam por polimento, todas as camadas externas (pericarpo, tegumento, camada de aleurona e embrião) são retiradas (WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008). No entanto, isso não significa maior disponibilidade de minerais no arroz integral (JULIANO, 1993) o que pode ter contribuído para o rendimento insatisfatório de conídios neste arroz. O magnésio, cálcio, ferro, cobre, manganês, zinco e o molibdênio normalmente são necessárias em pequenas quantidades para o crescimento dos fungos, enquanto que outros elementos como o sódio e principalmente o potássio, são essenciais para o desenvolvimento. O potássio, por exemplo, é fundamental para a manutenção adequada das funções bioquímicas, através de seu efeito sobre a estabilidade das macromoléculas (JENNINGS, 1995), devendo ser destacado aqui que o arroz parboilizado, o melhor arroz para a produção de conídios, apresentou o dobro de potássio que o polido.

O conteúdo de proteínas totais no arroz é relativamente baixo em comparação com os outros cereais, em média 7%, porém existe uma diversidade de proteína (albumina, globulina, prolamina e glutelina), e entre os cereais, o arroz é o que apresenta a melhor e mais completa combinação de aminoácidos (WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008). Dentre os arrozes testados o teor de proteína parece não estar relacionado à produção de conídios. O efeito da fonte de nitrogênio sobre *M. anisopliae* é complexo e variável. Li e Holdon (1995) estudaram a resposta de crescimento e esporulação de *M. anisopliae* cultivado em diferentes meios com fonte definida de nitrogênio. Os autores observaram que algumas fontes de nitrogênio favoreceram o crescimento e desfavoreceram a esporulação e vice-versa, além disso, tanto o crescimento vegetativo quando a esporulação foi bem menor quando se utilizou como fonte de nitrogênio apenas um tipo de aminoácido em comparação com uma fonte complexa de nitrogênio (peptona de soja), em quantidade equivalente. Aminoácidos distintos podem estimular diferentes fases de

crescimento ou esporulação do fungo, de modo que, uma fonte de nitrogênio complexa como a fornecida pelos grãos de arroz pode otimizar estes processos, favorecendo crescimento e produção de conídios (LI; HOLDOM, 1995).

Os carboidratos são os principais constituintes do arroz. Além do amido, que corresponde a aproximadamente 90% da matéria seca do arroz polido, também estão presentes açúcares livres e fibra (WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008). O amido é um polissacarídeo composto por cadeias de amilose e amilopectina, já os principais açúcares livres no arroz são a sacarose (aproximadamente 90%), a glicose e a frutose e estão presentes principalmente nas camadas externas do grão sendo sua concentração diminuída pelo polimento (TRAN et al., 2004). O beneficiamento influencia o percentual de amido, sendo este maior no arroz branco polido e no parboilizado comparado ao integral (STORCK; SILVA; COMARELLA, 2005).

Durante o crescimento e esporulação de *M. anisopliae* em arroz, enzimas extracelulares são produzidas, para degradar e assimilar os principais componentes do substrato (DORTA; ERTOLA; ARCAS, 1996). A hidrólise do amido origina uma grande quantidade de monossacarídeos, por exemplo, maltose e glicose. Normalmente a glicose é um dos principais açúcares utilizado pela maioria dos fungos (JENNINGS, 1995), sendo uma importante fonte de carbono e energia para o desenvolvimento. Bharati et al. (2007) observaram que entre várias fontes de carbono estudadas, o amido foi o que promoveu o maior crescimento do entomopatógeno, seguido da sacarose e frutose.

O fungo normalmente inicia o processo de conidiogênese após consumir e esgotar o nitrogênio do meio, mas ainda com disponibilidade de carboidratos. Diversos autores ressaltam que meios ricos nutricionalmente (com baixa relação carbono/nitrogênio) não estimulam a esporulação, e consequentemente substratos pobres (com alta relação carbono/nitrogênio) induzem a conidiogênese resultando em maior produção de conídios pelo fungo (AQUINO, 1974; CAMPBELL et al. 1983; FRIGO; AZEVEDO, 1986; LI; HOLDOM, 1995; KAMP; BIDOCHKA, 2002). Porém, se o meio for muito limitante não irá ocorrer um crescimento micelial satisfatório (KAMP; BIDOCHKA, 2002; RANGEL; ALSTON; ROBERTS, 2008). Assim, é necessário que seja oferecido ao fungo um meio que propicie um bom desenvolvimento vegetativo, mas que ao mesmo tempo induza a esporulação. Shah, Wang e Butt (2005) testaram meios de cultura com relações variáveis de C:N: alta (75:1), intermediária (35:1) e baixa (10:1) e observaram que a maior quantidade de conídios foi produzida no meio com relação C:N de 35:1, estes resultados

corroboram com as observações de Ibrahim, Butt e Jenkinson, (2002) que também observaram melhor desenvolvimento do fungo no meio DAS (Saubouraud Dextrose Agar) com relação C:N de 35:1. Em contraste, Hutwimmer et al. (2008) utilizando meios sintéticos com relação C:N de 10:1 obtiveram maior rendimento de conídios neste meio em comparação com o meio SDA. O efeito benéfico sobre a produção de conídios em meios com relação C:N de 10:1, em cultivo submerso, foi demonstrado anteriormente para outros isolados de *M. anisopliae* por Vega et al. 2003. Contudo, Gao et al. (2007) reportam que essa relação não é a regra para todos os isolados, pois, testaram relações C:N diferentes e obtiveram respostas diversas de acordo com o isolado cultivado.

Contudo estes trabalhos ainda estão restritos a produção em meios de cultura ou a fermentação líquida e não aos substratos mais usados em regiões da América do Sul, Índia e China. O estudo que mais se aproxima do sistema de produção do fungo em larga escala foi realizado por Dorta, Ertola e Arcas (1996). Os autores lançaram mão da estequiometria para caracterizar o crescimento e esporulação de *M. anisopliae* produzido em casca e farelo de arroz, determinando a quantidade de carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio presente no substrato, antes e depois do cultivo do fungo, e a quantidade desses elementos presentes no micélio e conídios do fungo. Assim, foi possível observar a assimilação e conversam dos elementos. A partir da relação C:N do substrato, do micélio e dos conídios foi observado que tanto o crescimento quanto a esporulação foram limitados pela disponibilidade de nitrogênio no meio.

Outras características inerentes ao beneficiamento do arroz podem ser responsáveis pelas diferenças significativas na produção de conídios, já que no arroz parboilizado houve maior produção, seguido pelo canjicão, depois pelos tipos brancos polidos e o pior desempenho foi apresentado pelo arroz integral. Segundo Storck; Silva e Comarella (2005) a parboilização é realizada através de um tratamento hidrotérmico e tem como objetivo principal a gelatinização do amido. “Nesta, ocorre o encharcamento do grão sob calor apenas o suficiente para gelatinizar o amido, seguido de resfriamento e secagem lenta, deixando o endosperma mais duro” (DENARDIN et al., 2004, p. 126). Durante a parboilização, são aprimoradas algumas qualidades tecnológicas do grão, como a redução da adesividade do arroz, os grãos cozidos ficam menos viscosos e mais soltos (DENARDIN et al., 2004), fatores que podem ser relevantes para a produção de *M. anisopliae*. Na metodologia empregada para avaliar a produção de conídios, onde o arroz permanece de molho em água, é submetido ao cozimento e esterilização em autoclave,

observou-se que, os arrozes do tipo branco polido, canjicão e integral, ficam pegajosos e formam grumos. Grãos de arroz unidos podem diminuir a aeração e a superfície de desenvolvimento do fungo e consequentemente ter-se-á uma menor quantidade de conídios. O trabalho de Dorta et al. (1990) confirma este fato, estes autores tentaram utilizar farinha de arroz e só conseguiram bons resultados para produção do entomopatógeno quando adicionaram casca de arroz ao substrato, pois desta forma reduziram a compactação do meio e aumentaram a superfície oferecida para a esporulação.

Uma maior área superficial para o desenvolvimento e esporulação também pode ser conseguida utilizando arroz "quebrado", chamado de quirela ou canjicão. O arroz canjicão foi capaz de produzir 3,42 x 10^9 conídios.g-^{1}, sendo inferior ao arroz parboilizado e superior ao arrozes brancos polidos e integral. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Quintela (1994), que comparou a produção de conídios em arroz agulhinha, quirela média e pequena. Como resultado obteve-se um aumento em 34,0 e 31,4% para quirela pequena e média (arroz quebrado correspondente ao canjicão), respectivamente em relação à produção em arroz agulhinha. A vantagem de se utilizar o arroz quebrado está na diminuição dos custos, pois o arroz canjicão, por se tratar de um subproduto do beneficiamento, custa em média três vezes menos que o arroz parboilizado e duas vezes e meio menos que o branco polido.

O arroz polido é mais barato do que o parboilizado, mas a produção de conídios foi maior no arroz parboilizado. A cada um real de arroz parboilizado se produz 3,18 x 10^{12} conídios enquanto que se produzem 2,33 x 10^{12} conídios por real de arroz polido, ou seja, o arroz parboilizado é 20% mais caro que o polido, porém produz 60% a mais. Levando em consideração apenas os dados numéricos de produção de conídios e preço do arroz conclui-se que o mais rentável é o arroz quebrado denominado canjicão, pois a cada real investido neste substrato tem-se o retorno de 7,60 x 10^{12} conídios, o que significa mais que o dobro do valor apresentado pelo arroz parboilizado.

Porém, existem algumas desvantagens de ordem prática quando o arroz quebrado é escolhido para a produção de *M. anisopliae*. Como pode ser observado nas Tabelas 4.5 a 4.7, este produto apresentou grande diversidade e grande quantidade de contaminantes (bactérias anaeróbicas, fungos e leveduras). Os fungos foram encontrados na quantidade de 15,56 x 10^2 UFC.g^{-1}, sendo identificados contaminantes dos seguintes gêneros**:** *Aspergillus, Penicillium, Cladosporium* e *Rhizopus*. Embora após a autoclavagem as populações de contaminantes sejam

drasticamente reduzidas em condições ideais em laboratório, nas indústrias problemas na esterilização de grandes lotes são mais comuns resultando na perda de todo um lote em função das contaminações. A sobrecarga de arroz na autoclave e a falta de manutenção deste equipamento podem diminuir a capacidade de esterilização e estes problemas seriam maiores em arroz quebrado comparado aos outros tipos de arroz.

Durante o preparo do substrato para produção do fungo, ao utilizar o arroz quebrado é preciso estar atento e não permitir o acúmulo de água no saco com arroz que seguirá para a autoclavagem, pois, se ocorrer excesso de água ocorrerá a formação de grumos da matéria prima, diminuindo a superfície de crescimento do fungo. Mesmo com quantidade adequada de água, foi observado durante a execução dos experimentos que a homogeneização da suspensão de inóculo com o canjicão é dificultada, principalmente em comparação ao arroz parboilizado, o que pode explicar as diferenças encontradas para a produção de conídios.

Outro problema apresentado pelo canjicão foi a dificuldade na extração de conídios, comparado com o parboilizado e nos brancos polidos, resultando em menor rendimento. Além disso, o canjicão se desfaz com muita facilidade e ao final do processo de extração é possível observar muito resíduo de arroz junto aos conídios. A importância destes aspectos está intimamente ligada ao tipo do produto final a ser comercializado, se “arroz mais fungo” ou esporos puros ou formulados. Atualmente existem cerca de onze empresas de biopesticidas privadas comercializando o micoinseticida (ALVES et al., 2008). O fungo é comercializado na forma de concentrados técnicos (substratos colonizados pelo fungo), material técnico (conídios puros) e dispersão oleosa (FARIA; WRAIGHT, 2007), e para este fim um processo eficiente de extração de conídios é requerido. Por melhor que seja o substrato no quesito produção do fungo, se o resultado de extração de conídios não for satisfatório, provavelmente a matéria prima não será aceita e nem incorporada no sistema de produção.

Outro fator que pode explicar a maior produção de conídios no arroz parboilizado é a umidade que este apresenta após a autoclavagem. Durante o molho este arroz é o que absorve a maior quantidade de água e esta umidade se mantém com a autoclavagem. Arzumanov, Jenkins e Roussos (2005) estudaram a influência da aeração forçada e da umidade sobre a produção de *M. anisopliae* em arroz, concluindo que a aeração forçada não altera a produção, enquanto que a umidade do arroz no sistema de fermentação sólido é responsável por incrementos significativos na produção de conídios. Neste trabalho foi sugerido um valor ótimo de umidade entre 57 e 58%.

Apesar de ter ocorrido uma menor viabilidade dos conídios produzidos em arroz integral, a mesma não é expressiva no contexto da qualidade dos conídios, pois todos os tratamentos apresentaram excelente porcentagem de germinação, com valores superiores a 99%. Vilas Boas, Andrade e Oliveira (1996) também mostraram que a viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* não foi influenciada pelos substratos (arroz, caupi, feijão, sorgo e fava) onde foram cultivados, os autores obtiveram germinação próxima de 85%. Da mesma forma, Ottati-de-Lima (2007) mostrou que a escolha do substrato não influenciou na viabilidade do entomopatógeno, quando comparou conídios produzidos em arroz parboilizado, arroz polido tipo 1 e 2 e arroz tipo canjiquinha. Pereira e Eira (1999) cultivaram o entomopatógeno submerso em meio líquido de arroz parboilizado, extrato de levedura, extrato do percevejo da soja (*Nezara viridula*) e meio convencional sólido de arroz em grão e observaram que viabilidade também não foi afetada nos diferentes meios utilizados.

O melhor arroz para a produção de conídios o parboilizado, foi escolhido para os ensaios com aditivos, mas nenhum dos aditivos testados neste trabalho foi capaz de incrementar a produção de conídios de *M. anisopliae*, pelo contrário, a adição de polpa cítrica e extrato de soja resultaram em decréscimo em relação ao tratamento padrão (arroz parboilizado). Provavelmente, a adição de 5% de extrato de soja, rico em proteínas, pode ter desbalanceado a relação ótima C:N e como já explorado anteriormente, substratos com relação C:N baixa não induzem a esporulação do fungo. A polpa cítrica foi testada, por se tratar de um subproduto da fabricação do suco de laranja, barato e de fácil aquisição. A baixa produtividade no arroz com a presença deste substrato pode ser devida a presença de compostos fenólicos, por exemplo, os flavonóides, que possuem comprovada ação antifúngica (OLIVEIRA et al., 2007). Os compostos fenólicos, presentes na polpa cítrica, possuem características hidrofóbicas e como, na lavagem do substrato utiliza-se espalhante adesivo Tween 80®, isso pode ter aumentado a liberação destas substâncias com atividade antimicrobiana, e a aplicação desta solução nas lagartas pode ter prejudicado o desempenho do entomopatógeno.

Quando adicionado ao meio de esporulação os inibidores de proteinase de soja foram responsáveis por incrementos na produção de conídios, porém o mesmo resultado não foi observado quando os mesmo foram utilizados como aditivos no arroz parboilizado, provavelmente devido a forma de incorporação. É importante salientar que isto não se deve ao fato de os inibidores terem sidos inoculados juntamente com a suspensão de conídios, pois testes

preliminares asseguraram que germinação dos conídios não é afetada pelos inibidores em suspensão.

A adição de levedura proveniente da fermentação de cana-de-açúcar ou peptona de soja no arroz parboilizado não foi capaz de superar a produção de conídios quando comparada com arroz sem aditivos. Resultados divergentes foram encontrados por outros autores quando estas substâncias foram adicionadas aos meios de cultura. Namasivayam e Kumar (2009) relatam ter conseguido produção satisfatória de conídios de *M. anisopliae* em grãos de arroz, sorgo, milheto e trigo suplementados com um por cento de extrato de levedura. Mas ao tentarem incrementar subprodutos agrícolas (farelo de arroz, bagaço de cana-de-açúcar) com 1 ou 10% de extrato de levedura ou melaço os rendimentos de conídios foram consideravelmente baixos em relação aos grãos. Roberts (1966) relata que as peptonas de modo geral são boas fontes de nitrogênio para o desenvolvimento de *M. anisopliae*. Barnes et al. (1975) relataram que entre várias fontes comerciais de peptona o extrato de levedura foi o melhor para o crescimento esporulação do fungo e a peptona bacteriológica foi a pior.

4.3 Conclusões

O arroz parboilizado foi o tipo de arroz em que o fungo *M. anisopliae* apresentou a maior produção de conídios, não sendo superado por nenhum dos aditivos testados neste arroz. Os conídios produzidos em diferentes tipos de arroz e aditivos apresentam viabilidade superior a 99%. Os tipos de arroz e aditivos não influenciaram significativamente a virulência do fungo.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA:** nota técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008. Brasília, 2009. 12 p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/DIVULGA/noticias/2009/pdf/150409_para.pdf>. Acesso em: 12 out. 2009.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology,** London, v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct. 1990.

ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill em bandejas. **Ecossistema,** Espírito Santo do Pinhal, v. 14, p. 188-192, out. 1989.

ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO JR. A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos.** 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 20, p. 637-710.

ALVES, S.B.; LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; MARQUES, E. J. Produção massal de fungos entomopatogênicos na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. cap. 8, p. 215-238.

AQUINO, M.L.N. O fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no Estado de Pernambuco. **Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas**, Recife, v. 72, p. 1-26, 1974.

ARZUMANOV, T.; JENKINS, N.; ROUSSOS, S. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 3/4, p. 1037–1042, Mar. 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16th ed. Washington, 1995. 2 v.

BARNES, G.L.; BOETHEL, D.L.; EIKENBARY, R.D.; CRISWELL, J.T.; GENTRY, C.R. Growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on media containing various peptone sources. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 25, n. 3, p. 301-305, May 1975.

BARRIGOSSI, J.A.F.; LANNA, A.C. **Agrotóxicos no cultivo do arroz no Brasil:** análise do consumo e medidas para reduzir o impacto ambiental negativo. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2004. 8 p. (Circular Técnica, 67).

BHARATI, J. H. KULKARNI, P.U. KRISHNARAJ AND A. R. ALAGAWADI. Effect of Different Carbon Sources on the Biomass of *Metarhizium anisopliae* (Ma2). **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, Dharwad, v. 20, n. 2, p. 310-311, Apr./June 2007.

CAMARGO, L.M.P.C.A. Desenvolvimento do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em diferentes meios de cultura naturais sólidos. **O Biológico**, São Paulo, v. 49, n. 4, p. 107-109, abr. 1983.

CAMPBELL, R.K.; BARNES, G.L; CARTWRIGHT, B.O.; EIKENBARY, R.D. Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in a basal medium containing various carbohydrate sources. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 41, n. 1, p. 117-121, Jan. 1983.

COFFMAN, W.R.; JULIANO, B.O. Rice. In: OLSON, R.A.; FREY, K.J. **Nutritional quality of cereal grains**: genetic and agronomic improvement. Madison: American Society of Agronomy, 1987. chap. 5, p. 101-131.

DENARDIN, C.C.; SILVA, L.P.; STORCK, C.R.; NÖRNBERG, J.L. Composição mineral de cultivares de arroz integral, parboilizado e branco. **Alimentos e Nutrição,** Araraquara, v. 15, n. 2, p. 125-130, abr./jun. 2004.

DORTA, B.; ERTOLA, J.R.; ARCAS, J. Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-substrate fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 19, n. 1, p. 434-439, Nov. 1996.

DORTA, B.; BOSCH, A.; ARCAS, J.A; ERTOLA R.J. High level of sporulation of *Metarhizium anisopliae* in a medium containing by-products. **Applied Microbiology and Biotechnology,** Berlin, v. 33, n. 6, p. 712-715, Sept. 1990.

FARIA, M.R. de; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, Orlando, v. 43, n. 3, p. 237-256, Dec. 2007.

FINNEY, D.J. **Probit analisis**. 3rd ed. London: Cambridge University Press, 1971. 333p.

FRIGO, S.M.; AZEVEDO, J.L. Meios de cultura e produção de conídios em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin**. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz",** Piracicaba, v. 43, p. 285-293, abr. 1986.

GAO, L.; SUNA, M.H.; LIU, X.Z.; CHEA, Y.S. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. **Mycological Research,** Cambridge, v. 11, n. 1, p. 87-92, Jan. 2007.

HEINEMANN, R.J.B.; FAGUNDES, P.L.; PINTO, E.A.; PENTEADO, M.V.C.; LANFER-MARQUEZ, U.M. Comparative study of nutrient composition of commercial brown, parboiled and milled rice from Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, New York, v. 18, n. 4, p. 287-296, June 2005.

HUTWIMMER, S.; WAGNER, S.; AFFENZELLER, M.; BURGSTALLER, W.; STRASSER, H. Algorithm-based design of novel synthetic media for *Metarhizium anisopliae* simulating its nutritional conditions in the environment. **Journal of Applied Microbiology,** Oxford, v. 105, n. 2, p. 459-488, Aug. 2008.

IBRAHIM, L.; BUTT, T.M.; JENKINSON, P. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research,** Cambridge, v. 106, p. 705-715, June 2002.

JABOR, I.A.S.; PAMPHILE, J.A.; RODRIGUES, S.B.; MARQUES-SILVA, G.G.; ROCHA, C.L.M.S.C.da. Análise do desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em resposta a fatores nutricionais. **Acta Scientarium Agronomy**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 497-501, jan./jul. 2003.

JENNINGS, D.H. **The physiology of fungal nutrition**. New York: Cambridge University Press, 1995. 640 p.

JULIANO, B.O. **Le riz dans la nutrition humaine.** Rome: FAO, 1993. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/T0567F/T0567F00.htm>. Acesso em: 15 out. 2009.

KAMP, A.M.; BICOCHKA, M.J. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available ágars. **Letters in Applied Microbiology,** Oxford, v. 35, n. 1, p. 74-77, July 2002.

KING, E.G.; HARTLEY, G.G. *Diatraea saccharalis*. In: SINGH, P.; MOORE, R.F. (Ed.). **Handbook of insect rearing**. New York: Elsevier, 1985. p. 265-270.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics.** New York: John Wiley, 1991. p. 115-175.

LI, D.P.; HOLDOM, D.G. Effects of pesticides on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology,** San Diego, v. 63, n. 2, p. 209-211, Mar. 1994.

_____. Effects of nutrients on colony formation, growth, and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 65, n. 3, p. 253-260, May 1995.

MOHAMED A.A.; PRATT J.P.; NELSON, F.R.S. Compatability of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* with chemical pesticides. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 99, n. 2, p. 99-95, Aug. 1987.

NAMASIVAYAM, S.K.; KUMAR, V.P. Influence of growth media on pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin against *Chilo partellus* (Swinhoe). **Journal of Biopesticides,** Tirunelveli, v. 2, n. 1, p. 92-93, 2009.

OLIVEIRA, M.S.; DORS, C.C.; SOUZA-SOARES, L.A.; BADIALE-FURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 18, n. 3, p. 267-275, jul./set. 2007.

OTTATI-DE-LIMA, E.L. **Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em diferentes substratos e efeitos de radiação ultravioleta e da temperatura sobre estruturas infectivas desses entomopatógenos.** 2007. 92 p. Tese (Doutorado em Proteção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2007.

PARK, J.K.; KIM, S.S.; KIM, K.O. Effects of milling ratio on sensory properties of cooked rice and physicochemical properties of milled and cooked rice. **Cereal Chemistry,** Saint Paul, v. 78, n. 2, p.151-156, Mar./Apr. 2001.

PEREIRA, S.R.M.; EIRA, A.F. Metodologia para a produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em cultivo submerso: esporulação da biomassa, efeito da concentração de açúcar e custo do inoculante. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 389-394, jul./set.1999.

QUINTELA, E.D. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. em quirela de arroz. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 557-560, 1994.

RACHAPPA, V.; LINGAPPA, S.; PATIL, R.K. Effect of Agrochemicals on Growth and Sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin**. Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, Dharwad, v. 20, n. 2, p. 410-413, Apr./June 2007.

RANGEL, D.E.N.; ALSTON, D.G.; ROBERTS, D.W. Effects of physical and nutritional stress conditions during culture on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. **Mycological Research,** Cambridge, v. 112, n. 11, p. 1355-1361, Nov. 2008.

ROBERTS, D.W. Toxins from the entomogenous fungus *Metarrhizium anisopliae*. Production in submerged and surface cultures, and in inorganic and organic nitrogen media. **Journal of Invertebrate Pathology,** San Diego, v. 8, n. 2, p. 212-221, June 1966.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide:** version. 9.1.3. Cary, 2003. 1167 p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 317 p.

SIQUEIRA, R. S. de. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: Embrapa, 1995. 159 p.

SCHEIDER-ORELLI, O. **Entomologisches Praktikum:** Einfuehrung in die land – un forstwirtschaftliche Insektekunde. Ararau: Zweite Aufl., 1947. 237 p.

SHAH, F.A.; WANG, C.S.; BUTT, T.M. Nutrition influences growth and virulence of the insectpathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters,** Amsterdam, v. 251, n. 2, p. 259-266, Oct. 2005.

STORCK, C.R.; SILVA, L.P.; COMARELLA, C.G. Influência do processamento na composição nutricional de grãos de arroz. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 3, p. 259-264, jul./set. 2005.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignement through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight mathirx choice. **Nucleic acids research,** Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, Nov. 1994.

TRAN, T.U.; SUZUKI, K.; OKADOME, H.; HOMMA, S.; OHTSUBO, K. Analysis of the tastes of brown rice and milled rice with different milling yields using a taste sensing system. **Food Chemistry**, Barking, v.88, n. 4, p. 557-566, Dec. 2004.

VEGA, F.E.; JACKSON, M.A.; MERCADIER, G.; POPRAWSKI, T.J. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology,** Oxford, v. 19, n. 4, p. 363-368, June 2003.

VILAS BOAS, A.M; ANDRADE, R.M.; OLIVEIRA, J.V. Diversificação de meios de cultura para produção de fungos entomopatogênicos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 39, n. 1, p. 123-128, mar. 1996.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L.A. de. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 1184-1192, jul. 2008.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 37, n. 8, p. 849-868, Dec. 2002.

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