

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS AMBIENTAIS PARA O
CONTROLE BIOLÓGICO DE *Dysdercus peruvianus*,
ASSOCIADO AO FUNGO *Metarhizium anisopliae*.**

Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso entregue ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para colação de grau em Bacharel em Ciências Biológicas.

Gabriel Perotoni

Orientador: Prof. Dr Augusto Schrank
Co-orientador: Dr Walter Orlando Beys da Silva

Porto Alegre, 2010

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Ao professor Augusto Schrank, pela orientação e oportunidade de trabalhar nesse projeto.

À professora Marilene Henning Veinstein pela orientação e pela confiança.

À professora Célia Carlini pelos insetos (*Dysdercus peruvianus*) cedidos para a realização desse trabalho.

Ao professor Eloi de Souza Garcia, da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, pelos insetos (*Rhodnius prolixus*) cedidos para a realização desse trabalho.

Aos colegas dos laboratórios 217 e 220 do Centro de Biotecnologia da UFRGS pelo apoio.

Ao Leonardo Broetto, pela participação fundamental na identificação molecular das espécies bacterianas desse trabalho e pela ajuda.

Ao Walter e à Lucélia, pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência (muito necessária), pelo incentivo, pela confiança, pelo interesse, por estarem sempre presentes em todos os momentos desde a minha chegada ao projeto e por acreditarem em mim, mesmo em meus momentos difíceis.

Aos amigos de Vacaria, Rafael, Maurício e Diego, pelas noites de pôker e pela grande amizade.

Aos amigos que fiz durante todos esses anos de faculdade, em especial à turma de 2005/2.

Aos amigos que levo para sempre: Clayton, Mery e Renata.

À Cristina, meu amor, pelo companheirismo, pela parceria, pelo apoio, pelos puxões de orelha, pela ajuda na revisão do texto e montagem das referências, pela paciência e por ser exatamente como é.

Em especial à minha família, pelo apoio e carinho incondicional. Por acreditarem em mim em todos os momentos e estarem sempre presentes. Agradeço aos ensinamentos e ao exemplo de conduta pessoal que representam, e que tento sempre seguir.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	v
Lista de figuras	vi
Lista de tabelas	viii
Resumo	ix
1. Introdução	1
1.1. Controle biológico	2
1.2. O controle biológico e <i>Metarhizium anisopliae</i>	4
1.3. Taxonomia de <i>M. anisopliae</i>	7
1.4. O Controle biológico associado	8
1.5. O percevejo manchador de algodão <i>Dysdercus peruvianus</i>	10
1.6. O barbeiro transmissor de chagas <i>Rhodnius prolixus</i>	11
2. Objetivos	13
2.1. Objetivos específicos	13
3. Metodologia	14
3.1. Isolamento e seleção de bactérias ambientais	14
3.2. Identificação dos isolados bacterianos	14
3.3. Cultivo de <i>M. anisopliae</i>	15
3.4. Confrontos	16
3.5. Bioensaios	16
3.5.1 - Bioensaios com <i>D. peruvianus</i>	17
3.5.2 - Bioensaio com <i>R. prolixus</i>	18
3.6. Análises estatísticas	19
4. Resultados	19
4.1. Identificação dos isolados bacterianos	19

4.2 Confrontos	23
4.3 Bioensaios	24
4.3.1 Bioensaios com <i>D. peruvianus</i>	24
4.3.2 Bioensaios com <i>R. prolixus</i>	33
5. Discussão	35
6. Conclusões	40
7. Referências bibliográficas	40

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ha	hectare
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
min	Minuto
mL	Mililitro
rRNA	RNA ribossomal
rDNA	DNA ribossomal
Kg	Kilograma
NaCl	Cloreto de sódio
LB	Luria-Bertani
UFC	Unidade Formadora de Colônia
PCR	Reação em cadeia da polimerase
°C	Graus Centígrados
pb	Pares de Base
BDA	Agar Batata Dextrose
nm	Nanômetro
LT	Tempo letal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O percevejo manchador do algodão, <i>Dysdercus peruvianus</i> . (A) ninfa de quarto instar; (B) adulto	11
Figura 2: Ovos, ninfas de 1° á 5° instar e adulto de <i>Rhodnius prolixus</i> . Fonte: site da UFRJ	13
Figura 3: Amplificação por PCR do gene 23S rRNA dos isolados bacterianos	21
Figura 4: Árvore filogenética mostrando os isolados 2AA e 627AA em comparação com diferentes cepas de <i>P. fluorescens</i> , bem como outras espécies mais distantes filogeneticamente	22
Figura 5: Fotografias dos confrontos, utilizando meio BDA, entre os isolados bacterianos e colônias do fungo <i>M. anisopliae</i>	24
Figura 6: Curva de sobrevivência de <i>D. peruvianus</i> infectado com <i>M. anisopliae</i> (10^8 esporos/mL) (met) e <i>M. anisopliae</i> associado aos diferentes isolados bacterianos em cultura total	25
Figura 7: Curva de sobrevivência de <i>D. peruvianus</i> frente a diferentes tratamentos utilizando o isolado 7B e o fungo <i>M. Anisopliae</i>	27
Figura 8: Curva de sobrevivência de <i>D. peruvianus</i> frente a diferentes tratamentos utilizando o isolado 627B e o fungo <i>M. Anisopliae</i>	28
Figura 9: Curva de sobrevivência de <i>D. peruvianus</i> frente a diferentes tratamentos utilizando o isolado 627AA e o fungo <i>M. Anisopliae</i>	28
Figura 10: Curva de sobrevivência de <i>D. peruvianus</i> frente a diferentes tratamentos utilizando o isolado 2AA e o fungo <i>M. Anisopliae</i>	29
Figura 11: Curva de sobrevivência de <i>D. peruvianus</i> frente a diferentes tratamentos com a presença de <i>M. anisopliae</i> e o isolado 2AA em suas variações	30
Figura 12: Curva de sobrevivência de <i>D. peruvianus</i> frente a diferentes tratamentos o isolado 2AA em suas variações, mas agora sem a presença de <i>M. anisopliae</i>	30
Figura 13: Curva de sobrevivência de <i>D. peruvianus</i> frente a diferentes	32

tratamentos com a presença de *M. anisopliae* e o isolado 627AA em suas variações

Figura 14: Curva de sobrevivência de *D. peruvianus* frente a diferentes tratamentos o isolado 627AA em suas variações, mas agora sem a presença de *M. anisopliae* 32

Figura 15: Curva de sobrevivência utilizando ninfas de 4° instar de *R. prolixus* e diferentes tratamentos com *M. anisopliae* e o isolado 2AA 34

Figura 16: Curva de sobrevivência utilizando ninfas de 5° instar de *R. prolixus* e diferentes tratamentos com *M. anisopliae* e o isolado 2AA 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Artrópodes alvos suscetíveis à infecção de <i>M. anisopliae</i> .	6
Tabela 2: Produtos comercializados a base de <i>M. anisopliae</i> .	7
Tabela 3: Tratamentos realizados nos bioensaios e seus respectivos códigos.	18
Tabela 4: Descrição da morfologia da colônia, coloração de Gram, e forma de cada isolado bacteriano obtido no processo de isolamento.	20
Tabela 5: Identificação dos isolados bacterianos pela comparação das sequências do gene 23S rRNA comparadas com o banco de dados do NCBI e suas respectivas identidades.	21
Tabela 6: Identificação dos isolados bacterianos pela comparação das sequências do gene 16S rRNA comparadas com o banco de dados do NCBI e suas respectivas identidades.	23
Tabela 7: Tempo letal (TL ₅₀) do bioensaio mostrado na figura 4 utilizando diferentes isolados bacterianos associados a <i>M. anisopliae</i> .	25
Tabela 8: Análise, através do teste de Tukey (alfa:0,05), dos tratamentos utilizados no bioensaio mostrado na figura 6, agora analisado até o quinto dia pós inoculação. Grupos estatisticamente diferenciados.	26
Tabela 9: LT50 do bioensaio mostrado nas figuras 11 e 12, de diferentes tratamentos utilizando o isolado 2AA.	31
Tabela 10: LT50 do bioensaio mostrado nas figuras 13 e 14, de diferentes tratamentos utilizando o isolado 627AA.	33

Resumo

Dysdercus peruvianus é um inseto praga da cultura de algodão, que acarreta sérios danos econômicos a essa cultura. O método utilizado atualmente para controlá-lo é através do uso de pesticidas químicos; porém, esta prática é cada vez mais questionada pela sociedade. O impacto ambiental gerado, os custos elevados, a baixa especificidade e os riscos em sua manipulação, são exemplos de desvantagens desse tipo de controle. Em vista disso, o controle biológico surge como uma alternativa viável e cada vez mais estudada nos centros de pesquisas. *Metarhizium anisopliae* é um fungo filamentosos com comprovado efeito biocontrolador em diversos artrópodes, inclusive *D. peruvianus*. O maior entrave na adoção desse fungo, como de qualquer outro biocontrolador, é que o tempo de morte dos insetos-alvo é, geralmente, maior do que quando comparado ao seu correspondente químico. Neste trabalho, isolamos, identificamos e avaliamos, através de bioensaios, bactérias ambientais para atuarem no controle biológico de *D. peruvianus* associadas com *M. anisopliae*. Utilizamos também o inseto vetor da Doença de Chagas, o barbeiro *Rhodnius prolixus*, em bioensaios para avaliar a especificidade dos isolados bacterianos. Os resultados indicam que 4 isolados bacterianos efetivamente aceleram a morte de indivíduos de *D. peruvianus* quando associados ao fungo sendo que os dois mais eficientes foram molecularmente identificados como da espécie *Pseudomonas fluorescens*. Estes dois isolados de *P. fluorescens* não apresentaram a mesma eficiência no controle associado de *R. prolixus*. A formulação contendo conídios de *M. anisopliae* e cultura bacteriana dos isolados de *P. fluorescens* demonstrou

eficácia com até 96% de redução do tempo de morte de *D. peruvianus* em relação ao controle com o fungo. Este trabalho demonstrou ser possível o uso de múltiplos agentes biocontroladores no combate a pragas agropecuárias e que essa alternativa pode representar um aumento significativo na eficiência dos agentes de controle biológico, diminuindo assim a distância que os separa dos agentes químicos atualmente usados e aumentando o interesse dos produtores em seu uso.

1. Introdução

A demanda por alimentos e insumos agrícolas, impulsionada pelo contínuo aumento da população mundial, se encontra em um dos níveis mais elevados da história da humanidade gerando transtornos ecológicos de difícil resolução. Cada vez mais, as monoculturas agrícolas ocupam maior importância na economia e, conseqüentemente, uma maior área cultivada. Algumas das conseqüências são a redução da biodiversidade, redução da competição e o favorecimento de certas espécies que, na ausência de predadores ou parasitas específicos, crescem em demasia e tornam-se pragas. O método mais comumente utilizado para reduzir os danos econômicos que essas pragas causam é o emprego de agentes químicos e, conseqüentemente, as desvantagens inerentes ao seu uso, tais como: a baixa especificidade quanto à praga a ser controlada, afetando outros organismos além do alvo; a geração de pragas resistentes, pelo uso continuado do agente químico; o efeito tóxico cumulativo na cadeia alimentar - bioamplificação; a contaminação de solos e lençóis d'água; além dos riscos à saúde decorrentes de sua manipulação, entre outros fatores. Cada vez mais, impulsionados pela demanda da sociedade, os centros de pesquisas buscam formas alternativas de controle de pragas da cadeia agropecuária e de importância sanitária, tornando, assim, o controle biológico uma alternativa cada vez mais viável e promissora. Os seus baixos custos em relação ao controle tradicional, a maior especificidade quanto ao organismo a ser controlado e o não surgimento de resistência são algumas das vantagens desse tipo de controle. Entretanto, o maior entrave para sua aplicação, é que, geralmente, o tempo de morte da

praga alvo é maior do que quando comparado ao seu correspondente químico. Estratégias para reduzir esta diferença de efetividade estão sendo estudadas para que os agentes biocontroladores sejam cada vez mais utilizados.

1.1. O controle biológico

O controle biológico se baseia em um dos fundamentos básicos das relações ecológicas entre os seres vivos de que cada espécie, seja animal, vegetal ou microbiana, possui inimigos naturais. Desta forma, organismos capazes de inibir o crescimento populacional de outros podem ser utilizados no controle de populações específicas que possam vir a se tornar pragas (SANTI L. 2009b). O controle biológico é uma alternativa vantajosa em relação ao controle químico, especialmente quanto ao impacto ambiental, custo, especificidade e desenvolvimento de resistência, não afetando populações de outros artrópodes, como inimigos naturais de pragas ou que são ecologicamente importantes (ALVES, 1998). Um agente biocontrolador eficiente deve propiciar uma redução significativa dos danos causados por um organismo praga, por morte ou redução de seu crescimento populacional (MELO & AZEVEDO, 1998). O controle biológico pode ser aplicado pela proteção e manutenção do desenvolvimento de um antagonista natural ou através da introdução de um competidor, patógeno ou predador exógeno (GRONVOLD *et al.* 1996). A importação e aplicação de um organismo fora de seu ambiente natural, com o objetivo de controlar uma espécie de peste, consistem no controle biológico clássico. No entanto, conforme descrito por HOWARTH (1996), esse tipo de estratégia depende da adaptação do

biocontrolador ao ambiente exógeno, como também de sua relação com as espécies nativas. Outra divisão importante do controle biológico diz respeito à intensidade com que ele é utilizado, ou seja, a aplicação de um biopesticida pode ser completa, não ocorrendo a adição de químicos; substancial, onde 75 a 100% do controle é realizado de forma natural; ou parcial, sendo reduzido o controle químico de 25 a 50% (GRONVOLD *et al.*, 1996)

O controle biológico possui diversas vantagens quando comparado ao controle clássico utilizando produtos químicos. O baixo impacto ambiental gerado, o baixo risco em seu manuseio, os custos reduzidos e principalmente uma maior especificidade em relação ao agente alvo são exemplos dessas vantagens. No entanto, ainda existem limitações para o uso de pesticidas biológicos, tais como a necessidade de um período maior que o dos agrotóxicos para a obtenção de resultados e a dependência das condições climáticas, já que são organismos vivos (ALVES, 1998). Esforços têm sido realizados com o intuito de potencializar o controle biológico utilizando microrganismos, visando aperfeiçoar a produção e o inóculo destes agentes, além de aumentar a estabilidade e eficiência dos mesmos (JENKINS, 1998; GRIMM, 2001; BATTA, 2003; POLAR *et al.* 2005).

Muitos são os agentes com potencial para o controle de pragas, dentre eles os insetos, vírus, bactérias e fungos. Entre os organismos utilizados como agentes no controle biológico de pragas, destacam-se os microrganismos pela facilidade de manuseio e aplicação, custo e conhecimento do processo de produção, além da eficiência pronunciada de algumas espécies já amplamente utilizadas com este intuito. Os fungos compõem um grupo especial de microrganismos para o controle biológico, pois se destacam no controle de

artrópodes. Este fato ocorre devido não somente a sua fácil produção para fins comerciais, como também pela sua capacidade de invadir de forma ativa seus hospedeiros, não necessitando sua prévia ingestão para desenvolverem o efeito tóxico (MCCOY & TIGANO-MILANI, 1992). Em relação aos fungos entomopatogênicos, alguns trabalhos sugerem que os efeitos em artrópodes não hospedeiros são mínimos, tornando-os uma alternativa segura para seu uso em programas de manejo integrado de pragas quando comparados com os inseticidas químicos (GOETTEL & HAJEK, 2000; PELL *et al.* 2001).

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados para o controle biológico destes organismos, destacando-se os gêneros: *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces* e *Verticillium* (SHAH & PELL, 2003). A grande variabilidade genética desses entomopatógenos pode ser considerada uma das suas principais vantagens. Mais de 700 espécies de fungos pertencentes a aproximadamente 90 gêneros são agentes etiológicos de 80% das doenças de insetos (ALVES, 1998).

1.2. O controle biológico e *Metarhizium anisopliae*

Atualmente, *M. anisopliae* é um importante agente utilizado no controle biológico de pragas, tendo sua ação bastante estudada e amplamente utilizada (SHAH & PELL, 2003). Este fungo infecta mais de 300 espécies de insetos, incluindo pragas importantes tanto para agricultura como para pecuária (ALVES, 1998).

No Brasil, *M. anisopliae* é utilizado com sucesso desde 1965, para o controle da cigarrinha-da-cana (*Mahanarva posticata*) e, a partir daí, houve a instalação de laboratórios na região Nordeste para viabilizar sua utilização no controle biológico (MARQUES *et al.* 1981). Sua utilização tem aumentado nos últimos anos, atingindo milhares de hectares. Tal sucesso possibilitou a diminuição do uso de produtos químicos que inicialmente era de 150.000 ha/ano para 12.000 ha/ano, ou seja, uma redução de quase 90% (MELO & AZEVEDO, 1998), havendo ainda, perspectivas para sua utilização em nível comercial em outros países (FERNANDEZ, 2000). Além do controle da cigarrinha-da-cana, *M. anisopliae* é utilizado no Brasil para controlar a broca da cana-de-açúcar (*Diatrea saccharalis*), a cigarrinha das pastagens (*Deois flavopicta* e *Zulia entreriana*), percevejos da soja dos gêneros *Nezara* e *Piezodorus*, broca do café (*Diploschema rotundicollee*) e broca do rizoma (*Cosmopolites sordidus*) em bananeira (ALVES, 1998). Em trabalhos experimentais, o fungo foi testado com sucesso sobre larvas de *Lucilia sericata* (WRIGHT *et al.* 2004), *Dysdercus peruvianus* (LUBECK, *et al.* 2008), *Musca domestica* (ALVES, 1998) e ectoparasitos de abelhas *Varroa destructor* (KANGA *et al.* 2003). Sua patogenicidade tem sido ainda demonstrada para alguns vetores de doenças humanas (SHERLOCK & GUITTON, 1982; SILVA & MESSIAS, 1986; SCHOLTE *et al.* 2005) e para carrapatos de diferentes gêneros e espécies (KAAYA *et al.* 1996; ZHIOUA *et al.* 1997; FRAZZON *et al.* 2000; FARENHORST *et al.* 2008). A Tabela 1 apresenta uma listagem de pragas comprovadamente suscetíveis à infecção e controle por *M. anisopliae*.

Tabela 1 - Artrópodes alvos suscetíveis à infecção de *M. anisopliae*.

Artrópode	Área de Impacto	Referência
<i>Aedes aegypti</i> (Vetor da dengue)	Saúde pública	SCHOLTE <i>et al.</i> 2007
<i>Anopheles gambiae</i> (Vetor da malária)	Saúde pública	SCHOLTE <i>et al.</i> 2005
<i>Triatoma infestans</i> (Vetor da doença de Chagas)	Saúde pública	JUAREZ <i>et al.</i> 2000; LAZZARINI <i>et al.</i> 2006
<i>Blatella germanica</i>	Saúde pública	QUESADA-MORAGA <i>et al.</i> 2004
<i>Rhipicephalus microplus</i>	Pecuária	FRAZZON <i>et al.</i> 2000
<i>Glossina</i> sp. (Vetor da doença do sono)	Saúde pública	KAAYA & MUNYINI, 1995
<i>Peregrinus maidis</i>	Agricultura	TOLEDO <i>et al.</i> 2007
<i>Capnodis tenebrionis</i>	Agricultura	MARANINNO <i>et al.</i> 2006

Atualmente, surgem cada vez mais produtos formulados a partir dos conídios de *M. anisopliae* para o manejo orgânico de pragas em diferentes países, inclusive no Brasil (Tabela 2). A regulamentação de biopesticidas deve respeitar normas, registros e regulamentações do país. Aspectos relacionados à segurança ambiental e ao manejo pelo usuário, além de possíveis implicações na saúde humana destacam-se entre as normas e exigências para aplicação e comercialização legal destes agentes biocontroladores. Nos últimos anos, entre os 171 biopesticidas desenvolvidos para o controle de ácaros e insetos 35,7% destes continham *M. anisopliae* em sua formulação (FARIA & WRAIGHT, 2007).

Tabela 2 - Produtos comercializados a base de *M. anisopliae*.

Produto	País	Empresa
Meta-Guard	Índia	Ajay Bio-Tech
Metabiol	Colômbia	Control Biologico
Destruxin	México	Biotropic
Metanat EF	Brasil	Natural Rural
Metanat PM	Brasil	Natural Rural
Metanat CE	Brasil	Natural Rural
BMNat	Brasil	Natural Rural

Fonte: Ajay Bio-Tech (2010), Natural Rural (2010), Control Biologico (2010), Biotropic (2010).

1.3. Taxonomia de *M. anisopliae*

M. anisopliae (Metschn.) Sorokin foi primeiramente isolado pelo microbiologista russo Metchnikoff em 1879 de uma praga de cereais, o besouro *Anisoplia austriaca*, e descrito por Sorokin em 1883 como *M. anisopliae*. Este fungo é amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado facilmente no solo, onde sobrevive por longos períodos (ALVES, 1998). *M. anisopliae* foi classificado durante muito tempo como Deuteromiceto pertencente à classe Hiphomycetes (TULLOCH, 1976). Entretanto, utilizando análises de seqüências da região de ITS (*internal transcribed spacers*) do rRNA, LIU *et al.* (2001, 2002) identificaram o fungo *M. anisopliae* var. *majus* como sendo a forma anamorfa de *Cordyceps brittlebankisoides*, classificando *M. anisopliae* var. *majus* como um ascomiceto.

Morfologicamente, *M. anisopliae* apresenta-se como um fungo filamentososo, com micélio hialino e septado, possuindo conidióforos

característicos, dos quais emergem conídios cilíndricos organizados em colunas. São conhecidas duas formas de reprodução: a reprodução assexual, responsável pelo crescimento vegetativo do fungo e a reprodução parassexual, que envolve os fenômenos de heterocariose e de recombinação mitótica. O desenvolvimento vegetativo de *Metarhizium* ocorre normalmente na faixa de temperatura entre 15 e 32 °C, sendo a temperatura ideal entre 24 e 30 °C e pH ótimo de 6,9 (DRIVER *et al.* 2000; ARRUDA, 2005). No entanto, existe tolerância a um intervalo de pH relativamente amplo (2,0 a 8,5). Os requisitos nutricionais do fungo são poucos, podendo utilizar como fonte de carbono o amido, a glicose, o glicerol, a maltose, a sacarose e a quitina (ALVES, 1998). Em uma revisão da classificação, levando-se em consideração análises de seqüências do rDNA, DRIVER *et al.* (2000) reavaliaram a taxonomia do gênero *Metarhizium* e encontraram um alto nível de diversidade genética entre 123 isolados analisados. Seus resultados confirmaram a prevalência do grupo *M. anisopliae* e os autores reconheceram duas outras variedades (*M. anisopliae* var. *lepidiotum* e *M. anisopliae* var. *acridum*), além de duas novas variedades de *M. flavoviride* (*M. flavoviride* var. *novazealandicum* e *M. flavoviride* var. *pemphigum*). Recentemente uma nova linhagem de *Metarhizium* foi isolada na China de cupins da espécie *Odontotermes formosanus* e classificada como uma nova variedade (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) (DONG *et al.* 2007).

1.4. O controle biológico associado

Uma nova forma de abordar o problema do controle biológico é associar mais de um agente biocontrolador numa mesma formulação a fim de acelerar o

processo de controle das pragas, aumentando assim o interesse de produtores na utilização de biopesticidas. Algumas formulações utilizando *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana*, outro fungo aplicado no controle de insetos-praga, já estão em uso comercial, como o BMNat , da empresa Natural Rural. O biopesticida bacteriano mais utilizado e estudado é a base de *Bacillus thuringiensis*, uma bactéria gram-negativa, formadora de endosporos e amplamente distribuída na natureza. Um grande número de isolados de *B. thuringiensis* é comercialmente produzido por sua ação contra insetos das ordens Lepidóptera, Coleóptera e Díptera (SUDAKIN, 2003). Essa bactéria produz, durante a esporulação, inclusões intracelulares repletas de pró-toxinas que, quando ingeridas, são solubilizadas e convertidas em toxinas ativas no intestino médio dos hospedeiros. Recentemente a EMBRAPA Recursos genéticos e Biotecnologia, em parceria com a empresa privada Bthek Biotecnologia, dispuseram no mercado inseticidas com base em bactérias ambientais, como *B. thuringiensis* (produto *Bt-horus SC*) e *Bacillus sphaericus* (produto *Sphaerus SC*), para o controle de pragas agrárias e vetores de doenças como o mosquito transmissor da dengue (*Aedes aegypti*), o borrachudo (*Similium spp.*), o mosquito prego (*Anopheles spp.*) transmissor da malária e o pernilongo comum (*Culex spp.*) que é vetor de encefalites e da filariose.

LUTZ *et al.* (2004), demonstrou que combinações entre a bactéria *Pseudomonas fluorescens* e o fungo *Trichoderma atroviride* propiciou um aumento na expressão de genes biocontroladores chaves em ambas as espécies, no controle de doenças fúngicas e por bactérias em rizosfera de plantas. O emprego de fungos e bactérias em associação para o controle de

artrópodes pode vir a ser uma alternativa viável para tentar aumentar a efetividade do biocontrole.

1.5. O percevejo manchador de algodão *Dysdercus peruvianus*

Hemípteras do gênero *Dysdercus* são os mais abundantes da família Pyrrhocoridae e parasitam, principalmente, plantas da família Malvaceae (algodão). A cópula pode durar de 1 a 7 dias e ocorre após a fêmea atingir a fase adulta, ficando macho e fêmea unidos pelo ápice do abdômen e voltados em direções opostas. A fêmea, depois de fecundada, prepara um ninho no solo para a postura, onde deposita os ovos. Em várias posturas, uma fêmea é capaz de produzir uma média de 246 ovos. Destes emergem as formas jovens que, após passarem por quatro estágios, tornam-se adultos (Figura 1B). O ciclo dura em média 40 dias se contado desde o dia da primeira postura até a obtenção da primeira fêmea adulta (GONÇALVES, 2000). Representantes do gênero *Dysdercus* Guérin Menévill, 1831 (Hemiptera: Pyrrhocoridae) são fitófagos e foram registrados atacando algodoeiro em diversas regiões do mundo, tais como no Brasil, na Argentina e no Paraguai, ainda que, de sua dieta principal, também façam parte plantas das famílias Amaranthaceae, Bombacaceae, Compositae, Rubiaceae e Sterculiaceae (GONÇALVES, 2000).

A adoção de técnicas de manejo de pragas do algodoeiro como lagartas, reduzindo a aplicação de agroquímicos, fez com que aumentasse a população dos percevejos do gênero *Dysdercus*. Estes, por sua vez, podem causar prejuízos consideráveis, que se relacionam à perda de peso da semente, à redução do teor de óleo, à possível inoculação de microrganismos nas

sementes e, por fim, a manchas nas fibras do algodão, sendo por este fato denominados percevejos manchadores do algodão (MILANO *et al.* 1999; STANISÇUASKI *et al.* 2005). A produção de algodão no Brasil está em torno de 1,19 milhões de toneladas, com área colhida de aproximadamente 0,85 milhões de hectares e rendimento de 1,49 Kg/ha (CONAB, 2010). Um relatório a respeito das projeções do agronegócio mundial e brasileiro, feito pelo MAPA (2008), mostra que, segundo a *Food and Agricultural Policy Research Institute* (FAPRI), a produção de algodão deverá crescer a uma taxa de 1,9% anual no período de 2006/07 a 2016/17, e que o Brasil será o quinto maior produtor mundial desta semente.

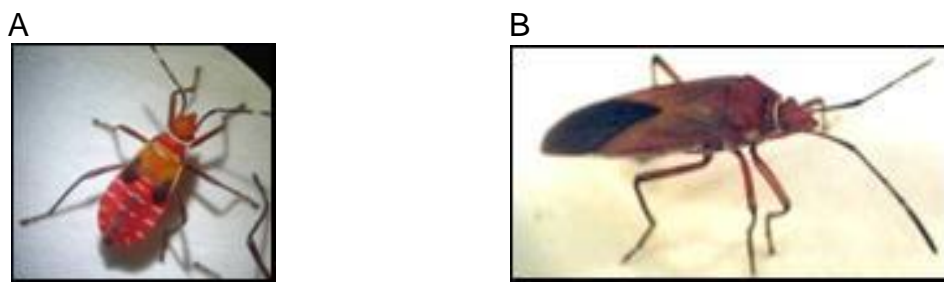


Figura 1: O percevejo manchador do algodão, *Dysdercus peruvianus*. (A) ninfa de quarto instar; (B) adulto (fotos: SANTI, L.).

1.6. O barbeiro transmissor de chagas *Rhodnius prolixus*

Os Triatomíneos são da família Reduviidae e pertencem à ordem Hemiptera. São hematófagos obrigatórios, inclusive nos estágios de ninfas. Várias espécies de triatomíneos são vetores da doença de Chagas nas Américas e popularmente são conhecidos como barbeiros. *R. prolixus* é um

vetor importante da Doença de Chagas na América Central e em alguns países da América do Sul e tornou-se um inseto modelo para o estudo da fisiologia e da bioquímica de insetos graças ao seu uso pelo Dr. Vincent Wigglesworth nos anos 1930 e subseqüentes (EDWARDS,1998).

A espécie é um inseto que sofre metamorfose incompleta (hemimetábolo). Durante seu ciclo de vida apresenta cinco estágios de ninfa antes de atingir a fase adulta. Apenas na fase adulta este inseto possui asas e apresenta dimorfismo sexual. A muda de um estágio para o outro ocorre em resposta a um repasto sanguíneo. *R. prolixus* não tem hospedeiro preferencial, aceitando alimentar-se em qualquer vertebrado, inclusive o homem. Este inseto tanto pode ser encontrado em ambientes silvestre como artificiais, com ocorrência frequente de colônias em ambientes domiciliares (SILVEIRA, 2000).

A Doença de Chagas é uma doença crônica e debilitante, freqüentemente fatal, que afeta atualmente de 15 a 16 milhões de pessoas na América Latina. É causada através da infecção pelo protozoário parasito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* e transmitida através do processo de alimentação de seus vetores, os barbeiros. Por ser uma enzootia, a doença é de difícil controle, sendo a borrifação sistemática das casas infestadas com inseticidas químicos residuais, a forma mais utilizada de se controlar os vetores da doença (SILVEIRA, 2000), acarretando em outros riscos a saúde humana e animal.

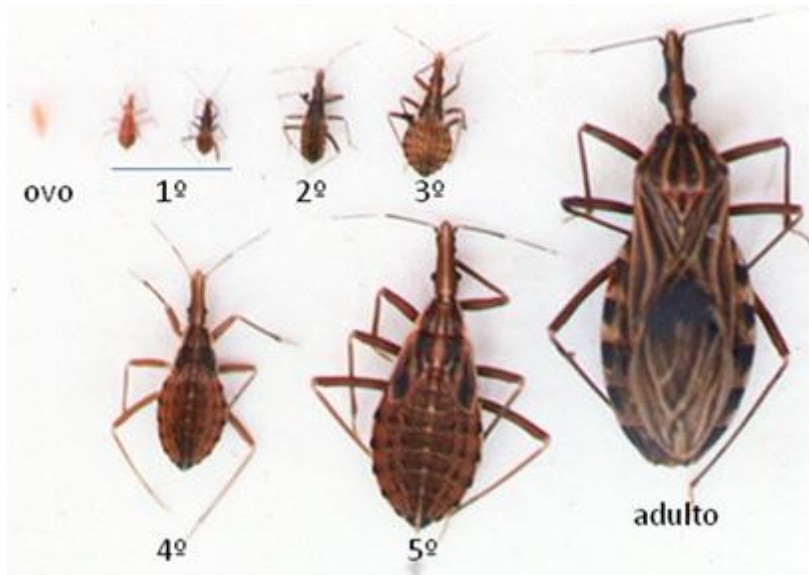


Figura 2: Ovos, ninfas de 1º a 5º instar e adulto de *R. prolixus*. Fonte: <http://rhodnius.iq.ufrj.br/>

2. Objetivos

O objetivo desse trabalho foi selecionar bactérias ambientais para, em associação com o fungo *Metarhizium anisopliae*, otimizar o controle do inseto-praga do algodão *Dysdercus peruvianus*.

2.1 Objetivos específicos

- Analisar possíveis diferenças nos bioensaios entre tratamentos utilizando sobrenadantes e células lavadas dos isolados bacterianos.
- Testar a especificidade dos isolados bacterianos no controle de *D. peruvianus*, utilizando como inseto de comparação, *R. prolixus*.

3. Metodologia

3.1. Isolamento e seleção de bactérias ambientais

Para a obtenção de isolados bacterianos que pudessem auxiliar no processo de biocontrole das pragas-alvo deste estudo, foram utilizados indivíduos de *D. peruvianus* adultos mortos por congelamento, superficialmente desinfetados pela lavagem dos mesmos com solução de hipoclorito de sódio 2,5%, seguido de lavagens com solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,85% e água destilada. Metade da amostra foi inoculada com suspensão de esporos de *M. anisopliae* com concentração de 1×10^8 conídios/mL. Posteriormente os indivíduos envolvidos por uma tela de poro pequeno foram expostos durante trinta (30) em diferentes ambientes e solos (tais como: terra seca, terra úmida, serrapilheira, borda de árvores), nas proximidades do Centro de Biotecnologia da UFRGS, no campus do Vale, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Logo após esse período, as bactérias contidas nas amostras foram isoladas utilizando meio mínimo acrescido de 1% de quitina. As bactérias selecionadas foram mantidas em placas de Petri contendo meio LB sólido, sob refrigeração. Curvas de crescimento foram realizadas para determinar a concentração de UFC/mL de cada isolado bacteriano, a fim de utilizá-los nos bioensaios com a mesma concentração da suspensão de conídios de *M. anisopliae*.

3.2. Identificação dos isolados bacterianos

As bactérias isoladas foram submetidas à identificação através do sequenciamento de um fragmento do gene 23S rRNA. Para tal, uma colônia de cada microrganismo foi retirada da placa de Petri e diluída em água MilliQ estéril. Estas amostras foram fervidas por 10min e centrifugadas por 10min a 6000rpm. O sobrenadante obtido foi utilizado como molde para amplificação por PCR (30 ciclos de 5 min a 94 °C, 45 s a 94 °C, 1 min a 60 °C e 1 min a 72 °C) com os oligonucleotídeos MS37 (5´AGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCA3´) e MS38 (5´CCCGACAAGGAATTTTCGCTACCTTA3´). Os isolados 2AA e 627AA também foram submetidos à identificação através do sequenciamento do gene 16S rRNA. Para tal, seis *primers* foram utilizados: 1- r1492 (TACGGYTACCTTGTTACGACTT), 2- f27 (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG), 3- r1087 (CTCGTTGCGGGACTTAACCC), 4- f945 (GGGCCCCGCACAAGCGGTGG), 5- r518 (ATTACCGCGGCTGCTGG) e 6- f357 (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG). Os produtos de PCR, de aproximadamente 850pb para 23S rRNA e 1500pb para 16S rRNA, foram purificados com o kit GFX (GE) e sequenciados com o *kit Dyenamic ET Dye Terminator cycle* no sistema de análise MegaBace (GE). O programa Staden Package foi utilizado para aferir a qualidade dos cromatogramas, remover sequências contaminantes e para a construção da sequência consenso. Estas sequências foram comparadas com o banco de dados do NCBI usando o programa BLAST. Para construção da árvore filogenética dos isolados 2AA e 627AA, foi utilizado o programa MEGA 4, para Windows.

3.3. Cultivo de *M. anisopliae*

As suspensões de conídios de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, linhagem E6, para uso em bioensaios foram obtidas cultivando o fungo em sacos plásticos transparentes (15x25 cm) contendo 100 gramas de arroz branco tipo 1 adicionado de 30 mL de peptona 0,5%. Os sacos foram então amarrados com cordões e autoclavados por 15 minutos em temperatura de 121 °C. Após, 1 mL de solução de conídios de *M. anisopliae* com concentração de 1×10^6 conídios/mL era inoculada em cada saco, os quais eram então mantidos em estufa à temperatura de 28 °C até a esporulação. A suspensão líquida utilizada nos bioensaios era obtida lavando o arroz contendo o fungo esporulado com água MilliQ estéril. Cada suspensão foi checada quanto a sua possível contaminação através do inóculo de 10 µL da mesma em 3 mL de meio LB líquido (20h, 37 °C). As concentrações das suspensões foram determinadas e ajustadas, se necessário, para chegar a uma concentração de 2×10^8 conídios/mL.

3.4. Confrontos

Para avaliar a compatibilidade de desenvolvimento de *M. anisopliae* com os isolados bacterianos, os mesmos foram co-cultivados em placas de Petri contendo meio BDA (Agar batata dextrose) sólido, sob temperatura de 28°C em estufa por 72 horas e posteriormente avaliadas e fotografadas.

3.5. Bioensaios

Bioensaios foram realizados com os diferentes artrópodes-alvo para avaliar possíveis diferenças no tempo de morte entre as várias combinações de formulações comparadas ao uso isolado de *M. anisopliae* e o controle com água.

3.5.1 - Bioensaios com *D. peruvianus*

Para os bioensaios com *D. Peruvianus* (insetos adultos), os indivíduos foram primeiramente desinfectados superficialmente mergulhando-os em solução de hipoclorito de sódio 2.5% por 30 segundos, lavados em solução salina (NaCl 0,85%) por mais 30 segundos e então lavados em água destilada por mais 30 segundos, gerando assim o grupo controle “água”. Para o preparo das amostras de cultura bacteriana a serem inoculadas, cada isolado foi cultivado por 18h em meio LB líquido a 28 °C com agitação de 180 rpm em tubos de ensaio. A concentração de células foi medida por leitura em espectrofotômetro a 600 nm e, se necessário, ajustada para atingir a concentração de 2×10^8 UFC/mL. Nos tratamentos onde foram utilizados somente células ou somente o sobrenadante dos isolados bacterianos, a cultura líquida foi centrifugada por 5 min em uma rotação de 5000 rpm. Para a célula bacteriana, foi acrescentada solução salina (NaCl 0,85%) estéril para ressuspensão. A concentração final de UFC/ml de casa isolado bacteriano utilizado nos tratamentos foi de 1×10^8 UFC/ml e a concentração final de conídios de *M. anisopliae* para cada tratamento foi de 1×10^8 conídios/ml. Na Tabela 3, é apresentado cada tratameto utilizado nos bioensaios e seus códigos.

Tabela 3 – Tratamentos realizados nos bioensaios e seus respectivos códigos.

Tratamento	Código
Suspensão de esporos de <i>M. anisopliae</i>	Met
Suspensão de esporos de <i>M. anisopliae</i> + cultura bacteriana	Met+Cult
Suspensão de esporos de <i>M. anisopliae</i> + sobrenadante bacteriano	Met+Sobre
Suspensão de esporos de <i>M. anisopliae</i> + célula bacteriana	Met+Cel
Cultura bacteriana	Cult
Sobrenadante bacteriano	Sobre
Célula bacteriana lavada	Cel
Controle com água	Água
Sobrenadante <i>M. anisopliae</i> + sobrenadante bacteriano	Met sobre+sobre

Depois da desinfecção superficial, os indivíduos passaram por 30 segundos de agitação em tubos falcon para cada tratamento específico. Os indivíduos foram mantidos em potes de vidro (previamente esterilizados), com água (destilada estéril) e alimentação (sementes de algodão) disponíveis, em estufa a temperatura de 28 °C, com fotoperíodo de 16 horas claro 8 horas escuro. Durante os bioensaios, os grupos foram checados diariamente para contagem dos indivíduos mortos e cálculo a taxa de sobrevivência. Para cada tratamento foram utilizados 30 indivíduos separados em 3 grupos.

3.5.2 - Bioensaio com *R. prolixus*

Os indivíduos de *R. prolixus*, por não suportarem o processo de desinfecção superficial ao qual foram submetidos os indivíduos de *D. peruvianus*, passaram por processo alternativo de inoculação dos tratamentos. Os insetos foram somente aspergidos com solução de cada tratamento e o controle aspergido somente com água. Posteriormente foram mantidos em potes de vidro (previamente esterilizados), em estufa a 28 °C com fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro. O bioensaio foi dividido entre indivíduos do 4° e 5° instar. Durante o bioensaio, os grupos eram checados diariamente para contagem dos indivíduos mortos e para o cálculo da taxa de sobrevivência.

3.6. Análises estatísticas

Para analisar os bioensaios realizados, foram aplicados o cálculo de tempo letal (LT_{50}) e teste de Tukey utilizando o programa SPSS 13.0 para Windows.

4. Resultados

4.1. Identificação dos isolados bacterianos

No processo de isolamento das bactérias foram obtidos oito (8) isolados. O código de cada isolado, morfologia e o resultado da coloração de Gram de cada isolado esta representado na tabela abaixo.

Tabela 4 – Descrição da morfologia da colônia, coloração de gram, e forma de cada isolado bacteriano obtido no processo de isolamento.

Código do isolado	Descrição da morfologia da colônia	Gram	Forma
10 Cont	forma circular, elevada, brilhante, pigmentação presente, bordo ondulado, translúcido, superfície lisa, consistência mucóide.	Negativo	Cocos
10A	forma irregular, elevada, opaco, pigmentação presente, bordo lobado, opaco, superfície rugosa, consistência quebradiça.	Positivo	Bacilos
10B	forma circular, elevada, brilhante, pigmentação presente, bordo liso, translúcido, superfície lisa, consistência mucóide.	Negativo	Cocos
1A	forma circular, elevada, brilhante, pigmentação presente, bordo liso, translúcido, superfície lisa, consistência mucóide.	Negativo	Cocos
2AA	forma circular, elevada, brilhante, pigmentação presente, bordo liso, translúcido, superfície lisa, consistência mucóide.	Negativo	Bacilos
627AA	forma circular, elevada, brilhante, pigmentação presente, bordo liso, translúcido, superfície lisa, consistência mucóide.	Negativo	Bacilos
627B	forma circular, elevada, brilhante, pigmentação presente, bordo ondulado, translúcido, superfície lisa, consistência mucóide.	Negativo	Cocos
7B	forma circular, elevada, brilhante, pigmentação presente, bordo ondulado, translúcido, superfície lisa, consistência mucóide.	Negativo	Cocos

Após a descrição morfológica e determinação da coloração de Gram dos diferentes isolados foi procedida a identificação molecular dos mesmos através da amplificação e sequenciamento do gene 23 S rRNA (Figura 3, Tabela 5).

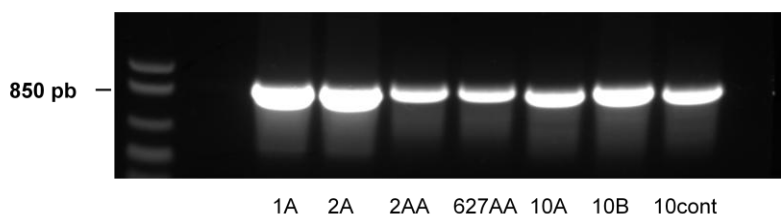


Figura 3: Amplificação por PCR do gene 23S rRNA dos isolados bacterianos.

Tabela 5: Identificação dos isolados bacterianos pela comparação das sequências do gene 23S rRNA comparadas com o banco de dados do NCBI e suas respectivas identidades.

Isolado	Identificação	Identidade
1 A	<i>Alcaligenes faecalis</i>	97%
627AA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	97%
10 B	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	96%
2 AA	<i>P. fluorescens</i>	98%
10 A	<i>Bacillus cereus</i>	97%
10 Cont	<i>Enterococcus flavescens</i>	97%
7 B	Não Determinado	-----
627B	Não Determinado	-----

Além disso, os dois isolados mais promissores em termos de controle associado com *M. anisopliae* do inseto *D. peruvianus*, 627AA e 2AA identificados como *P. fluorescens*, também foram molecularmente identificados e diferenciados através da amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA (Tabela 6).

Pelas análises das seqüências correspondentes ao gene 16S rRNA, os isolados 2AA e 627AA possuem diferenças que confirmam ser dois isolados diferentes, como evidenciado na representação da árvore filogenética (Figura 4).

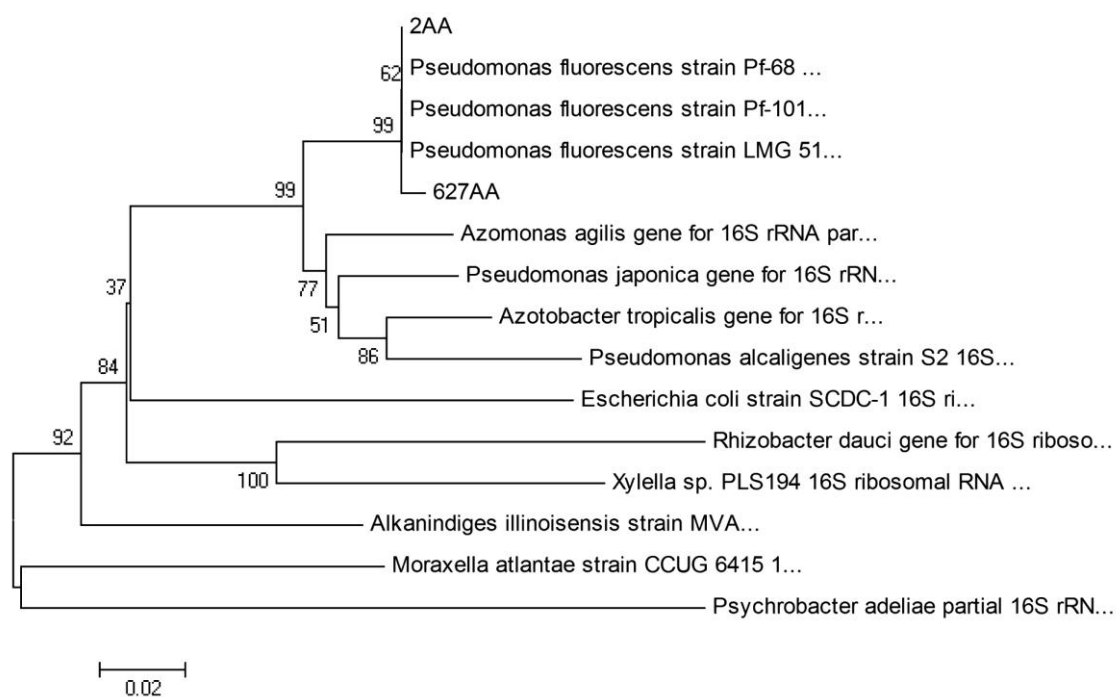


Figura 4: Árvore filogenética mostrando os isolados 2AA e 627AA em comparação com outras cepas de *P. fluorescens*, bem como outras espécies mais distantes filogeneticamente.

Tabela 6: Identificação dos isolados bacterianos pela comparação das seqüências do gene 16S rRNA comparadas com o banco de dados do NCBI e suas respectivas identidades.

ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO	IDENTIDADE %
627AA	<i>P. fluorescens</i>	99%
2AA	<i>P. fluorescens</i>	99%

4.2 Confrontos

Analisando os confrontos em co-cultura entre os isolados bacterianos e colônias do fungo *M. anisopliae*, pode-se verificar um baixo nível de inibição do crescimento das colônias do fungo frente aos isolados 2AA e 627AA e nenhuma inibição frente aos demais isolados (Figura 5). O desenvolvimento dos isolados bacterianos foi normal, não havendo inibição em nenhum caso. Portanto, o co-cultivo do fungo é compatível com todos os isolados analisados.

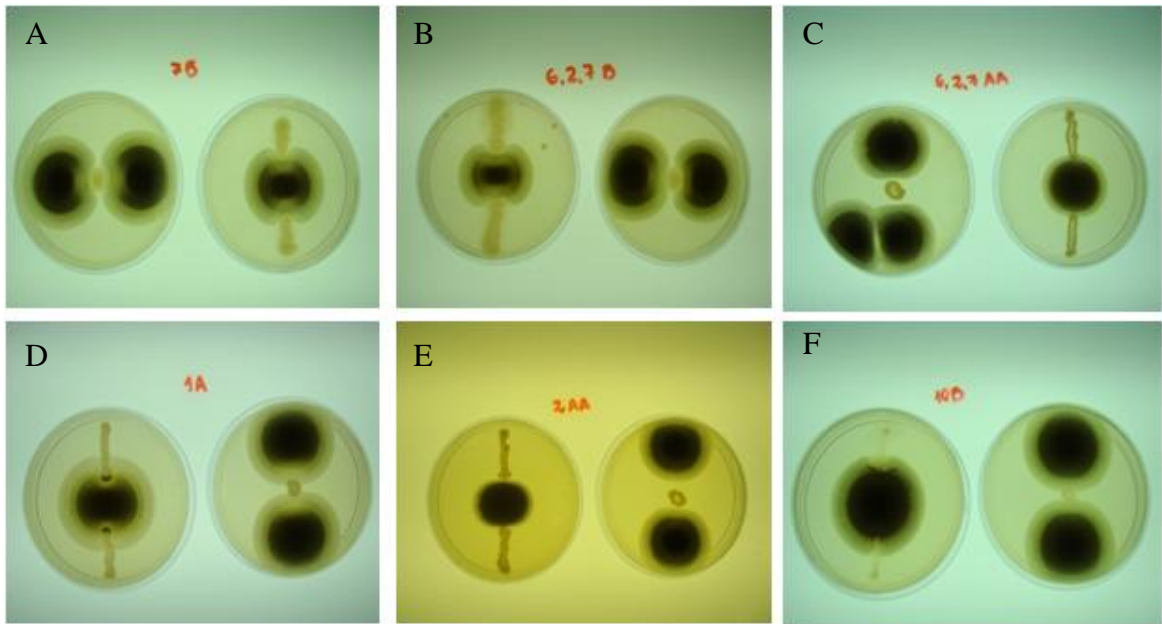


Figura 5: Fotografias dos confrontos, utilizando meio BDA, entre os isolados bacterianos (A: 7B; B: 627B; C: 627AA; D: 1A; E: 2AA e F:10B) e colônias do fungo *M. anisopliae*.

4.3 Bioensaios

A seguir serão apresentados os gráficos dos diversos bioensaios realizados durante o desenvolvimento desse trabalho.

4.3.1 Bioensaios com *D. peruvianus*

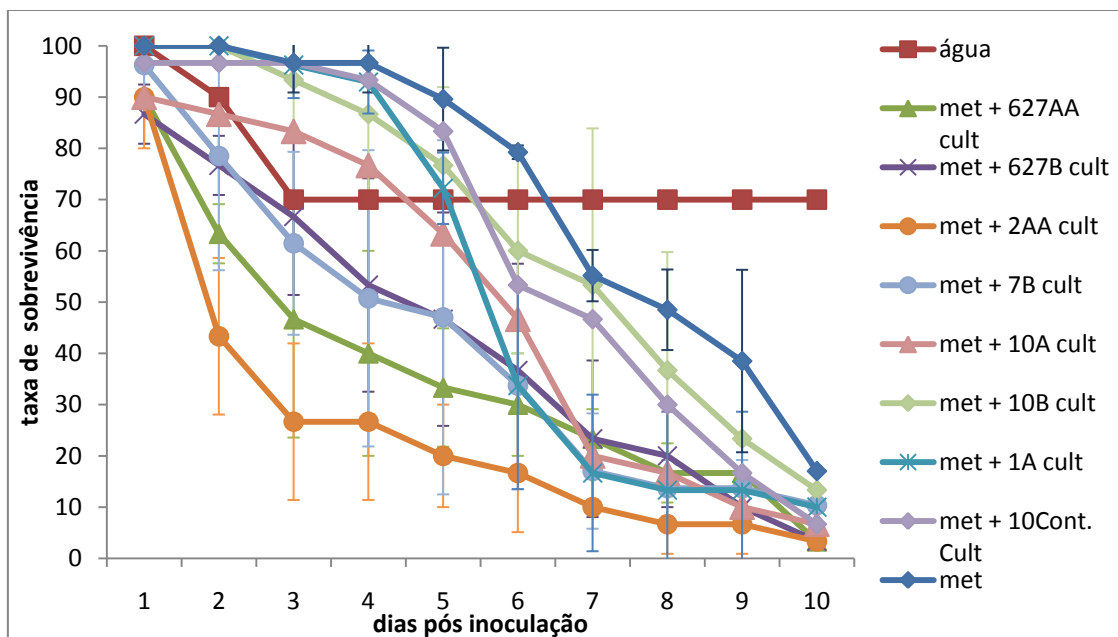


Figura 6: Curva de sobrevivência de *D. peruvianus* infectado com *M. anisopliae* (10^8 esporos/mL) (met) e *M. anisopliae* associado aos diferentes isolados bacterianos em cultura total.

Tabela 7: Tempo letal (LT_{50}) do bioensaio mostrado na figura 4 utilizando diferentes isolados bacterianos associados a *M. anisopliae*.

ISOLADO	LT_{50}
1A	6,04
627AA	3,74
10B	7,04
2AA	2,33
10A	5,48
10 Conti.	6,73
7B	4,63
627B	4,59
<i>M. anisopliae</i>	7,54

Analisando o gráfico da Figura 6 e a Tabela 7 do TL50, podemos verificar que os melhores desempenhos foram obtidos pelos isolados identificados como *P. fluorescens*, 2AA e 627AA, com redução de 70% e 51%, respectivamente, e pelos isolados 7B e 627B, com redução de 39% e 40%, respectivamente, do TL50 em comparação com o controle tratado somente com *M. anisopliae*.

Observando o mesmo gráfico da Figura 6 até 5 dias pós-tratamentos, e aplicando o teste de Tukey (alfa: 0,05), podemos diferenciar estatisticamente os isolados 2AA, 627AA, 7B e 627B dos demais, como demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8: Análise, através do teste de Tukey (alfa:0,05), dos tratamentos utilizados no bioensaio mostrado na Figura 6, agora analisado até o quinto dia pós-tratamentos. A,B,C representam os grupos estatisticamente diferenciados.

Tratamento	Grupos estatísticos
Met	A
Met + 10Cont. Cult	A
Met + 10B cult	A
Água	AB
Met + 10A cult	AB
Met + 1A cult	AB
Met + 7B cult	ABC
Met + 627B cult	ABC
Met + 627AA cult	BC
Met + 2AA cult	C

A partir desse momento, os experimentos foram restringidos aos isolados que obtiveram os melhores resultados: 2AA, 627AA, 627B e 7B.

Nos bioensaios subseqüentes, mais dois tratamentos foram adicionados aos anteriores: *M. anisopliae* adicionado do sobrenadante de cultura bacteriana de cada isolado (met + X sobre) e *M. anisopliae* adicionado das células lavadas da cultura bacteriana de cada isolado (met + X cel).

Na série de gráficos mostrados a seguir, será apresentado o mesmo bioensaio separado em 4 gráficos diferentes correspondentes a cada isolado bacteriano testado (figuras 7,8,9 e 10) a fim de uma melhor apresentação e interpretação dos resultados.

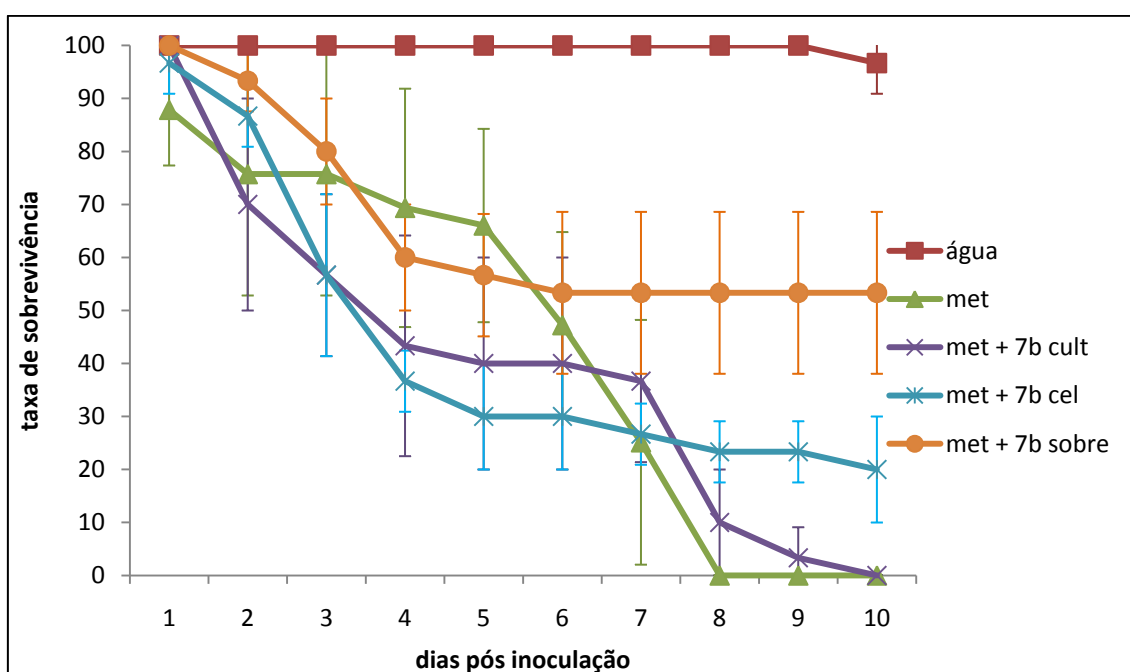


Figura 7: Curva de sobrevivência de *D. peruvianus* frente a diferentes tratamentos utilizando o isolado 7B e o fungo *M. Anisopliae*.

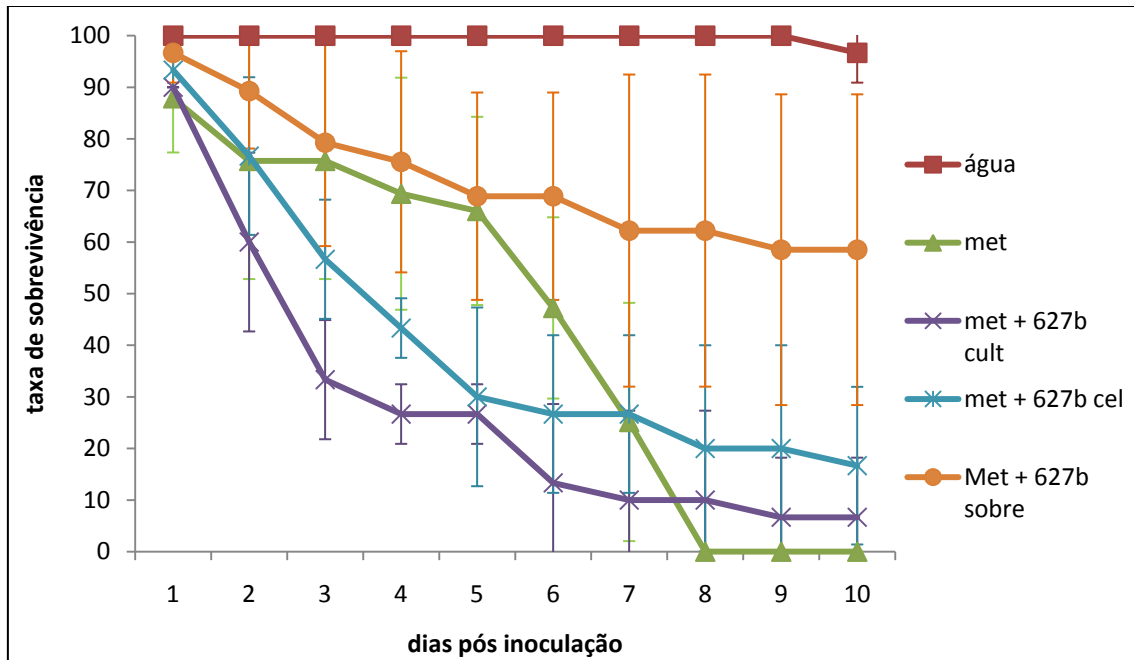


Figura 8: Curva de sobrevivência de *D. peruvianus* frente a diferentes tratamentos utilizando o isolado 627B e o fungo *M. Anisopliae*.

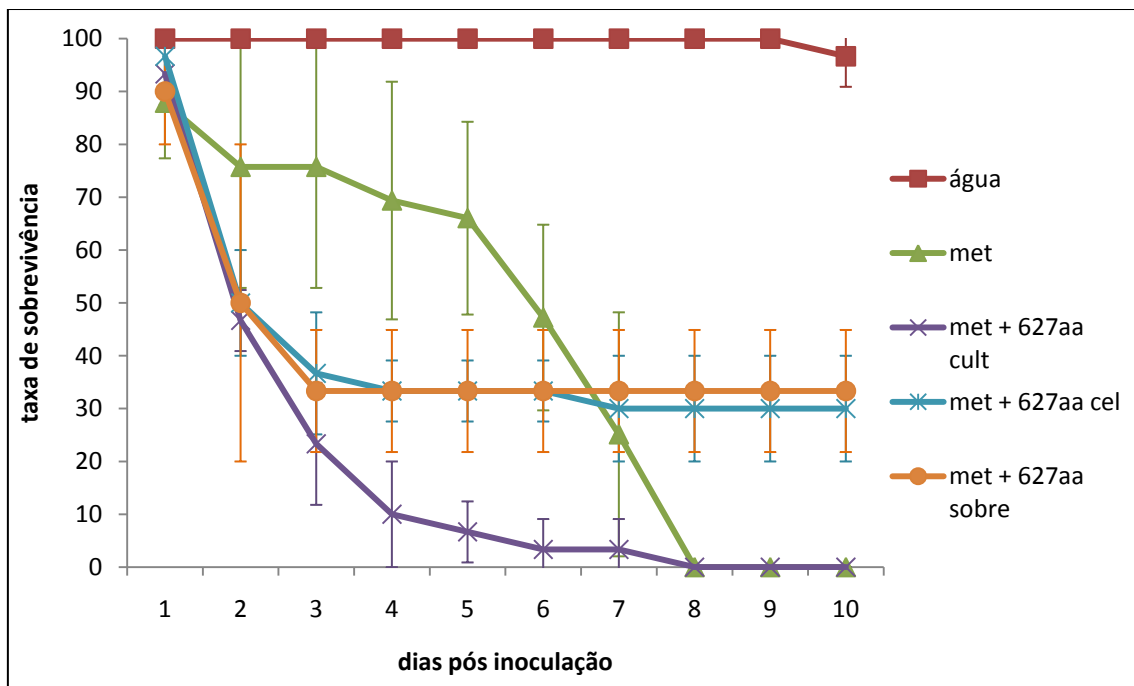


Figura 9: Curva de sobrevivência de *D. peruvianus* frente a diferentes tratamentos utilizando o isolado 627AA e o fungo *M. Anisopliae*.

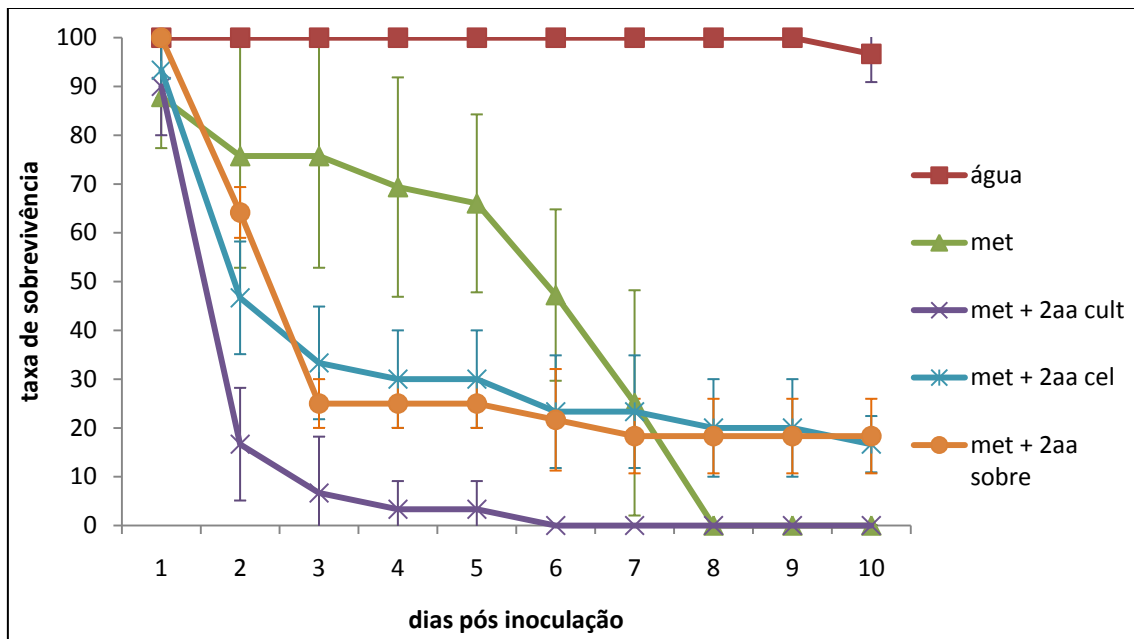


Figura 10: Curva de sobrevivência de *D. peruvianus* frente a diferentes tratamentos utilizando o isolado 2AA e o fungo *M. Anisopliae*.

Analisando os gráficos acima, podemos perceber que os melhores resultados ainda são obtidos com a combinação *M. anisopliae* adicionada da cultura total de cada isolado bacteriano. Também podemos verificar que o sobrenadante dos isolados 7B e 627B não produziram o mesmo efeito das células lavadas dos mesmos isolados. O mesmo não ocorre com os isolados de *P. fluorescens* 2AA e 627AA, onde tanto o sobrenadante como as células lavadas, apresentaram praticamente o mesmo efeito na mortalidade dos indivíduos de *D. peruvianus*.

Para melhor verificar o potencial inseticida dos isolados de *P. fluorescens* 2AA e 627AA, além dos tratamentos anteriormente utilizados, mais 4 tratamentos foram administrados, agora sem a presença de *M. anisopliae*, nos bioensaios mostrados a seguir: cultura bacteriana total (Cult), sobrenadante bacteriano (sobre), células lavadas do isolado (cel) e

sobrenadante de *M. anisopliae* adicionado de sobrenadante bacteriano (met sobre + x sobre).

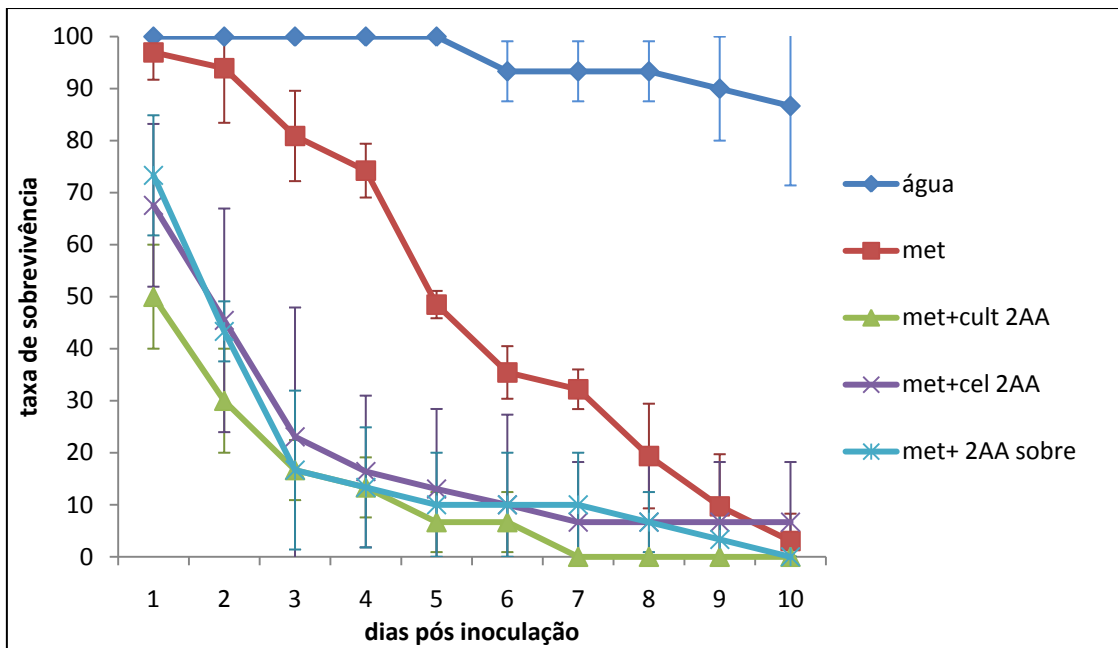


Figura 11: Curva de sobrevivência de *D. peruvianus* frente a diferentes tratamentos com a presença de *M. anisopliae* e o isolado 2AA em suas variações.

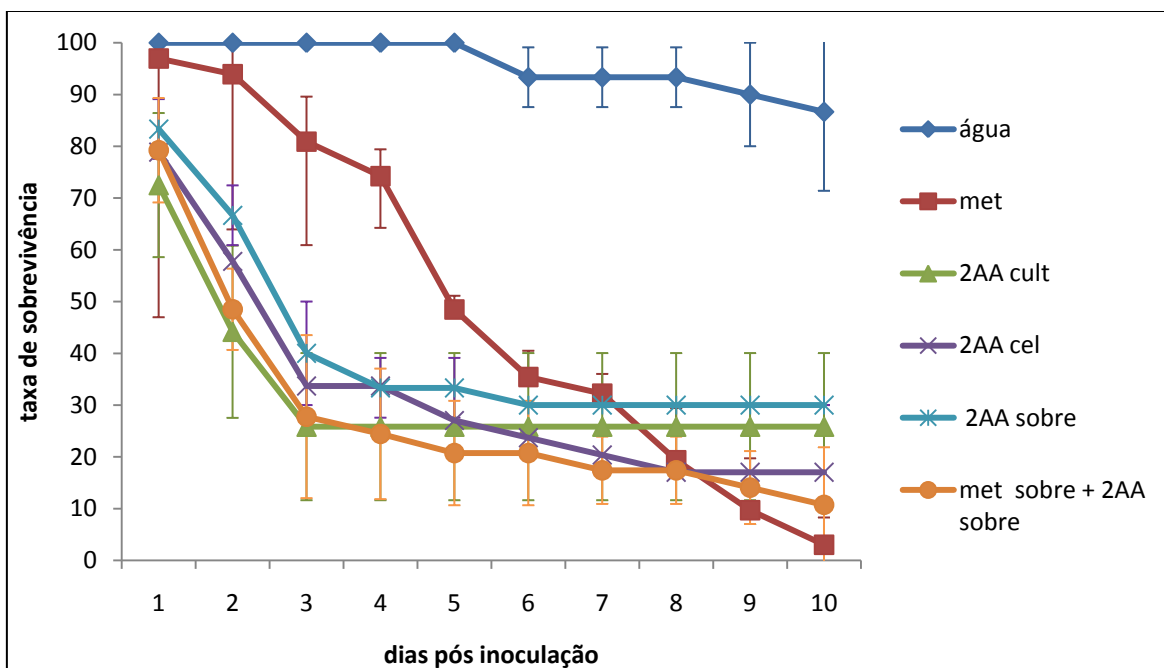


Figura 12: Curva de sobrevivência de *D. peruvianus* frente a diferentes tratamentos do isolado 2AA em suas variações sem a adição de *M. anisopliae*

Podemos verificar pela análise dos gráficos, que ocorre uma grande mortalidade no início do experimento (até 3 dias pós-inóculo), nos tratamentos apenas com as variações do isolado de *P. fluorescens* 2AA (figura 12), e uma posterior estagnação. O mesmo não ocorre no experimento com a presença de *M. anisopliae* (figura 11), onde a taxa de sobrevivência continua caindo mesmo após esse período.

Como mostrado na tabela 9, o melhor resultado de aceleração no LT_{50} do bioensaio apresentado nas figuras 11 e 12, ainda é obtido pela combinação de *M. anisopliae* adicionado da cultura total bacteriana, com uma redução de 96% quando comparado ao controle com *M. anisopliae*.

Tabela 9: LT_{50} do bioensaio mostrado nas Figuras 11 e 12, de diferentes tratamentos utilizando o isolado 2AA.

Tratamentos 2AA	LT_{50}
met	5,44
met + cult	0,236
met + cel	1,22
met + sobre	1,39
cult	0,76
cel	2,57
sobre	3,57
sobre met+ sobre 2AA	2,23
água	14,39

Como veremos a seguir, o mesmo padrão de mortalidade acontece com o outro isolado de *P. fluorescens* 627AA, num bioensaio utilizando as mesmas condições e tratamentos.

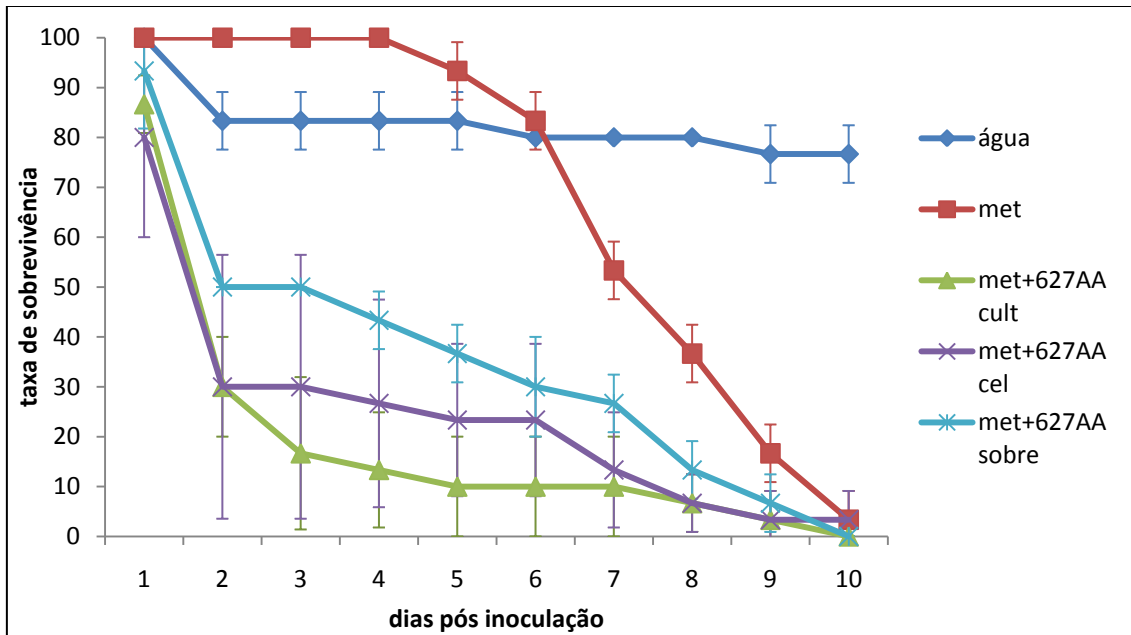


Figura 13: Curva de sobrevivência de *D. peruvianus* frente a diferentes tratamentos com a adição de *M. anisopliae* e o isolado 627AA em suas variações.

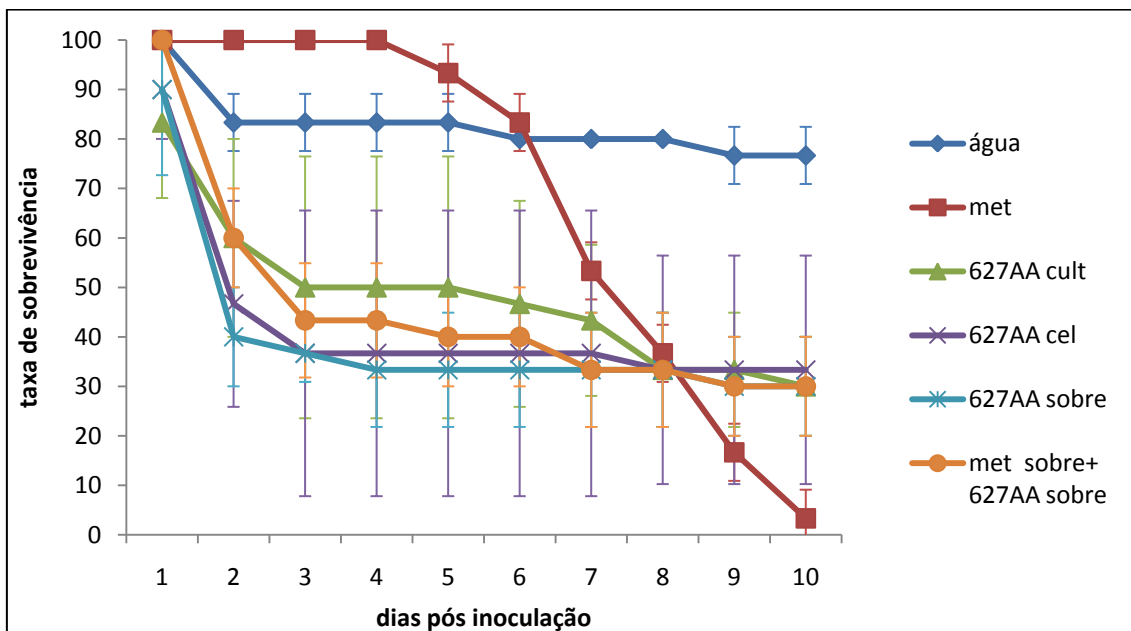


Figura 14: Curva de sobrevivência de *D. peruvianus* frente a diferentes tratamentos com o isolado 627AA em suas variações, mas agora sem a adição de *M. anisopliae*

Como anteriormente, ocorreu uma grande mortalidade no início do experimento (até 3 dias pós inóculo) e posterior estagnação da taxa de sobrevivência. Este fato não ocorre quando *M. anisopliae* é adicionado aos tratamentos, onde notamos uma queda na taxa de sobrevivência após o período inicial.

Novamente, o melhor resultado de LT_{50} para o bioensaio mostrado nas Figuras 13 e 14, ocorreu na combinação *M. anisopliae* adicionado da cultura total bacteriana do isolado 627AA, proporcionando uma redução de 80% quando em comparação ao controle apenas com *M. anisopliae*.

Tabela 10: LT_{50} do bioensaio mostrado nas figuras 13 e 14, de diferentes tratamentos utilizando o isolado 627AA.

Tratamentos 627AA	LT_{50}
met	7,38
met + cult	1,48
met + cel	1,85
met + sobre	3,66
cult	5,07
cel	2,15
sobre	3,46
sobre met+ sobre 2AA	4,67
água	19,1

4.3.2 Bioensaios com *R. prolixus*.

Para avaliar a especificidade do melhor isolado bacteriano de *P. fluorescens*, 2AA, que apresentou o melhor resultado nos experimentos com *D.*

peruvianus, novos testes foram realizados utilizando-se uma espécie de barbeiro (*R. prolixus*), como mostrado nas figuras a seguir.

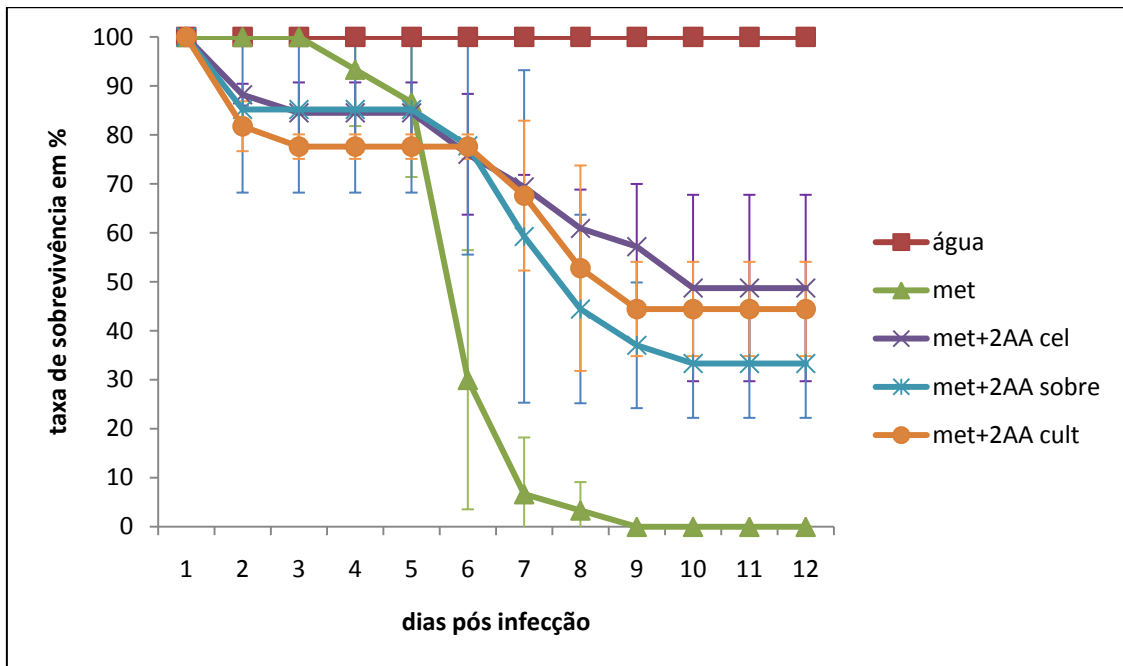


Figura 15: Curva de sobrevivência utilizando ninfas de 4º instar de *R. prolixus* e diferentes tratamentos com *M anisopliae* e o isolado 2AA.

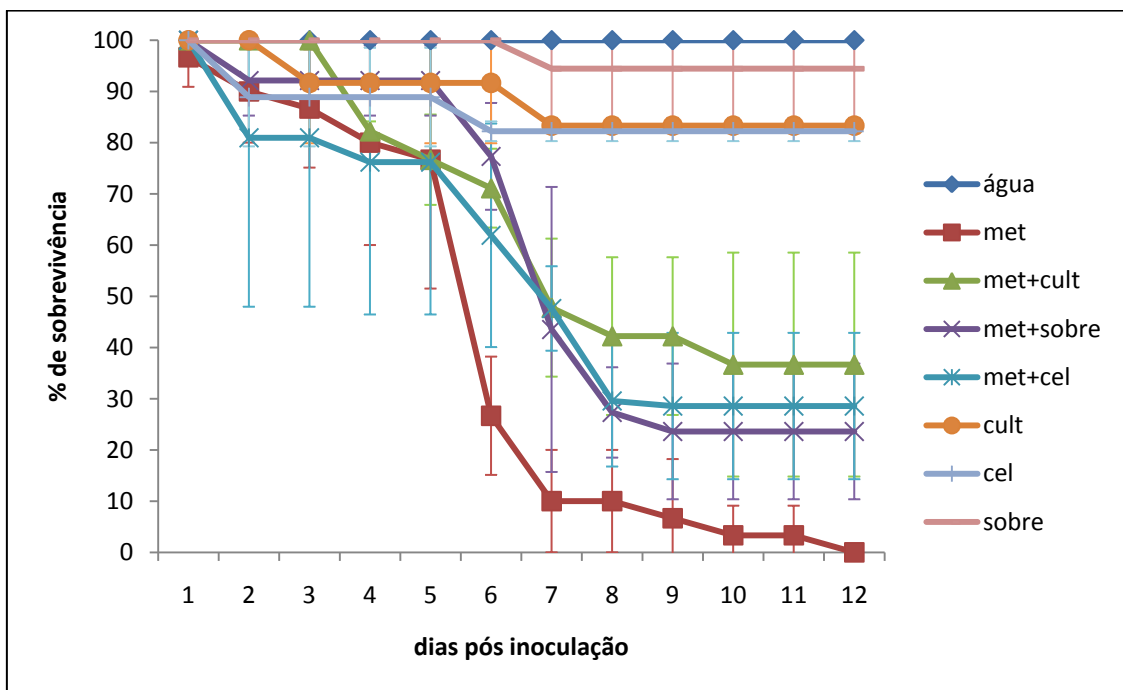


Figura 16: Curva de sobrevivência utilizando ninfas de 5º instar de *R. prolixus* e diferentes tratamentos com *M anisopliae* e o isolado 2AA.

Podemos notar pelos gráficos (Figuras 15 e 16), que o isolado 2AA não auxiliou na mortalidade dos indivíduos de *R. prolixus*, tanto de 4º como 5º instar, diferentemente do que ocorreu no bioensaio com *D. peruvianus*.

5. Discussão

As vantagens e limitações do controle biológico são frequentemente expressas por meio de comparações com pesticidas. Assim, predadores e parasitóides são organismos que ocorrem naturalmente, e normalmente são bastante específicos em sua faixa predatória. É pouco provável que a resistência irá se desenvolver em relação a um agente de biocontrole e, em muitos casos, o controle pode perpetuar-se durante longos períodos de tempo. Os argumentos contra os pesticidas químicos são principalmente sua falta de especificidade, não matando somente o organismo alvo, mas também inimigos naturais do mesmo, podendo aumentar seu status de praga. Além disso, o controle químico é limitado à área em que o agrotóxico é aplicado e aplicações freqüentes podem ser necessárias, fator envolvido com a geração de resistência.

A principal limitação do controle biológico é ser mais lento para suprimir populações de pragas comparado a maioria dos pesticidas. Organismos parasitados podem, muitas vezes, levar vários dias para morrer, assim como predadores necessitam de certo período de tempo para estabelecer um nível considerável de supressão de pragas. Os custos de desenvolvimento de estratégias de controle biológico são, por vezes, descritos como elevados, mas estes custos são muito inferiores ao equivalente para a síntese, a avaliação toxicológica e comercialização de um novo pesticida (BALE *et al.* 2007).

Existem outras limitações relatadas do controle biológico, em que a aplicação de pesticidas parece ser mais vantajosa; porém, a evidência para esta conclusão é limitada ou ausente (VAN LENTEREN *et al.* 1993). Por exemplo, o fato de que o controle biológico "regula", enquanto os pesticidas "erradicam" é visto como uma desvantagem, mas este é um argumento falso. No controle biológico, as populações de pragas não são, normalmente, erradicadas, mas mantidas em densidades muito baixas. A supressão gradual e a longo prazo da espécie praga é a meta desejável (BALE *et al.* 2007).

Neste contexto, esse trabalho visa apresentar uma nova abordagem no controle biológico de *D. peruvianus* associando o fungo *M. anisopliae* e bactérias ambientais, otimizando o controle e mantendo a especificidade.

A eficácia de *M. anisopliae* no controle biológico de *D. peruvianus* já foi relatada (LUBECK *et al.* 2008). Os mecanismos moleculares envolvidos no processo de infecção do hospedeiro vêm sendo estudados e reportados (SILVA *et al.* 2010a, SANTI *et al.* 2009a e 2010, BROETTO *et al.* 2010, BOLDO *et al.* 2010, SCHRANK e VAINSTEIN, 2010), inclusive relacionado com a infecção de *D. peruvianus* (SANTI *et al.* 2010). A secreção de proteases e quitinases (SANTI *et al.* 2010), bem como de lipases (SILVA *et al.* 2010b) e destruxinas (SCHRANK e VAINSTEIN, 2010) parecem ter papel fundamental no processo de colonização do hospedeiro. Pelo fato da quitina ser um importante componente do exoesqueleto de artrópodes, seu reconhecimento e assimilação é uma característica bastante previsível num agente biocontrolador desses organismos. Portanto, a quitina foi escolhida como componente seletivo no processo de isolamento das bactérias ambientais deste trabalho, somado a necessidade de se restringir o número de isolados obtidos por fins práticos.

Além disso, a opção por obter as bactérias ambientais através da exposição de indivíduos mortos de *D. peruvianus* se deve pela busca da maior especificidade possível do agente biocontrolador por este organismo.

Pelos resultados obtidos nos bioensaios, utilizando as bactérias selecionadas associadas ao fungo, podemos observar que os isolados 627B, 7B e os dois isolados identificados como *P. fluorescens*, 627AA e 2AA, foram os mais efetivos na diminuição do tempo de morte dos indivíduos de *D. Peruvianus*. Pelo padrão observado nas curvas de sobrevivência mostradas nas Figuras 7, 8, 9 e 10, podemos inferir que os isolados 2AA e 627AA, provavelmente secretam algum tipo de molécula tóxica com potencial ação inseticida em seu sobrenadante. Este fato condiz com pesquisas de SADANANDANE *et al.* (2003), PRABAKARAN *et al.* (2002) e PADMANABHAN *et al.* (2004), que descrevem toxinas no sobrenadante dessa bactéria com eficácia na mortalidade de larvas e pupas dos mosquitos *Anopheles stephensi* Liston, *Culex quinquefasciatus* Say e *Aedes aegypti* e também contra mosca doméstica *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). De qualquer maneira, os mecanismos de ação destas toxinas de *P. fluorescens* ainda não foram esclarecidos. Para os isolados 7B e 627B, parece não haver efeito de seus sobrenadantes sobre a mortalidade dos indivíduos, o que pode estar relacionado com a atividade menos pronunciada destes em relação aos isolados 2AA e 627AA.

A alta taxa de mortalidade no início dos bioensaios com os isolados 2AA e 627AA pode ser atribuída a atuação direta da bactéria sobre o hospedeiro, bem como evidencia a possível secreção de toxinas com potencial inseticida pelas mesmas. A presença destes componentes no sobrenadante de cultura,

associados a uma contínua produção dos mesmos pelas células bacterianas, pode ser a explicação dos melhores resultados obtidos pela combinação de cultura total bacteriana quando comparada aos demais tratamentos (célula ou sobrenadante isolados). Como demonstrado na Figura 4, os isolados de *P. fluorescens* 2AA e 627AA, apesar de serem da mesma espécie, apresentam diferenças significativas na sequência corresponde ao gene 16S rRNA, tratando-se claramente de dois diferentes isolados. Este fato é reforçado pelos resultados obtidos nos bioensaios, onde o isolado 2AA sempre se mostrou mais eficaz.

A penetração do fungo *M. anisopliae* no hospedeiro ocorre por uma combinação de pressão mecânica e degradação enzimática (LEGER *et al.* 1986; ARRUDA *et al.* 2005) e a ação de possíveis toxinas bacterianas ou enzimas podem, sinergicamente com as enzimas secretadas pelo fungo, aumentar a efetividade do biocontrole. Além disso, uma diferenciação da expressão de genes relacionados ao biocontrole, em ambas as espécies, pode estar ocorrendo, como demonstrou LUTZ *et al.* (2004) para o modelo entre a bactéria *P. fluorescens* e o fungo *T. atroviride*, no controle de doenças fúngicas.

P. fluorescens é uma bactéria ambiental bastante comum em rizosfera de plantas, e tem atuação na proteção de vegetais contra doenças causadas por fungos fitopatógenos (LAVILLE *et al.* 1992). Porém, como demonstrado nos confrontos realizados entre os isolados bacterianos e colônias de *M. anisopliae*, não houve inibição significativa no desenvolvimento do fungo quando em cocultura com os isolados bacterianos 2AA e 627AA.

Em relação aos bioensaios realizados com *R. prolixus*, o isolado 2AA não apresentou eficiência na diminuição do tempo de morte do inseto

associado ao *M. anisopliae*. Diferenças na composição estrutural entre os dois hemípteros podem estar relacionadas com a efetividade seletiva de *P. fluorescens* sobre os organismos. Porém, essa ineficácia relativa vem ao encontro de uma das mais importantes premissas do controle biológico, que é a alta especificidade em relação ao controle do hospedeiro alvo, no caso, o *D. peruvianus*.

Esse trabalho demonstrou uma efetiva associação entre *M. anisopliae* e *P. fluorescens* no controle biológico *in vitro* de *D. peruvianus*. A diminuição significativa do tempo de morte dos indivíduos de *D. peruvianus* tratados com esses isolados associados ao fungo foi significativa, com redução média de 74%, e máxima de 96%. Isto demonstra que é possível, através de novas e simples abordagens, otimizar e acelerar o biocontrole de pragas. Este fato contribui para justificar ainda mais o estudo e a aplicação de estratégias de controle biológico em substituição ao uso de inseticidas químicos convencionais, sem os prejuízos e custos econômicos e ambientais inerentes ao seu uso. A continuação dos estudos de interação entre agentes biocontroladores e seus alvos com o intuito de obter uma eficiência elevada em seu controle é de fundamental importância para um futuro sustentável da produção de alimentos e insumos agrícolas na sociedade atual.

Como perspectivas deste trabalho, pretendemos elucidar os mecanismos moleculares da associação *M. anisopliae*-*P. fluorescens* envolvidos no sucesso do biocontrole de *D. peruvianus*. Para tanto, a visualização microscópica da interação e do efeito da mesma sobre o inseto e o isolamento e identificação dos componentes tóxicos secretados pela bactéria serão algumas das próximas etapas deste trabalho.

6. Conclusões

- Os isolados 7B e 627B e os isolados de *P. fluorescens* 627AA e 2AA efetivamente diminuem o tempo de morte de *D. peruvianus* quando em associação com *M. anisopliae*, comparados ao fungo isoladamente.

- A cultura bactéria total (células e sobrenadante) dos isolados 2AA e 627AA associada aos esporos de *M. anisopliae* é o tratamento mais efetivo na redução do tempo de morte de *D. peruvianus*.

- Os isolados de *P. fluorescens*, 627AA e 2AA secretam alguns tipos de moléculas tóxicas com potencial inseticida em seu sobrenadante.

- O isolado de *P. fluorescens* 2AA não foi eficaz na diminuição do tempo de morte de *R. prolixus*, sendo específico no controle de *D. peruvianus*.

7. REFERÊNCIAS

AJAYBIO (2010). <http://ajaybio.in/prodbiostop.htm>. 13 de outubro.

ALVES SB. (1998). Controle microbiano de insetos. Ed. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2a ed., [Piracicaba](#).

ARRUDA W. (2005). Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus*. Tese de Doutorado. Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [Porto Alegre](#).

- BALE JS, VAN LENTEREN JC, BIGLER F. (2008) Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transaction The Royal Society B*. 363: 761-776.
- BATTA YA, 2003. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Crop Protection*. 22: 415–422.
- BIOTROPIC. (2010). <http://www.biotropic.com.mx/productos.htm#>. 13 de outubro.
- BOLDO JT, AMARAL KB, JUNGES A, PINTO PM, STAATS CC, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. (2010) Evidence of alternative splicing of the chi2 chitinase gene from *Metarhizium anisopliae*. *Gene*. 462:1-7.
- BROETTO L, DA SILVA WO, BAILÃO AM, DE ALMEIDA SOARES C, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. (2010) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: cell-surface localization and role in host adhesion. *FEMS microbiology letters*. 312(2):101-9.
- BTHEK. (2010). <http://www.bthek.com.br/produtos.html>. 13 de outubro.
- CONAB.(2010).http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos_09.12.pdf. 13 de outubro.
- CONTROL BIOLÓGICO (2010). <http://www.controlbiologico.com/productos.htm>. 13 de outubro.
- DONG C, ZHANG J, HUANG H, CHEN W, HU Y. (2007). Pathogenicity of a new China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) to subterranean termite *Odontotermes formosanus*. *Microbiological Research*, 162: 53-61.
- DRIVER F, MILNER RJ, TRUEMAN JWH. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*. 104: 134-150.
- EDWARDS JS. (1998). Sir Vincent Wigglesworth and the coming of age of insect development. *International Journal of Developmental Biology*. 42 (3): 471–3.

- FARENHORST M, FARINA D, SCHOLTE EJ, TAKKEN W, HUNT RH, COETZEE M, KNOLS BG. (2008). African water storage pots for the delivery of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to the malaria vectors *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles funestus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 78: 910-916.
- FARIA MR, WRAIGHT SP. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*. 43: 237-256.
- FERNANDEZ FB. (2000). The employment of biological and non-chemical alternatives for insect plague control in sugarcane crops in Costa Rica. *International Sugar Journal*. 102: 482-490.
- FRAZZON APG, VAZ Jr. IVS, MASUDA A, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. (2000). In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 93: 117-125.
- GOETTEL MS, HAJEK AE, WAJNBERG E, SCOTT JK, QUIMBY PC. (2000). Evaluation of non-target effects of pathogens used for management of arthropods. *Evaluating Indirect Ecological Effects of Biological Control*. CABI Publishing, Wallingford:81-97.
- GONÇALVES L. (2000) Biologia e comportamento de *Dysdercus ruficollis* (linnaeus, 1764) (hemiptera: pyrrhocoridae) em condições de laboratório. *Floresta e Ambiente*, 7(1): 68-79.
- GRIMM C. (2001). Economic feasibility of small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. *Crop Protection*. 20: 623–630.
- GRONVOLD J, HENRIKSEN SA, LARSEN M, NANSEN P, WOLSTRUP, J. (1996). Biological control. Aspects of biological control – with special reference to arthropods, protozoans and helminthes of domesticated animals. *Veterinary Parasitology*. 64: 47-64.
- HOWART FG. (1996). Environmental impacts of classical biological control. *Annual Review in Entomology*. 36: 485-509.
- JENKINS NE. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycospesticides. *Biocontrol News and Information* 19: 21–31.
- JUAREZ MP, CRESPO R., FERNANDEZ GC, LEUCONA R, CAFFERATA LF. (2000). Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to

Triatoma infestans, a chagas disease vector. Journal of Invertebrate Pathology. 76: 198-207.

KAAYA GP, MUNYINI DM. (1995). Biocontrol potential of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. Journal of Invertebrate Pathology. 66: 237-241.

KAAYA GP, MWANGI EN, OUNA EA. (1996). Prospects for biological control of livestock tick *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous for *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology. 67: 15-20.

KANGA LH, JONES WA, JAMES RR. (2003). Field trials using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies. Journal of Economic Entomology. 96: 1091-9.

LAVILLE J, VOISARD C, KEEL C, MAURHOFER M, DEFAGO G, HAAS D. (1992). Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences. 89: 1562-1566.

LAZZARINI GMJ, ROCHA LFN, LUZ C. (2006). Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. Mycological Research. 110: 485-492.

LIU H, SKINNER M, PARKER BL, BROWNBRIDGE M. (2002). Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), and other entomopathogenic fungi against *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). Journal of Economic Entomology. 95: 675-681.

LIU ZY, LIANG ZQ, WHALLEY AJ, YAO YJ, LIU AY. (2001). Cordyceps brittlebankisoides, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. Journal of Invertebrate Pathology. 78: 178-182.

LUBECK I, ARRUDA W, SOUZA BK, STANISÇUASKI F, CARLINI CR, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. (2008). Evaluation of *Metarhizium anisopliae* Rhipicephalus (Boophilus) microplus *Dysdercus peruvianus*. Fungal Ecology 1: 78-88

- LUTZ MP, WENGER S, MAURHOFER M, DÉFAGO G, DUFFY B. (2004). Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture. *FEMS Microbiology Ecology*.48: 447-455.
- MARANINNO P, SANTIAGO-ÁLVAREZ C, LILLO E, QUESADA-MORAGA E. (2006) A new bioassay method reveals pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against early stages of *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 93: 210-213.
- MARQUES EJ, VILLAS-BOAS AM, PEREIRA CEF. (1981). Orientações técnicas para a produção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Em laboratórios setoriais. Planalsucar, Boletim técnico n.3. 5-23.
- McCOY CW, TIGANO-MILANI, MS. (1992). Use of entomopathogenic fungi in biological control: a world view. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 27: 87-93. Edição especial.
- MEGA 4 (2010). <http://megasoftware.net/> 12 de novembro.
- MELO IS, AZEVEDO JL. (1998). Controle Biológico, volume I. Ed. EMBRAPA, 262p.
- MILANO P, CÔNSOLI FL, ZÉRIO NG, PARRA JRP. (1999). Ecologia, Comportamento e bionomia - Exigências Térmicas de *Dysdercus peruvianus* Guérin-Méneville (Heteroptera: Pyrrhocoridae), o Percevejo Manchador do Algodoeiro. *Annual Society of Entomology, Brasil* 28(2).
- NATURAL RURAL (2010). <http://www.naturalrural.com.br/> 13 de outubro.
- PADMANABHAN V, PRABAKARAN G, PAILY KP, BALARAMAN K. (2005). Toxicity of a mosquitocidal metabolite of *Pseudomonas fluorescens* on larvae & pupae of the house fly, *Musca domestica*. *The Indian Journal of Medical Research*. 121: 116-119.
- PELL JK, EILENBERG J, HAJEK AE, STEINKRAUS DS. (2001). Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. Apud Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (eds.). *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CAB International, Wallingford. 71.154.
- POLAR P, KAIRO MT, MOORE D, PEGRAM R, JOHN SA, (2005). Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. *Mycopathologia*. 160: 151-157.

- PRABAKARAN G, PAILY KP, PADMANABHAN V, HOTI SL, BALARAMAN K. (2002). Isolation of a *Pseudomonas fluorescens* metabolite/exotoxin active against both larvae and pupae of vector mosquitoes. *Pest Management Science* 59: 21–24.
- QUESADA-MORAGA E, SANTOS-QUIRÓS R, VALVERDE-GARCÍA P, SANTIAGO-ÁLVAREZ C. (2004). Virulence, horizontal transmission, and sub lethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 87: 51-58.
- SADANANDANE C, REDDY CMR, PRABAKARAN G, BALARAMAN K. (2003). Field evaluation of a formulation of *Pseudomonas fluorescens* against *Culex quinquefasciatus* larvae and pupae. *Acta Tropica*. 87: 341-343.
- SANTI L, SILVA WOB, BERGER M, GUIMARÃES JA, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. (2010). Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*. 55: 874-880.
- SANTI L, SILVA WOB, PINTO AFMP, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. (2009a). Differential immunoproteomics enables identification of *Metarhizium anisopliae* proteins related to *Rhipicephalus microplus* infection. *Research in Microbiology*. 160: 824-828.
- SANTI L. (2009b). Relação patógeno-hospedeiro: Análise bioquímica e proteômica da interação do fungo *Metarhizium anisopliae* e seus hospedeiros artrópodes. Tese de Doutorado. Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [Porto Alegre](#).
- SCHOLTE EJ, NJIRU BN, SMALLEGANGE RC, TAKKEN W, KNOLS BGJ. (2005). Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal*. 2: 1-8.
- SCHOLTE EJ, TAKKEN W, KNOLS BGJ. (2007). Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*, 102: 151-158.
- SCHRANK A, VAINSTEIN MH. (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*. 56: 1267-1274.

- SHAH PA, PELL JK. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61: 413-423.
- SHERLOCK IA, GUITTON N. (1982). Observações sobre a ação do fungo *Metarhizium anisopliae* Metsch. sobre algumas espécies de Triatomidae (Hemiptera, Reduviidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. 24: 234-39.
- SILVA JC, MESSIAS CL. (1986). Virulence of mutants and revertants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* toward *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 48: 368-74.
- SILVA WOB, SANTI L, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. (2010b). The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle. *Fungal Biology*. 114: 911-916.
- SILVA WOB, SANTI L, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. (2010a). *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* infection. *Fungal Biology*. 114: 10-15.
- SILVEIRA AC. (2000). Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. *Cadernos de Saúde Pública*. 16(Sup. 2): 35-42.
- STANISÇUASKI F, FERREIRA-DASILVA CT, MULINARI F, PIRES-ALVES M, CARLINI CR. (2005). Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon*, 45: 753-760.
- ST LEGER RJ, COOPER RM, CHARNLEY AK. (1986). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*. 48: 85-95.
- SUDAKIN DL. (2003). Biopesticides. *Toxicology Reviews* 22(2): 83-90.
- TOLEDO AV, DE REMES LENICOV AM, LOPEZ LASTRA CC. (2007). Pathogenicity of fungal isolates (Ascomycota: Hypocreales) against *Peregrinus maidis*, *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera: Delphacidae), and *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae), vectors of corn disease. *Mycopathologia*. 163: 225-232.
- TULLOCH M. (1976). The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society*. 66: 407-411.

VAN LENTEREN JC. (1993). Biological control of pests. In Modern crop protection: developments and perspectives. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Press. ed. J. C. Zadoks: 179–187.

WRIGHT C, BROOKS A, WALL R. (2004). Toxicity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to adult females of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Pest Management Science. 60: 639-44.

ZHIOUA E, BOWING M, JONHSON PW, GINSESBERG HS, LEBRUM RA. (1997). Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromicetos) to *Ixodes scapularum* (Acari: Ixodidae). Journal of Parasitology. 83: 815-818.