

ANA PAULA DUARTE PIRES

**DIVERSIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR EM LINHAGENS
DE *Beauveria bassiana***

**RECIFE
2002**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR EM LINHAGENS
DE *Beauveria bassiana***

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação em Biologia de Fungos, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia de Fungos.

ALUNA: Ana Paula Duarte Pires

ORIENTADOR: Prof^o. Dr. João Lúcio de Azevedo

CO-ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Elza Áurea de Luna Alves Lima

**Recife-PE
2002**

**“Quando um homem sabe o que deseja
todo o universo conspira para que ele
realize o seu sonho”.**

(Paulo Coelho)

DEDICO:

Ao meu pai João Fernandes Duarte (In Memoriam), e a minha mãe Maria da Conceição R. Duarte.

A minha Avó Maria do Carmo Pires de Siqueira.

A minha irmã Denise Duarte.

A minha grande amiga Diana Guerra, por todo o seu carinho.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço a DEUS por iluminar meus caminhos, e estar sempre ao meu lado dando-me força e coragem a cada dia.

Ao meu pai, pelo seu amor, carinho, dedicação e incentivo sem os quais eu jamais teria conseguido os meus objetivos. Mesmo não estando mais entre nós, sei que está muito feliz e orgulhoso da sua filha.

À minha mãe de quem muito me orgulho, mulher forte, batalhadora e super-mãe, sempre presente em todas as ocasiões. Obrigada mamãe por TUDO, você é a minha vida.

À minha irmã pelo apoio e incentivo.

À minha avó Maria do Carmo, por torcer e acreditar no meu sucesso.

Aos meus tios Cleto, Teresa e Clóvis, pela acolhida quando cheguei a Recife para estudar.

À minha tia Isabel Chitarra que me orientou e incentivou a seguir o caminho da pesquisa.

À toda minha família que acreditou na minha batalha.

A minha grande amiga e irmã Diana Guerra, ela é o meu anjo, desde o dia que nos encontramos, sinto que não estou mais sozinha.

Ao meu namorado Fábio, uma pessoa muito especial, pela paciência e apoio.

À Prof^a Dr^a. Elza Áurea de Luna Alves Lima, que confiando em mim, recebeu-me de braços abertos, com muito carinho e amizade, a senhora foi fundamental nesta etapa da minha vida. Obrigada!

Ao Prof^o Dr. João Lúcio Azevedo, por todo apoio e sobre tudo pelo crédito que sempre demonstrou. Mesmo à distância, sua ajuda foi muito valiosa.

À Prof^a Dr^a. Neiva Tinti de Oliveira, por auxiliar-me nas horas difíceis e por acreditar na minha capacidade.

À todos os Professores da Pós-graduação em Biologia de Fungos.

Ao Prof^o Dr. Francisco Cordeiro Neto, por ajudar sempre que necessário.

À Prof^a Dr^a. Marilene, que desde a especialização foi tão amável e prestativa.

À Prof^a Dr^a. Janete Magali pela liberação do uso do computador no Departamento de Antibióticos.

Ao Prof^o Dr. Marcos Morais pelos *primers* cedidos para este trabalho.

Ao CENARGEN, pela liberação de parte das linhagens utilizadas neste trabalho.

À Micoteca URM-UFPE, em especial à Prof^a. Dr^a. Cristina Motta e Eliane Nogueira pelos seus serviços liberando parte das linhagens utilizadas neste trabalho.

Ao meu amigo Júlio Pires pela ajuda desde a especialização.

Aos meus colegas Ana Luiza, Cláudia, Clécio, Daniela, Diana, Francisco, Guilherme, Rejane, Renata, Suely, Sandra, pela excelente convivência durante todo o curso.

Em especial a Ana Luiza, a sua contribuição foi essencial para o meu desempenho.

À Doutoranda Bereneuza Brasileiro, que nos piores momentos, com suas palavras de otimismo e seu empenho, deu-me força para que eu não desistisse.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa concedida durante todo o curso.

RESUMO:

Foram analisadas vinte linhagens de *Beauveria bassiana* isoladas de diferentes regiões e hospedeiros, quanto ao perfil de DNA, através da análise da região ITS do rDNA, de RAPD e Intron, para avaliação da diversidade genética e auxílio na caracterização. A região ITS1-5.8s-ITS2 do rDNA foram digeridas com as enzimas *Eco* RI, *Dra* I, *Msp* I e *Hae* III, onde a *Eco* RI e *Dra* I não apresentaram sítio de restrição e a *Hae* III e *Msp* I não apresentaram polimorfismo entre as linhagens, confirmando a espécie estudada. Para RAPD foram selecionados cinco *primers* OPX17, OPW4, OPW7, OPW19, OPW20, que produziram um total de 442 bandas. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo programa NTSYS.PC e construída uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard, que gerou um dendrograma através do método de agrupamento UPGMA. A similaridade foi em torno de 70%. A análise do dendrograma mostrou a formação de quatro grupos, onde não houve correlação com o hospedeiro ou origem geográfica, embora duas linhagens isoladas de *Nezara viridula* e duas de *Deois flavopicta* tenham mostrado maior nível de similaridade. Os dados obtidos pela análise de Intron, mostraram o aparecimento de cinco grupos.

ABSTRACT

To characterize and investigate genetic diversity twenty strains of *Beauveria bassiana* isolated from different hosts and region, were analysed according to their DNA profiles through ITS region of rDNA, RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) and Intron. ITS analyses were conducted by restriction enzyme digestion of the amplified region using the *primers* ITS4 and ITS5. Data obtained from analysis of Intron showed five distinct groups of strains. No restriction sites were found when DNA was treated with *Eco* RI and *Dra* I enzymes. *Msp* I and *Hae* III digested the amplicon, but no polymorphisms among strains was found. Five *primers* were selected for RAPD: OPX17, OPW4, OPW7, OPW19, OPW20, which produced 442 bands and the data obtained from the total number of bands were submitted to statistical analysis using the NTSYS.PC program and obtained a similarity matrix by the Jaccard coefficient generating a dendrogram through UPGMA method. Similarity was 70%. The dendrogram general analyses showed the formation of four groups. The results allowed to infer that *B. bassiana* strains did not group according to the host or geographic origin.

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1. Quantificação de DNA genômico em extratos de 20 linhagens de *Beauveria bassiana*. Poços de 1 a 4 marcador de peso molecular do DNA fago λ nas concentrações: 5, 10, 15 e 20 ng/ μ L respectivamente; e na seqüência os DNA das linhagens : 5) 2912; 6) 2913; 7) 2915; 8) 2916; 9) 2917; 10) 2920; 11) 2921; 12) 2923; 13) 2924; 14) 2926; 15) 2927; 16) 2929; 17) 2930; 18) 2933; 19) 2935; 20) 4548; 21) 4551; 22) 4552; 23) 4553; 24) 4554..... 32

Figura 2. Produtos de amplificação da região ITS1-5.8s-ITS2 do rDNA das 20 linhagens de *Beauveria bassiana*. M: Marcador de 50pb DNA Ladder. Os DNA das 20 linhagens estão nos poços de 1 a 20: 1) 2912; 2) 2913; 3) 2915; 4) 2916; 5) 2917; 6) 2920; 7) 2921; 8) 2923; 9) 2924; 10) 2926; 11) 2927; 12) 2929; 13) 2930; 14) 2933; 15) 2935; 16) 4548; 17) 4551; 18) 4552; 19) 4553; 20) 4554.....34

Figura 3. Produtos de digestão com a enzima *Hae* III da região ITS1-5.8s-ITS2 do rDNA das 20 linhagens de *Beauveria bassiana*. M: Marcador de 100pb Dna Ladder . Os DNA das 20 linhagens estão nos poços de 1 a 20: 1) 2912; 2) 2913; 3) 2915; 4) 2916; 5) 2917; 6) 2920; 7) 2921; 8) 2923; 9) 2924; 10) 2926; 11) 2927; 12) 2929; 13) 2930;14) 2933; 15) 2935;16) 4548; 17) 4551; 18) 4552; 19) 4553; 20) 4554.....35

Figura 4. Produtos de digestão com a enzima *Msp* I da região ITS1-5.8s-ITS2 do rDNA das 20 linhagens de *Beauveria bassiana*. M: Marcador de 100pb Dna Ladder . Os DNA das 20 linhagens estão nos poços de 1 a 20: 1) 2912; 2) 2913; 3) 2915; 4) 2916; 5) 2917; 6) 2920; 7) 2921; 8) 2923; 9) 2924; 10) 2926; 11) 2927; 12) 2929; 13) 2930;14) 2933; 15) 2935;16) 4548; 17) 4551; 18) 4552; 19) 4553; 20) 4554.....36

Figura 5. Seleção de *Primers* utilizando a linhagem 4553 de *Beauveria bassiana*. M: Marcador de peso molecular DNA de fago λ , cortado com a enzima HIND III; Nos poços de 1 a 19 os *primers*: 1) OPA-1; 2) OPA-2; 3) OPA-3; 4) OPA-4; 5) OPA-5; 6) OPA-7; 7) OPA-8; 8) OPA-9; 9) OPA-10; 10) OPA-11; 11) OPA-12; 12) OPA-13; 13) OPA-14; 14) OPA-15; 15) OPA-16; 16) OPA-17; 17) OPA-18; 18) OPA-19; 19) OPA-20.....38

Figura 6 Seleção de *Primers* utilizando a linhagem 4553 de *Beauveria bassiana*. M: Marcador de peso molecular DNA de fago λ , cortado com a enzima HIND III; Nos poços de 1 a 18 os *primers*: 1) OPX-1; 2) OPX-2; 3) OPX-3; 4) OPX-4; 5) OPX-5; 6) OPX-6; 7) OPX-7; 8) OPX8; 9)OPX-9; 10) OPX-10; 11) OPX-11; 12) OPX-12; 13) OPX-13; 14) OPX-14; 15) OPX-15; 16) OPX-16; 17) OPX-17; 18) OPX-18. 39

Figura 7 Seleção de *Primers* utilizando a linhagem 4553 de *Beauveria bassiana*. M: Marcador de peso molecular DNA de fago λ , cortado com a enzima HIND III; Nos poços de 1 a 20 os *primers*: 1) OPW-1; 2) OPW-2; 3) OPW-3; 4) OPW-4; 5) OPW-5; 6) OPW-6; 7) OPW-7; 8) OPW-8; 9) OPW-9; 10) OPW-10; 11) OPW-11; 12) OPW-12; 13) OPW-13; 14) OPW-14; 15) OPW-15; 16) OPW-16; 17) OPW-17; 18) OPW-18; 19) OPW19;20)OPW20.....40

Figura 8. Perfis de RAPD de 20 linhagens de *Beauveria bassiana*, obtidos com o *primer* OPX-17. M: Marcador de peso molecular DNA de fago λ , cortado com a enzima HIND III. O DNA das linhagens estão nos poços de 1 a 20: 1) 2912; 2) 2913; 3) 2915; 4) 2916; 5) 2917; 6) 2920; 7)2921; 8) 2923; 9) 2924; 10) 2926; 11) 2927; 12) 2929; 13) 2930; 14) 2933; 15) 2935; 16) 4548; 17) 4551; 18) 4552; 19) 4553; 20) 4554.....42

Figura 9. Perfis de RAPD de 20 linhagens de *Beuaveria bassiana* , obtidos com o primer OPW-4. M: Marcador de peso molecular DNA de fago λ , cortado com a enzima HINDIII.Os DNA das linhagens estão nos poços de 1 a 20:1) 2912; 2) 2913; 3) 2915; 4) 2916; 5) 2917; 6) 2920; 7)2921; 8) 2923; 9) 2924; 10) 2926; 11) 2927; 12) 2929; 13) 2930; 14) 2933; 15) 2935; 16) 4548; 17) 4551; 18) 4552; 19) 4553; 20) 4554.....43

Figura 10. Perfis de RAPD de 20 linhagens de *Beauveria bassiana*, obtidos com o primer OPW-7. M: Marcador de peso molecular DNA de fago λ , cortado com a enzima HIND III.Os DNA das linhagens estão nos poços de 1 a 20: 1) 2912; 2) 2913; 3) 2915; 4) 2916; 5) 2917; 6) 2920; 7)2921; 8) 2923; 9) 2924; 10) 2926; 11) 2927; 12) 2929; 13) 2930; 14) 2933; 15) 2935; 16) 4548; 17) 4551; 18) 4552; 19) 4553; 20) 4554.....44

Figura 11. Perfis de RAPD de 20 linhagens de *Beauveria bassiana* , obtidos com o primer OPW-19. . M: Marcador de peso molecular DNA de fago λ , cortado com a enzima HIND III. Os DNA das linhagens estão nos poços de 1 a 20: 1) 2912; 2) 2913; 3) 2915; 4) 2916; 5) 2917; 6) 2920; 7)2921; 8) 2923; 9) 2924; 10) 2926; 11) 2927; 12) 2929; 13) 2930; 14) 2933; 15) 2935; 16) 4548; 17) 4551; 18) 4552; 19) 4553; 20) 4554.....45

Figura 12. Perfis de RAPD de 20 linhagens de *Beauveria bassiana* , obtidos com o primer OPW-20. M: Marcador de peso molecular DNA de fago λ , cortado com a enzima HIND III. Os DNA das linhagens estão nos poços de 1 a 20: 1) 2912; 2) 2913; 3) 2915; 4) 2916; 5) 2917; 6) 2920; 7)2921; 8) 2923; 9) 2924; 10) 2926; 11) 2927; 12) 2929; 13) 2930; 14) 2933; 15) 2935; 16) 4548; 17) 4551; 18) 4552; 19) 4553; 20) 4554.....46

Figura 13. Dendrograma obtido com perfis de RAPD de 20 linhagens de *Beauveria bassiana*.....47

Figura 14. Perfis de Produtos de Amplificação da região Intron de 20 linhagens de *Beauveria bassiana* , obtidos com o *primer* EI-1. M: Marcador Kb DNA Ladder. Os DNA das linhagens estão nos poços de 1 a 20: 1) 2912; 2) 2913; 3) 2915; 4) 2916; 5) 2917; 6) 2920; 7)2921; 8) 2923; 9) 2924; 10) 2926; 11) 2927; 12) 2929; 13) 2930; 14) 2933; 15) 2935; 16) 4548; 17) 4551; 18) 4552; 19) 4553; 20) 4554.....48

Figura 15. Dendrograma obtido com perfis da Região Intron de 20 linhagens de *Beauver bassiana*.....50

LISTA DE TABELAS

PÁGINA

Tabela 1. Linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> utilizadas para análise de RAPD, região ITS do rDNA e Região Intron	15
Tabela 2. Componentes da reação de amplificação da região ITS do rDNA e respectivas concentrações.....	25
Tabela 3. Componentes da reação de digestão dos produtos de amplificação da região ITS do rDNA.	26
Tabela 4 Componentes da reação de amplificação do DNA genômico de 20 linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> e respectivas concentrações utilizadas na reação de RAPD.	28
Tabela 5. Componentes da reação de amplificação da Região Intron	29
Tabela 6. Concentrações estimadas de DNA genômico das linhagens de <i>Beauveria bassiana</i>	31
Tabela 7. <i>Primers</i> selecionados para RAPD de 20 linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> e respectivas seqüências de nucleotídeos.	37

SUMÁRIO	Página
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Taxonomia e Biologia de <i>Beauveria bassiana</i>	3
2.2. Importância , Patogenicidade e Controle Biológico por <i>B. bassiana</i>	6
2.3. Marcadores Moleculares: para análise do DNA genômico em fungos.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Linhagens Fúngicas	15
3.2. Meios de Cultura	16
3.2.1. Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) – Oxoid	16
3.2.2. Meio Mínimo Líquido	16
3.3. Soluções e Tampões	17
3.3.1. Solução de “Tween 80” 0,1% (v/v)	17
3.3.2. Solução de Brometo de Etídio	17
3.3.3. Tampão Fenol	17
3.3.4. Solução Clorofane	18
3.3.5. Solução Clorofil	18
3.3.6. NaCl 0,3M	18
3.3.7. Tris [Hidroximetil] aminometano (Tris-HCl 1M) pH 8,0	18
3.3.8. Ácido Etileno Diamino Tetraacético (EDTA 0,5M) pH 8,0	19
3.3.9. Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%	19
3.3.10. Gel de Agarose para Eletroforese de DNA Total (0,8%)	19
3.3.11. Gel de Agarose para Produtos de PCR do rDNA (1%)	20
3.3.12. Gel de Agarose restrição das Regiões ITS do rDNA,RAPD e Intron (1,4%)	20
3.3.13. Tampão TE	20

3.3.14. Tampão de Extração de DNA para Fungos Filamentosos	21
3.3.15. Tampão TBE 10X pH 8,0	21
3.3.16. Tampão de Amostra	21
3.3.17. Tampão de Amplificação 10X Trizma, Taq polimerase, Mg ⁺⁺	22
3.3.18. Oligonucleotídeos (<i>Primers</i>)	22
3.3.19. dNTPs	22
3.4. Obtenção de Micélio para extração do DNA	23
3.5. Extração do DNA	23
3.6. Quantificação do DNA	24
3.7. Amplificação das Regiões ITS do rDNA	24
3.8. Eletroforese dos Produtos de PCR do rDNA	25
3.9. Amplificação e Digestão das Regiões ITS do rDNA	26
3.10. Seleção de <i>primers</i> para RAPD	27
3.11. Amplificação do DNA por meio da Técnica de RAPD	27
3.12. Eletroforese dos Produtos de Amplificação	28
3.13. Amplificação da Região Intron	29
3.14. Eletroforese dos Produtos de Amplificação da Região Intron	30
3.15. Análise Computacional dos Dados	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5. CONCLUSÕES	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
7. APÊNDICE	66

1. INTRODUÇÃO

O controle biológico de insetos por fungos tem evoluído muito nos últimos anos, e tem contribuído para o equilíbrio ambiental. As pragas que dizimam inúmeros cultivos em todo o mundo, podem ser controladas por meio de organismos existentes na natureza, que são chamados de inimigos naturais (ALVES, 1998). O controle biológico é bem aceito por ser econômico e duradouro, além de não comprometer o ecossistema e a saúde humana (MAGALHÃES & FARIA, 1996).

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados de forma racional e econômica no controle biológico. Aproximadamente 80% das doenças de insetos têm como agente etiológico, os fungos. Destes, cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies estão relacionadas a essas patologias de insetos. A maioria dos fungos entomopatogênicos já relatados ocorre no Brasil sendo que desses, mais de 20 incidem sobre pragas de importância econômica (ALVES, 1998; BITTENCOURT, 2000; MAGALHÃES *et al.*, 2000; ATHAYDE *et al.*, 2001).

Espécies do gênero *Beauveria* Vuillemin são bastante estudadas e apresentam importância no controle biológico, atuando com eficiência no controle integrado insetos-pragas. As espécies desse gênero que apresentam eficiência contra os insetos são *B. bassiana* (Bals.) Vuill e *B. brongniartii* (Sacc) Petch. *B. bassiana* é de ocorrência cosmopolita, sendo freqüente tanto sobre insetos quanto em amostras de solo, onde pode subsistir por longo tempo como sapróbios. Em condições de laboratório, coloniza mais de 200 espécies de insetos, sendo que no campo ocorre de forma endozoótica e epizoótica em Coleoptera, Lepidoptera, Hemiptera, e em ocorrência endozoótica sobre Diptera, Heminoptera e Ortoptera (ALVES, 1998). *B. bassiana* tem o ciclo parassexual descrito (PACCOLA-MEIRELLES & AZEVEDO, 1991), o que possibilita e viabiliza os estudos genéticos.

Devido ao valor dos fungos entomopatogênicos como agentes no controle biológico, a caracterização destes é muito importante, sendo possível discriminar os isolados por meio do conhecimento de seu padrão de comportamento e do seu genoma. A caracterização auxilia, também o processo de reconhecimento da espécie, quando esta não é bem definida (NEUVÉGLISE *et al.*, 1994). A caracterização de linhagens é muito importante nos estudos de epizootiologia e distribuição espaço-temporal, permitindo avaliar sua capacidade de recombinação.

Vários recursos são utilizados para identificação e caracterização de fungos. Todos os aspectos devem ser levados em consideração, incluindo os morfológicos, os fisiológicos e os comportamentais, como virulência, taxa de crescimento e produção de conídios, que têm permitido uma melhor discriminação de isolados principalmente de *Metarhizium* e *Beauveria* (LEAL, 1996; ALVES *et al.*, 1998).

Nos últimos anos as técnicas de genética molecular vêm sendo aplicadas para solucionar questões de taxonomia, identificação e variação genética em fungos entomopatogênicos (CLARKSON, 1992; KHACHATOURIANS, 1996). RAPD é utilizada na diferenciação entre os isolados (FEGAN *et al.*, 1993; BIDOCKA *et al.*, 1994; URTZ & RICE, 1997; LEAL *et al.*, 2000), a análise do DNA ribossomal e mitocondrial (HEGEDUS & KHACHATOURIANS, 1993) é extensivamente aplicada para análise de variabilidade (FUNGARO & VIEIRA, 1998) e para identificação de espécies e isolados (LEAL *et al.*, 1994; BERRETA *et al.*, 1998).

O presente trabalho teve por objetivo analisar e determinar a diversidade genética entre linhagens de *B. bassiana* obtidas de regiões e hospedeiros distintos, por meio de marcadores moleculares.

2. Revisão de Literatura:

2.1. Taxonomia e Biologia de *Beauveria bassiana*

A espécie-tipo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill foi descrita pela primeira vez em 1853 por Balsamo com o nome *Botrytis bassiana*, quando o mesmo demonstrou que a doença chamada “Muscardine “ branca sobre *Bombyx mori*, o bicho-da-seda, era causada por um fungo. Após muitos estudos realizados, verificou-se que as características não eram de *Botrytis*. Em 1912, Vuillemin reestudou o fungo e criou a espécie *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (BENHAM & MIRANDA, 1953), que permanece assim denominada até os dias atuais.

BENHAM & MIRANDA(1953) consideraram quatro espécies do gênero *Beauveria*: *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *B. effusa* (Beuaverie) Vuillemin, *B. densa*(link) Picard e *B. globulifera* (Spegazzini) Picard.

Em 1972, DE HOOG reorganizou o gênero e considerou apenas três espécies: *B. Bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *B. brongniartii*(= *B. Tenella*) (Saccard) Petch e *B. alba* (Limber) Saccas.

Com base na classificação de ALEXOPOULOS & MIMS (1979) o fungo *Beauveria bassiana* encontra-se na seguinte categoria taxonômica:

REINO: Myceteae

DIVISÃO: Amastigomycota

SUBDIVISÃO: Deuteromycotina

CLASSE-FORMA: Deuteromycetes

SUBCLASSE-FORMA: Hyphomycetidae

ORDEM-FORMA: Moniliales

FAMÍLIA-FORMA: Moniliaceae

GÊNERO-FORMA: *Beauveria*

ESPÉCIE-FORMA: *Beauveria bassiana*

Atualmente a tendência é não se aceitar essa classificação e adotar esses fungos que não apresentam fase sexuada como anamorfos de Ascomycota ou Basidiomycota (KENDRICK ,1996).

SAMSON (1981) considerou duas espécies de *Beauveria* que atacam com maior freqüência os insetos, *B. bassiana* e *B. brongniartii*. Elas são diferenciadas pelas características morfológicas: a primeira apresenta conidióforos formando densos cachos e a segunda conidióforos escassos e raramente em cachos. No ano seguinte, mais duas espécies novas foram reconhecidas (SAMSON & EVANS, 1982): *B. velata* Samson & Evans de conídios verrucosos e *B. amorpha* (Hohn) SMASON & EVANS de conídios lisos.

O fungo *B. bassiana* é um parasita facultativo, pois apresenta durante seu ciclo biológico uma fase parasitária e outra não parasitária. A germinação de seus conídios ocorre em qualquer região da cutícula do hospedeiro e os tubos germinativos penetram através da cutícula após aproximadamente, dezoito horas da infecção. Ocorrida a penetração, o micélio atinge a hemolinfa do inseto onde são formadas estruturas leveduriformes, originadas por diferenciação micelial. Após a colonização do hospedeiro, as hifas emergem para o exterior, onde se desenvolvem os conidióforos e os conídios que se dispersam no ar (PACCOLA-MEIRELLES, 1988).

LUNA-ALVES LIMA (1989a,1989b) verificou a ocorrência de estruturas leveduriformes uni e binucleadas tanto em *B. bassiana* quanto em *B. brongniartii*. Verificou também a conidiogênese de *B. bassiana* que segue o modelo fialídico simpodial, onde um núcleo migra da célula conidiogênica para o primórdio do conídio.

A citologia desta espécie foi também estudada por LUNA- ALVES LIMA & TIGANO (1989) onde investigaram a ocorrência das estruturas leveduriformes em meio líquido e na hemolinfa de *Spodoptera frugiperda* e observaram uma grande variação citológica dessas estruturas tanto em meio líquido quanto na hemolinfa desse inseto. Citaram que as estruturas leveduriformes se formam a partir da germinação dos conídios, dezesseis horas após a inoculação, e que 'in vitro' essas estruturas eram uni e binucleadas e na hemolinfa do inseto eram maiores e multinucleadas.

PACCOLA-MEIRELLES & AZEVEDO (1991) descreveram um tipo de parassexualidade em *B. bassiana*. Os autores relataram que diplóides não são isolados, mas os recombinantes haplóides são diretamente formados do heterocário entre as linhagens auxotróficas e sugeriram que esse fenômeno se dá devido a ocorrência da paramiose descrita anteriormente em outros fungos (BONATELLI Jr. *et al.*, 1983, SILVEIRA & AZEVEDO, 1987).

Parassexualidade foi também descrita em *B. bassiana* via fusão de protoplastos (PACCOLA-MEIRELLES & AZEVEDO, 1994) e BELLO & PACCOLA MEIRELLES (1998) realizaram um mapeamento genético do mesmo fungo, utilizando a parassexualidade anteriormente descrita.

GUARANA (1992) em estudos sobre a condição nuclear em *B. bassiana*, isolada de *Cosmopolitus sordidus*, verificou que os conídios se apresentaram uninucleados, enquanto as hifas e as estruturas leveduriformes se apresentaram uni, bi e trinucleadas. O mesmo autor também analisou a atividade amilolítica, lipolítica e proteolítica. Os resultados demonstraram semelhança entre a produção de amilase e lipase, e diferença quanto a produção de proteases.

PAIVA *et al.* (1996) estudaram várias linhagens de *B. bassiana* preservadas em óleo mineral e recém isoladas de insetos e verificaram que todas apresentaram conídios e estruturas vegetativas uninucleadas. Não encontraram alteração citológica entre as linhagens, o que demonstra um alto grau de preservação do genoma deste fungo.

AZEVEDO (1996) relatou que os aspectos da biologia têm sido estudados e que uma grande variabilidade genética foi detectada em *B. bassiana*. Esta variação ocorre na população deste fungo, no aspecto da patogenicidade, morfologia e da produção de enzimas, devido a ocorrência da parassexualidade.

2.2. Importância: Patogenicidade e Controle Biológico por *B. bassiana*

B. bassiana se destaca como agente no controle biológico de insetos pelo grande número de insetos que parasita de importância econômica, juntamente com *Metarhizium anisopliae* são as espécies mais estudadas e utilizadas no controle de pragas.

QUINTELA *et al.* (1994) avaliaram o efeito de aplicações de *B. bassiana* e *M. anisopliae* no solo ao nível de campo sobre larvas de *Chalcodermis bimaculatus* em cultura de caupi (*Vigna unguiculata*) e sua persistência no solo. Os resultados indicaram que *M. anisopliae* e *B. bassiana* promoveram em *C. bimaculatus* um controle de aproximadamente 30-50% e que a persistência dos fungos é suficiente para manter este nível de controle com uma única aplicação.

MALAGODI & VEIGA (1995) estudaram a patogenicidade de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre o cupim *Nasutitermes* sp, uma importante praga da cana-de-açúcar, em Pernambuco. Os resultados indicaram que *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram patogênicos e a mortalidade foi crescente em relação ao tempo após a inoculação e ao aumento da concentração.

VILAS-BOAS *et al.* (1996) estudaram linhagens selvagens e mutantes de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em adultos de *Callosobruchus maculatus*. Utilizaram cinco linhagens de *M. anisopliae*, e duas de *B. bassiana*, entre as linhagens mutantes e as selvagens, testadas nas concentrações 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/mL, *C. maculatus* foi mais suscetível a *B. bassiana* do que a *M. anisopliae*. PACCOLA-MEIRELLES (1997) obtiveram mutantes resistentes a luz ultra-violeta em *B. bassiana* e comprovaram sua patogenicidade com linhagens selvagens em *Diatraea saccharalis*.

ALVES (1998) relatou como exemplo significativo a utilização de *B. bassiana* no controle de *Ostrinia nubilalis*, na China. O programa de aplicação desse fungo teve início em 1977, atingindo uma área de 400.000 hectares de plantação de milho. Antes da aplicação desse patógeno, os danos causados nas plantações eram de 60%. Após cinco anos de implantação do programa, os danos foram reduzidos a apenas 2% (HUSSEY & TINSLEY, 1981).

ATAHYDE *et al.* (1999a; 1999b) estudaram a patogenicidade “in vitro” de *B. bassiana* e *M.anisopliae*, sob fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* no semi-árido paraibano e detectaram 80% de mortalidade que correspondeu ao controle de 99,99%, demonstrando assim, a eficiência desse fungo, nas investigações sobre o controle dessa praga.

TAMAI *et al.* (1999) avaliaram a patogenicidade de *B. bassiana* ao ácaro *Tetranychus urticae*, desenvolvido a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ UR e 12% de fosfatase, utilizando-se fêmeas recém emergidas. Os ácaros foram mantidos durante seis dias em discos de folhas de *Canavalia ensiformis* inoculadas com *B. bassiana*, isolado 447, nas concentrações 5×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9 conídios/mL. Este isolado se mostrou patogênico a *T. urticae* apresentando um aumento nos valores de mortalidade acumulada (total, corrigida e confirmada) à medida que a suspensão de conídios se tornou mais concentrada. Nas seis concentrações testadas, os valores de mortalidade corrigidos ao sexto dia, foram inferiores a 50%, sendo observados apenas na concentração de 1×10^9 conídios/mL, mortalidade total superior a 50%.

ATHAYDE *et al.* (2001) avaliaram a patogenicidade in vitro de *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *B. bassiana* sobre ovos de *Boophilus microplus* oriundos de fêmeas selvagens, a temperatura ambiente. Os grupos tratados com o *M. anisopliae* mostraram 45,5 dias como período de incubação, 13 dias como período de eclosão e percentual de eclosão de 9,75%. Para os grupos tratados com *M. flavoviride* e *B. bassiana* foi observado os seguintes valores 50,35 dias, 15 dias, 10% e 30,5 dias, 9,5 dias, 7,75% respectivamente, Os resultados confirmaram a patogenicidade de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, ressaltando a ação do *M. flavoviride*, demonstrando assim, mais uma possível alternativa para o controle biológico do *B. microplus*.

PIMENTEL *et al.* (2002) isolaram linhagens de *B. bassiana* como endofíticas em milho e verificaram por testes moleculares (RAPD e rDNA) que elas embora da mesma espécie, diferiram das linhagens convencionalmente usadas. Entretanto, foram extremamente eficientes no controle da praga de milho *Spodoptera fugiperda* “in vitro”.

2.3. Marcadores Moleculares: para análise do DNA genômico em fungos

A variabilidade é o princípio básico para os estudos genéticos, o que possibilita a análise da herança genética, com o intuito de novas recombinações (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Com os avanços na biologia molecular, modernas e poderosas técnicas moleculares surgiram. Entre elas, a PCR (Polimerase Chain Reaction) que têm contribuído para a detecção da variabilidade genética em diversos organismos, principalmente entre fungos.

As técnicas baseadas em marcadores de DNA apresentam muitas vantagens revelando diretamente a variabilidade genética, não estando sujeitas às influências do meio ambiente como também não apresentam variação em função do estágio de desenvolvimento do organismo e do tipo de tecido utilizado (PUTERKA *et al.*, 1993). Além de contribuir na avaliação da variabilidade são úteis na condução de trabalhos de melhoramento genético, auxiliam na caracterização de linhagens, na taxonomia e na filogenia de fungos (PACCOLA-MEIRELLES, 1988; MAJER *et al.*, 1996; AZEVEDO, 1998a, 1998b; DRIVER *et al.*, 2000; STUMMER *et al.*, 2000)

Muitas pesquisas sobre o assunto surgiram e SAIKI *et al.* (1985), descreveram a técnica de reação em cadeia da polimerase que permite a amplificação de DNA, pela ligação de oligonucleotídeos à regiões que delimitam determinada seqüência de DNA. Esta técnica possibilitou a obtenção “in vitro” de várias cópias de um segmento específico de DNA, contribuindo para o aprimoramento das pesquisas.

A técnica PCR explora a capacidade de duplicação do DNA. Uma fita simples de DNA é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares sob a ação da enzima polimerase do DNA, capaz de adicionar os nucleotídeos presentes na reação, segundo a fita molde. A polimerase do DNA requer, entretanto, um “ponto de início” ligado à fita molde que servirá de apoio para que os nucleotídeos subsequêntes sejam adicionados. Esse ponto de início da síntese é fornecido por um oligonucleotídeo que se anela à fita molde simples, o qual é denominado de iniciador ou *primer*. Ambas fitas simples iniciais servem de fita molde para a síntese, desde que se forneça *primers* específicos a cada uma

delas. Dessa forma, a região do DNA genômico a ser sintetizada é definida pelos *primers*, que se anelam especificamente às suas seqüências complementares na fita molde, delimitando o fragmento de DNA que se deseja amplificar.

O ensaio consiste em adicionar em um tubo próprio para PCR, uma quantidade muito pequena do DNA genômico, mais os quatro nucleotídeos que compõem a cadeia de DNA (dCTP, dATP, dGTP e dTTP), a enzima polimerase do DNA, os oligonucleotídeos que servirão de *primers* e a solução tampão, que fornecerá as condições de pH e salinidade para que a síntese se processe. O tubo de ensaio é submetido a uma alta temperatura (geralmente 94°C por 5 min) para provocar o rompimento das pontes de hidrogênio entre ambas as cadeias de DNA, causando a desnaturação da molécula. A temperatura é rebaixada (30 a 60°C por 30seg) quando, então, os *primers* têm a oportunidade de se anelarem às suas seqüências complementares do DNA genômico. Finalmente, a temperatura é elevada para 72°C (por 2 a 5 min), temperatura ideal para que a polimerase do DNA utilizada na reação atue, dirigindo a síntese de novas cadeias. Repetindo-se esses três passos, **desnaturação**, **anelamento** e **síntese** por cerca de 30-40 ciclos, serão produzidas mais de 250 milhões de cópias de uma determinada seqüência de DNA em fita dupla, uma vez que o número de cópias cresce de modo exponencial a cada ciclo (WILLIAMS *et al.*, 1990; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). É uma técnica simples, desde que as reações estejam padronizadas. O tubo com a reação é incubado em aparelho que controla automaticamente as mudanças de temperatura de cada ciclo (FOSTER *et al.*, 1993; FARAH, 1997). Com base nos princípios da PCR, WILLIAMS *et al.* (1990) e WELSH & McCLELLAND (1990) descreveram um nova técnica de marcadores moleculares, baseada na amplificação, que não requer conhecimento prévio da seqüência alvo do DNA. Esta técnica chamada RAPD (Random Amplified Polymorphic) tem como principal característica, a ampliação ao acaso de segmentos de DNA com um único *primer* de seqüência arbitrária. A amplificação através desta técnica acontecerá quando a seqüência arbitrária do nucleotídeo utilizado, reconhecer os sítios de homologia nas fitas do DNA molde, sendo uma delas com orientação invertida, dentro do intervalo limite da PCR – 4Kb.

A técnica de RAPD tem aplicação bastante variada, como mapeamento genético, verificação da variabilidade genética, estudos de taxonomia, entre outras, e tem sido muito utilizada no estudo da variabilidade ou polimorfismo genético e na caracterização de linhagens de fungos de uma mesma espécie.

BIDOCHKA *et al.* (1994) utilizaram marcadores RAPD em estudos de variabilidade genética entre linhagens de *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* e *B. bassiana*. Os resultados mostraram que *M. flavoviride* apresentou pouca variabilidade intraespecífica (75% de similaridade) quando comparado ao *M. anisopliae* (menos de 25% das bandas foram comuns entre as linhagens). O alto nível de variabilidade genética apresentado pela espécie *M. anisopliae* foi semelhante à variabilidade total entre *B. bassiana*, *M. flavoviride* e *M. anisopliae*. Esses dados sugerem que *M. anisopliae* pode pertencer a um grupo de espécies crípticas, onde existem linhagens geneticamente distintas, e que sofreram uma evolução divergente a partir de um ancestral comum. Em contrapartida *M. flavoviride* sugere uma origem clonal para as várias linhagens encontradas. Essa natureza clonal, segundo os autores, mostra uma origem comum e, talvez uma história evolucionária recente, em comparação com *M. anisopliae*.

TIGANO-MILANI *et al.* (1995) utilizaram a técnica de RAPD para análise inter e intra-específica do gênero *Paecilomyces*, assim como para a realização de estudos epizootiológicos de *P. fumosoroseus*. Uma grande heterogeneidade foi detectada entre linhagens desse fungo. Apesar da baixa homogeneidade observada entre as linhagens isoladas da mosca-branca (*Bemisia tabaci*) diferentes genótipos foram identificados entre os isolados das populações epizoóticas de *P. fumosoroseus* nesse inseto.

AZEVEDO (1996) estudou a variabilidade genética entre isolados de *B. bassiana* obtidos na Região Nordeste do Brasil através de RAPD. Os seis *primers* produziram um total de 136 bandas diferentes. Dentre estas, 9,5% foram monomórficas, enquanto 90,5% foram polimórficas, pois pelo menos um isolado não apresentou a banda. Os resultados sugeriram que existe variabilidade genética entre os isolados de *B. bassiana*, mas também existe uma homogeneidade entre os isolados coletados de uma mesma espécie de insetos.

MAURER *et al.* (1997) estudaram trinta e oito amostras de *B. bassiana*, isoladas de diversas espécies de insetos, originadas de várias regiões, através das técnicas de RFLP e RAPD. Os resultados indicaram que houve formação de grupos similares e que os mesmos demonstraram claramente especificidade entre a população de *B. bassiana* e algumas espécies de hospedeiros. Neste mesmo ano URTZ *et al* (1997) utilizaram RAPD para examinar a variabilidade genética entre amostras de *B. bassiana* que foram isoladas de *Lissorhuptrus oryzophilus* (gorgulho do arroz), no Sudoeste da Louisiana. Os autores revelaram que houve formação de dois grupos com níveis de similaridade diferentes; o primeiro consistindo de treze isolados, que apresentaram um índice de similaridade em torno de 95%, enquanto o segundo demonstrou 91% de similaridade. Das quatro amostras de *B. bassiana* isoladas do solo, duas foram incluídas no primeiro grupo, e uma, no segundo. A quarta amostra não apresentou similaridade com nenhum dos dois grupos.

BERRETA *et al.* (1998) detectaram através do RAPD a diversidade genética entre isolados de *B. bassiana* da Argentina e do Brasil. As bandas geradas apresentaram alta resolução, cada isolado exibiu um genótipo distinto. Os grupos analisados mostraram um alto nível de variabilidade entre estes genótipos. Não foi detectada correlação com a origem geográfica ou hospedeiro. Entretanto, um grupo com 80% de similaridade representou os isolados com alta virulência sobre *Diatraea saccharalis*.

CASTRILLO & BROOKS (1998) utilizaram isoenzimas e RAPD para diferenciar 24 linhagens de *B. bassiana* coletadas de *Alphitobius diaperinus* de aves domésticas no Norte da Carolina e Oeste da Virginia. Nove enzimas foram utilizadas, das quais fosfatase alcalina e α e β - esterase, e glicose fosfatase mostraram maior número de bandas . Um total de 26 bandas de isoenzimas foram geradas por 4 enzimas que separaram as 24 linhagens em 14 classes. Em RAPD,

os *primers* selecionados produziram 141 bandas, e as 24 linhagens foram agrupadas em uma única classe. Ambos os sistemas se mostraram hábeis para detecção de variação entre as linhagens das diferentes regiões (Norte da Carolina e Oeste da Virgínia). A variação foi detectada não só dentro e entre as linhagens de diferentes regiões, mas entre linhagens coletadas de um mesmo hospedeiro.

LUZ *et al.* (1998) testaram 23 isolados de *B. bassiana* e 13 de *M. anisopliae* em ninfas de *Triatoma infestans* no terceiro instar. A patogenicidade foi testada à umidade saturada, demonstrando que este inseto é muito suscetível a infecção fúngica. Houve uma virulência diferencial a 50% de umidade entre os isolados de *B. bassiana* que não foi correlacionada ao agrupamento através da análise de RAPD. Na realidade os isolados analisados de *B. bassiana* apresentaram uma alta homogeneidade (73% de semelhança).

CASTRILLO *et al.* (1999) conduziram um estudo para avaliar a variação genética entre populações de *B. bassiana* associada a *Alphitobius diaperinus* usando marcadores de RAPD. Os 10 *primers* utilizados foram suficiente para demonstrar variação entre as linhagens.

DEVI *et al.* (2001) avaliaram a virulência de vinte isolados no estágio larval de *Chilo partillus* em bioensaios e seu DNA através de RAPD-PCR. Três categorias de agressividade foram encontradas: isolados que causaram mortalidade > 70%, entre 70 e 40% de mortalidade e < 40%, sendo agrupadas como altamente, médio e baixo agressivos, respectivamente. Em análise de RAPD, 30% de variabilidade foi observado entre os isolados, os quais foram agregados em três grupos maiores. Os grupos baseados na avaliação de virulência não foram iguais aos grupos avaliados no RAPD. Um dos isolados altamente agressivos juntou-se com isolados menos agressivos, e o outro com isolados de média agressividade.

Análise de rDNA tem sido extensivamente utilizada para estudo de variabilidade genética (FUNGARO, 1998) e para identificação de espécies e de isolados incluindo fungos entomopatogênicos (FUNGARO *et al.*, 1996; CRAVANZOLA *et al.*, 1997; BERRETA *et al.*, 1998, PIATTI *et al.*, 1998).

NEUVEGLISE *et al.* (1994) estudaram a variação no DNA ribossomal em 28 linhagens de *B. brongniartii* e 2 de *B. bassiana*, isoladas de diferentes hospedeiros e regiões. As regiões ITS1 e ITS2 analisadas revelaram um alto grau de polimorfismo entre as linhagens de *B. brongniartii* e a separação das mesmas em sete grupos, mostrando claramente a distância entre as espécies.

GLARE & INWOOD (1998) estudaram espécies de *B. bassiana* da Nova Zelândia comparando-as com isolados de outros países através de caracteres morfológicos e genéticos. Os isolados da Nova Zelândia foram divididos em *B. bassiana* e *B. brongniartii* com base na dimensão dos conídios; os isolados de conídios longos foram classificados como *B. brongniartii*, e os isolados de conídios menores e esféricos corresponderam a *B. bassiana*. Na análise de RAPD foram utilizados 10 *primers* que produziram 330 bandas separando os isolados em 4 grupos: um heterogêneo com linhagens de *B. bassiana* e *B. brongniartii* da Nova Zelândia e outros países, um só com *B. brongniartii* da Nova Zelândia, outro contendo somente *B. bassiana* da Nova Zelândia e um outro com outras espécies de *Beauveria* (*B. velata*, *B. caledonica*, *B. amorpha* e *B. vermiconia*). A análise da região ITS do rDNA confirmou a existência de um grupo de isolados de *B. bassiana* da Nova Zelândia geneticamente distinto.

AZEVEDO *et al.* (2000) utilizaram RAPD e ITS para investigar a variabilidade molecular entre isolados de *Paecilomyces* e para identificar cinco isolados morfológicamente atípicos, obtidos da mosca-branca, que possuíam alguma semelhança com *P. fumosoroseus*. O produto de amplificação do ITS dos cinco isolados, não identificados, deu origem aos padrões idênticos aos das linhagens de *P. fumosoroseus* utilizadas como referência. A variabilidade observada nos perfis de RAPD foi suficiente para discriminar todos os isolados. A similaridade genética entre os isolados não identificados e as linhagens de *P. fumosoroseus* foi maior do que aquela observada entre as linhagens referência desta espécie.

DRIVER *et al.* (2000) utilizaram as técnicas de RAPD e sequenciamento da região ITS do rDNA, em revisão sobre a taxonomia do gênero *Metarhizium*. Com base nas investigações, incluíram *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *M. album*, através da análise da seqüência ITS distinguiram novas variedades *M. anisopliae* var. *lepdiotum* e *M. anisopliae* var. *acridum* e organizaram dentro das espécies e suas variedades 10 grupos altamente diferenciados, demonstrando a grande diversidade específica e a complexidade desse gênero.

HUANG *et al.* (2002) utilizaram análise da região ITS do rDNA de *Cordyceps bassiana* e *Beauveria bassiana* para confirmar o teleomorfo de *B. bassiana*. Os resultados mostraram que *C. bassiana* e *B. bassiana* tem a mesma seqüência de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2, sugerindo que *C. bassiana* é o teleomorfo de *B. bassiana*.

Também introns se constituem em marcadores moleculares que podem auxiliar os estudos sobre variabilidade genética. Ocorreu em praticamente todos os seres vivos, com exceção principalmente da maioria das bactérias e podem ocorrer nos genomas nuclear, mitocondrial e cloroplastídico (CECH,1988). Eles podem ser de utilidade na taxonomia e estudos de diversidade entre e dentro de espécies.

NEUVEGLISE *et al.* (1997) em estudos da região ITS do rDNA e do intron de 47 linhagens de *Beauveria brongniartii*, 2 de *B. bassiana* e 1 de *Metarhizium anisopliae* de diferentes origens geográficas e biológicas, encontraram 14 formas variantes de intron diferindo em tamanho e padrão de restrição, em 4 posições diferentes.

MAVRIDOU *et al.* (2000) identificaram introns em três posições na região 28s do rDNA do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* var. *anisopliae* usando primers heterólogos do gene 28s do rDNA de *Verticillium dahliae*. Os produtos de PCR obtidos revelaram a presença de cinco distintos introns, posicionados em três diferentes sítios de inserção.

PATARO *et al.* (2000) avaliaram o polimorfismo entre linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* de três destilarias do Brasil. Observaram diferentes perfis utilizando o *primer* EI-1 da região intron grupo I, e detectaram alto grau de polimorfismo genético entre as linhagens das três destilarias.

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1. LINHAGENS FÚNGICAS:

Foram utilizadas 20 linhagens do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, das quais 15 provenientes da Micoteca-URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, e 5 da Coleção de Cultura de Fungos Entomopatogênicos do CENARGEN-Brasília.

Tabela 1. Linhagens de *Beauveria bassiana* utilizadas para análise de RAPD, Região ITS do rDNA e Região Intron .

REGISTRO	ORIGEM	HOSPEDEIRO	ANO
URM	GEOGRÁFICA		ISOLAMENTO
2912	Paraná	<i>Cyclonela sanguinea</i>	1987
2913	Paraná	<i>Nezara viridula</i>	1987
2915	Paraná	<i>Nezara viridula</i>	1987
2916	Brasília	<i>Coleóptera</i>	1987
2917	Minas Gerais	<i>Zulia entreriana</i>	1987
2920	Brasília	<i>Anticarsia genmatalis</i>	1987
2921	Paraná	<i>Lebia concinna</i>	1987
2923	Paraná	<i>Deois flavopicta</i>	1987
2924	Brasília	<i>Deois flavopicta</i>	1987
2926	USA	<i>Malacosoma americana</i>	1987
2927	Paraná	<i>Piezodorus guildinii</i>	1988
2929	Paraná	<i>Deois schach</i>	1988
2930	Paraná	<i>Euschistus heros</i>	1988
2933	Paraná	<i>Nezara viridula</i>	1988
2935	São Paulo	<i>Hypothenemus hampei</i>	1988
4548	Argentina	<i>Diabrotica speciosa</i>	1988
4551	Pernambuco	<i>Cosmopolites sordidus</i>	1988
4552	Goiás	<i>Chalcodermus aenus</i>	1988
4553	Goiás	<i>Lagria villosa</i>	1988
4554	Goiás	<i>Cerotoma arcuata</i>	1988

3.2.Meios de Cultura:**3.2.1. Meio Batata-Dextrose-Ágar(BDA) – Oxoid**

Batata-dextrose-ágar	39g
Água destilada	1000mL

O pH foi ajustado para 6,8 .

3.2.2. Meio Mínimo Líquido (PONTECORVO *et al.* 1953)

NaNO ₃	6,0g
KH ₂ PO ₄	1,5g
KCl.....	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5g
FeSO ₄	0,01g
ZnSO ₄	0,01g
Glicose	10g
Água destilada q.s.p.	1000mL

O pH foi ajustado para 6,8 .

3.3. Soluções e Tampões:

3.3.1. Solução de “Tween 80” 0,1% (v/v)

“Tween 80” 0,1mL
Água destilada q.s.p. 100mL

A solução de “Tween 80” foi distribuída em tubos com tampa(1mL/tubo), mantida a 4° C.

3.3.2. Solução de Brometo de Etídio (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Brometo de Etídio 0,01g
Água destilada q.s.p. 10mL

Manipulou-se uma solução estoque de 10mg/mL pela adição de 1g de brometo de etídio a 100mL de água destilada. Esta solução foi colocada em um agitador magnético por uma hora e posteriormente acondicionada em um frasco escuro sob refrigeração(4° C). No momento de uso, 5µL dessa solução foram adicionados a 10ml de TEB-1X.

3.3.3. Tampão Fenol

Foi utilizado o tampão fenol pronto para uso, fornecido pela Gibco BRL Life Technologies.

3.3.4. Solução Clorofane

Obtida a partir da mistura de um volume de fenol com um volume de clorofil na proporção 1:1.

3.3.5. Solução Clorofil:

Obtida a partir da mistura de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1.

3.3.6. NaCl 0,3M

NaCl 17,5g
Água deionizada q.s.p. 1000mL

A solução foi esterilizada e mantida a 4°C.

3.3.7. Tris[hidroximetil**] aminometano (Tris-HCl 1M) pH 8,0**

Trizma base 121g
Água deionizada q.s.p. 1000mL

Ao Tris foram adicionados 800mL de água deionizada e o pH foi ajustado para 8,0 com HCl concentrado. Depois de adicionado o HCl, a solução foi aquecida e deixada à temperatura ambiente para esfriar, e completou-se para um volume final de 1000mL.

3.3.8. Ácido Etileno Diamino Tetraacético(EDTA 0,5M) pH 8,0

EDTA 37,22g

Água deionizada q.s.p. 100mL

A solução foi agitada até a completa dissolução dos compostos sólidos.

O pH foi ajustado para 8,0 adicionado pastilhas de NaOH. A solução foi esterilizada e mantida a 4°C.

3.3.9. Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%

SDS 20g

Água deionizada q.s.p..... 200mL

Foram dissolvidos 20g de SDS (Merck) em água deionizada esterilizada. A solução foi mantida a temperatura ambiente.

3.3.10. Gel da Agarose para Eletroforese de DNA Total (0,8%)

Agarose 0,56g

TEB 1X 70mL

A agarose foi colocada em Erlenmeyer e adicionou-se o TEB-1X. A suspensão foi aquecida até total diluição.

3.3.11. Gel de Agarose para Produtos da Região ITS do rDNA (1%)

Agarose 0,90g

TEB 70mL

A agarose foi colocada em Erlenmeyer e adicionou-se o TEB-1X. A suspensão foi aquecida até a total diluição.

3.3.12 Gel de Agarose para RAPD e Restrição da Região ITS rDNA (1,4%)

Agarose 1,26g

TEB 90mL

A agarose foi colocada em Erlenmeyer e adicionou-se o TEB-1X. A suspensão foi aquecida até a total diluição.

3.3.13. Tampão TE

Tris-HCl 1M pH 8,0 1mL

EDTA 0,5M pH 8,0 1,2mL

O volume foi completado para 100ml com água deionizada. O tampão foi esterilizado e mantido a 4°C.

3.3.14. Tampão de Extração de DNA para Fungos Filamentosos (RAEDER & BRODA, 1985).

Tris-HCl 1M	2,0mL
EDTA 0,5M pH 8,0	0,5mL
SDS 10%	1,0mL
NaCl 5M	0,5mL
Água deionizada q.s.p.	6,0mL

O tampão foi preparado somente no momento do uso.

3.3.15. Tampão TEB 10X pH 8,0

Trizma base	108g
Ácido Ascórbico	55g
EDTA	20mL

O volume foi acertado para 1000mL com água deionizada e o pH para 8,0 com HCl concentrado. O tampão foi esterilizado a 120°C por 15 min e mantido a 4°C. Para uso, foi diluído com água deionizada esterilizada para concentração 1X.

3.3.16. Tampão de Amostra

Azul de bromofenol	0,25g
Ficol	15g
Água deionizada q.s.p.	100mL

A solução foi aquecida sem atingir o ponto de ebulição e estocada em alíquotas a 4°C.

3.3.17. Tampão de Amplificação 10X, Trizma Taq Polimerase, Mg⁺⁺

Tris-HCl pH 8,3	100mM
MgCl ₂	15mM
KCl	500mM

Todos fornecidos pela Gibco BRL da Life Technologies.

O tampão da reação de PCR é fornecido 10x concentrado.

A Taq polimerase é fornecida junto com o tampão e vem pronta para uso, na concentração de 5 unidades por µL.

O Mg⁺⁺ é um cofator da Taq polimerase, vem na forma de MgCl₂, acompanhando a enzima, em uma concentração de 50mM.

3.3.18. Oligonucleotídeos (*Primers*)

Foram utilizados *primers* das caixas OPA, OPW e OPX da Operon Tecnologia, para amplificar seqüências de DNA genômico, comercializados pela Operon Technologies, CA, USA. Eles foram diluídos a uma concentração estoque de 50µM em tampão TE, usando o peso molecular do *primer* individual informado pelo fornecedor.

3.3.19. dNTPs

Os dNTPs (desoxinucleotídeos trifosfatados) utilizados foram fornecidos pela GIBCO BRL, separadamente, em concentrações de 100mM. Para uso, foram misturadas partes iguais de modo a obter uma diluição de concentração final 2,5mM. Os dNTPs diluídos foram mantidos à - 20° C.

3.4. Obtenção de Micélio para Extração do DNA Genômico

Aproximadamente 10^8 conídios de cada linhagem utilizada, proveniente de tubos com meio BDA (item 3.2.1) foram suspensos em 1ml de "Tween 80"(item 3.3.1) em tubos com tampa. Este volume foi inoculado em frascos de Erlenmeyer de 250ml contendo 100mL de meio mínimo líquido (3.2.2). Após inoculação os frascos foram mantidos sob agitação de 200 rpm a 37°C por 120 horas. Em seguida, o micélio foi coletado por filtração a vácuo e lavado com água destilada autoclavada. Foi determinado o peso úmido para a extração do DNA e estocado a -20°C.

3.5. Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada segundo a técnica de RAEDER & BRODA (1985).

Foi triturado 1g de micélio em nitrogênio líquido até formar um pó, em seguida transferido para tubo de microcentrífuga onde se adicionou 1mL de tampão de extração. Após homogeneização os tubos de microcentrífuga foram incubados por 15 minutos a 65°C. Posteriormente, adicionou-se um volume de solução de fenol, misturando-se suavemente as fases e centrifugou-se por 15min a 12000 rpm. A fase aquosa foi recuperada e transferida para um novo tubo de microcentrífuga e adicionou-se um volume de clorofane. Mais uma vez foi homogenizado e centrifugado a 12000 rpm por 15min, a fase aquosa foi recuperada e transferida para um novo tubo de microcentrífuga onde foi adicionado um volume de clorofil, e novamente centrifugado. Recuperou-se mais uma vez a fase aquosa que foi colocada em outro tubo de microcentrífuga, adicionou-se o NaCl para uma concentração final de 0,3M. Em seguida adicionou-se dois volumes de etanol resfriado a -20°C, fase em que foi possível visualizar o DNA precipitado. As amostras foram submetidas novamente a centrifugação a 12000 rpm por 15min, para promover a fixação do DNA no fundo do tubo de microcentrífuga. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionou-se etanol 70% e centrifugou-se para lavagem do DNA. O sobrenadante outra vez foi descartado e os tubos invertidos para secagem completa do DNA. Os precipitados foram

cuidadosamente resuspendidos em 200µl de tampão TE pH 8,0 e guardados sob refrigeração a 4°C.

3.6. Quantificação do DNA

A quantidade de DNA foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose 8% a 3v/cm de distância entre os eletrodos, juntamente com o marcador de peso molecular em concentração conhecida (DNA de fago λ). Após eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio, por cerca de 40 minutos, em seguida observado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado.

3.7. Amplificação das Regiões ITS do rDNA

As regiões ITS1-5.8s-ITS2 do rDNA foram amplificadas por meio da técnica de PCR utilizando-se os *primers* ITS4(5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5(5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), em termociclador (*Minicycler*-MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial de 2 minutos a 95°C, 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 55°C, 2 minutos a 72°C e uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Para a amplificação das amostras utilizou-se uma mistura de reação conforme descrito na Tabela 4. Foram misturadas as quantidades apropriadas de água milli-Q esterilizada, tampão 10X, dNTPs, *primers*, MgCl₂ e Taq polimerase (MIX) em um único tubo de microcentrífuga. Adicionou-se 24µL dessa solução (para reações com volume final de 25µL) em microtubos para amplificação. Imediatamente após a adição da mistura da reação, adicionou-se 1µL das amostras de DNA previamente diluídos a uma concentração de 5ng/µL e foram adicionados 20µL de óleo mineral.

Tabela 2. Componentes da reação de amplificação para a reação de amplificação da região ITS do rDNA e respectivas concentrações.

Componentes	Volume na reação (μL)
Água Milli Q	17,25
Tampão	2,50
dNTP	2,50
MgCl ₂ (1.5mM)	0,75
ITS4 (12.5pmoles)	1,00
ITS5 (12.5pmoles)	0,50
Taq (5u/ μL)	0,50
Total	20μL

3.8. Eletroforese dos Produtos de Amplificação da Região ITS do rDNA

Foram retirados 4μL das amostras dos produtos de PCR do rDNA e misturados a 3μL do tampão de amostra(item 3.3.16), e depositados nos poços do gel de agarose a 1%(item 3.3.12), sendo TEB 1X(item3.3.15) o tampão de corrida e o marcador de peso molecular de 100pb DNA Ladder (Gibco.BRL). O gel foi submetido à eletroforese numa voltagem de 3V/cm⁻¹ (distância medida entre os eletrodos), o tempo da eletroforese foi monitorado pela migração do corante azul presente no tampão de amostra. Ao final da corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (item 3.3.2) por 30 minutos, visualizado e fotografado em transiluminador de luz ultravioleta usando filme preto e branco 667 ASA com filtro laranja.

3.9. Restrição dos Fragmentos Amplificados das Regiões ITS do rDNA

Os fragmentos amplificados da região ITS do rDNA foram digeridos com quatro enzimas de restrição *Hae* III, *Eco* RI, *Dra* I e *Msp* I,(Gibco. BRL), separadamente, por 2h a 37°C. Usando as condições e respectivos tampões (Tabela 3).

Os fragmentos da digestão foram separados em gel de agarose a 1,4%(item 3.3.11), utilizando-se o tampão de corrida TEB 1X (item 3.3.15) e marcado de peso molecular de 50pb DNA Ladder(Gibco.BRL). O gel foi submetido à eletroforese nas condições anteriores.

Tabela 3. Componentes da reação de digestão dos produtos de amplificação da região ITS do rDNA.

Componentes	Volume na reação (μL)
Enzima	0,2
Tampão (1x)	2,0
Água Milli-Q	13,8
Total	16,0 μL

3.10. Seleção de *primers* para RAPD:

O DNA total de uma das linhagens de *B. bassiana* foi utilizado para a realização da seleção de *primers*, adequados para o material em estudo. Foram testados *primers* dos Kits OPA, OPW e OPX da Operon Technologies, CA, USA.

3.11. Amplificação do DNA Para RAPD

Regiões do DNA foram amplificadas por meio da técnica de RAPD, em termociclador (*Minicycler*-MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial de 5 minutos a 92°C, 1 minuto a 92°C, 1 minuto e 30 segundos a 39°C, 2 minutos a 72°C, 5 minutos a 72°C para uma extensão final.

Para a amplificação das amostras utilizou-se uma mistura de reação conforme descrito na Tabela 3. Foram misturadas as quantidades apropriadas de água milli-Q autoclavada, tampão 10X, dNTPs, *primers*, MgCl₂ e Taq polimerase (MIX) em um único tubo de microcentrífuga. Adicionou-se 20µL dessa solução (para reações com volume final de 25µL) em microtubos para amplificação. Imediatamente após a adição da mistura da reação, adicionou-se 5µL das amostras de DNA previamente diluídos a uma concentração de 5ng/µL e foram adicionados 20µL de óleo mineral para evitar a evaporação da solução. Em seguida foram colocadas duas gotas de óleo mineral em cada poço do termociclador, cobrindo o microtubo até à superfície da solução.

Tabela 4 Componentes da reação de amplificação do DNA e respectivas concentrações utilizadas na reação de RAPD.

Componentes	Concentração estoque	Volume na reação (µL)	Concentração final
Água Milli Q	---	3,6	qsq.
Tampão	10X	2,5	1X
DNTPs	2,5mM	2,5	0,25mM
Primer	4,0mM	2,5	0,40mM
MgCl ₂	10mM	8,5	3,40mM
Taq Polimerase	5U/µl	0,4	2 unidades
DNA	5ng/µL	5,0	25ng
Total			25µL

3.12. Eletroforese dos Produtos de Amplificação para RAPD

Foram retirados 20µL das amostras do DNA amplificado e misturados a 3µL de tampão de amostra(item 3.3.16), e depositados nos poços do gel de agarose a 1,4%(item 3.3.11), sendo TBE 1X(item3.3.14) o tampão da cuba. O gel foi submetido eletroforese numa voltagem de 3V/cm⁻¹ (distância medida entre os eletrodos), ao final da corrida o gel foi corado e visualizado conforme item 3.8.

3.13. Amplificação da Região Intron

A amplificação da Região Intron foi realizada através de PCR, utilizando o primer EI -1 (5'- CTGGCTTGGTGTATGT-3') em termociclador (Minicycle-MJReserach), programado para realizar desnaturação inicial 3 minutos a 94°C, 2 minutos a 45°C e 1 minuto e 30 segundos a 74°C e uma extensão final de 5 minutos a 74 °C.

Para a amplificação das amostras utilizou-se uma mistura de reação conforme descrito na Tabela 6. Foram misturadas as quantidades apropriadas de água milli-Q esterilizada, tampão 10X, dNTPs, *primers*, MgCl₂ e Taq polimerase (MIX) em um único tubo de microcentrífuga. Adicionou-se 24µL dessa solução (para reações com volume final de 25µL) em microtubos para amplificação. Imediatamente após a adição da mistura da reação, adicionou-se 1µL das amostras de DNA previamente diluídos a uma concentração de 5ng/µL e foram adicionados 20µL de óleo mineral.

Tabela 5. Componentes da reação de amplificação da região Intron .

Componentes	Volume na reação (µL)
Água Milli Q	12,3
Tampão	2,5
BSA	2,5
dNTP	2,5
Primer	2,5
MgCl ₂ (1.5mM)	1,5
Taq (5u/ µL)	0,2
Total	24µL

3.14. Eletroforese dos Produtos de Amplificação da Região Intron

Foram retirados 4 μ L das amostras dos produtos da Região Intron e misturados a 3 μ L do tampão de amostra(item 3.3.16), e depositados nos poços do gel de agarose a 1,4%(item 3.3.11), sendo TEB 1X(item3.3.15) o tampão de corrida e o marcador de peso molecular de 1Kb DNA Ladder (Gibco.BRL). O gel foi submetido eletroforese numa voltagem de 3V/cm⁻¹ (distância medida entre os eletrodos), ao final da corrida o gel foi corado e visualizado conforme item 3.8.

3.15. Análise computacional dos dados

Os dados obtidos por amplificação ao acaso do DNA (RAPD) e Região Intron foram analisados pelo programa de microcomputador NTSYS.PC (Applied Biobalistics, Inc.), introduzidos na forma de variáveis binárias, onde o número "1"(UM) significa presença de banda e o número "0"(ZERO), ausência. Desta forma, o programa constitui uma matriz de similaridade, utilizando-se o coeficiente de JACCARD (Sneath & Socal, 1973). A partir dos dados desta matriz foi construído um dendograma pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetical averages).

4. Resultados e Discussão:

4.1. Extração e Quantificação do DNA

A Figura 1 mostra que o DNA extraído de cada linhagem apresenta-se íntegro, gerando bandas de alto peso molecular. As quantidades de DNA obtidas foram avaliadas tendo como referencial o marcador de peso molecular do DNA de fago λ , utilizado neste estudo, nas concentrações de 5,10,15 e 20ng/ μ L, respectivamente. Dessa forma, tornou-se possível avaliar que a média da quantidade de DNA no extrato das amostras está em torno de 71ng/ μ L, como é mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Concentrações estimadas de DNA genômico das linhagens de *Beauveria bassiana*.

Linhagens	Concentração (ng /μL)
2912	100
2913	50
2915	85
2916	50
2917	90
2920	80
2921	80
2923	70
2924	100
2926	40
2927	20
2929	20
2930	40
2933	80
2935	80
CG82	100
CG138	80
CG165	60
CG207	100
CG217	100

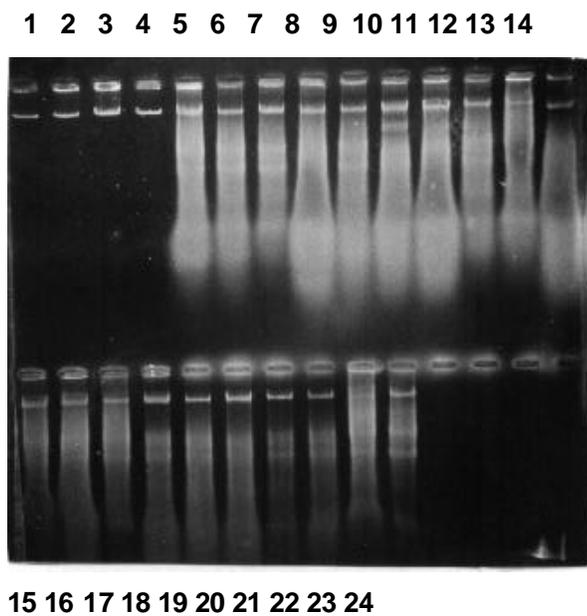


Figura 1 Quantificação do DNA genômico de 20 linhagens de *Beauveria bassiana*. Poços de 1 a 4 estão o marcador de peso molecular do DNA fago λ nas concentrações: 5, 10, 15 e 20 ng/ μ L respectivamente; e na seqüência os DNA das linhagens : 5) 2912; 6) 2913; 7) 2915; 8) 2916; 9) 2917; 10) 2920; 11) 2921; 12) 2923; 13) 2924; 14) 2926; 15) 2927; 16) 2929; 17) 2930; 18) 2933; 19) 2935; 20)4548; 21)4551; 22) 4552; 23) 4553; 24) 4554.

4.2. Análise dos Fragmentos de Digestão da Região ITS do rDNA.

O produto de amplificação com os *primers* ITS4 e ITS5 apresentou bandas com 600 e 700 pares de bases para todas as linhagens investigadas (Figura 2).

Não foram encontrados sítios de restrição quando os produtos de PCR foram digeridos com *Eco RI* e *Dra I*. As enzimas *Hae III* e *Msp I* não apresentaram polimorfismo entre as linhagens de *B. bassiana* (Figuras 3 e 4).

Análises do DNA ribossomal têm sido freqüentemente empregadas para se detectar análise da variabilidade genética (FUNGARO & VIEIRA, 1998) como mostraram BIDOCKA *et al.*, 1994 e NEUVÉGLISE *et al.*, 1997 e para identificação de espécies incluindo fungos entomopatogênicos. Os resultados de ITS mostrados neste trabalho, confirmaram que todas as linhagens são *B. bassiana*, conforme mostram as figuras 3 e 4.

1 2 3 4 5 6 M 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M 17 18 19 20

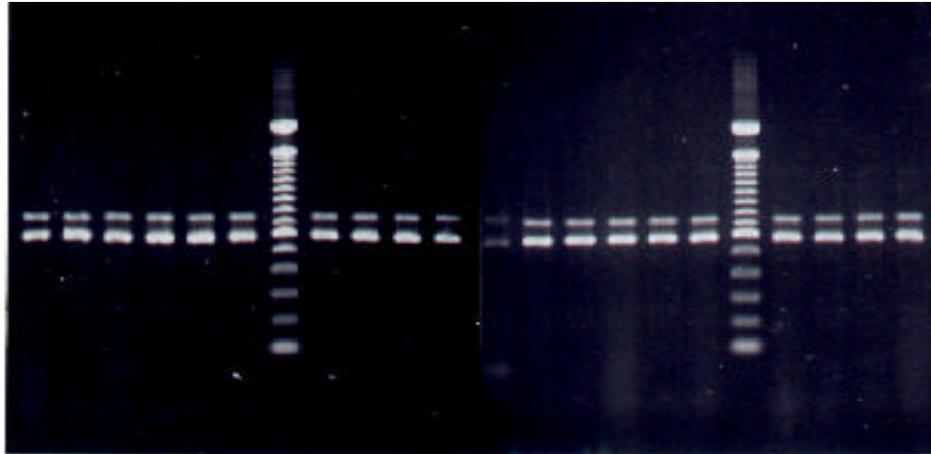


Figura 2. Produtos de amplificação da região ITS1-5.8s-ITS2 do rDNA das 20 linhagens de *Beauveria bassiana*. M: Marcador de 50pb DNA Ladder . Os DNA das 20 linhagens estão nos poços de 1 a 20: 1) 2912; 2) 2913; 3) 2915; 4) 2916; 5) 2917; 6) 2920; 7) 2921; 8) 2923; 9) 2924; 10) 2926; 11) 2927; 12) 2929; 13) 2930; 14) 2933; 15) 2935; 16) 4548; 17) 4551; 18) 4552 ; 19) 4553; 20) 4554.

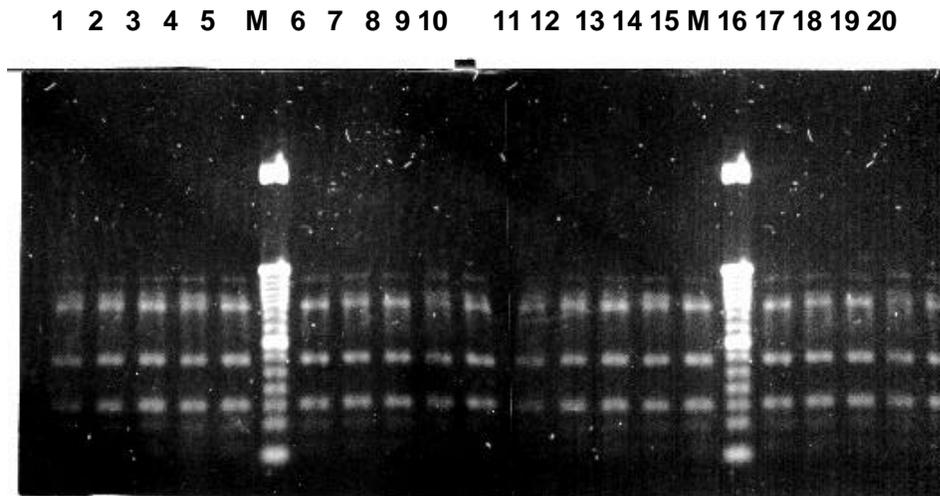


Figura 3. Produtos de digestão com a enzima *Hae* III da região ITS1-5.8s-ITS2 do rDNA das 20 linhagens de *Beauveria bassiana*. M: Marcador de 100pb DNA Ladder . Os DNA das 20 linhagens estão nos poços de 1 a 20: 1) 2912; 2) 2913; 3) 2915; 4) 2916; 5) 2917; 6) 2920; 7) 2921; 8) 2923; 9) 2924; 10) 2926; 11) 2927; 12) 2929; 13) 2930; 14) 2933; 15) 2935; 16) 4548; 17) 4551; 18) 4552 ; 19) 4553; 20) 4554.

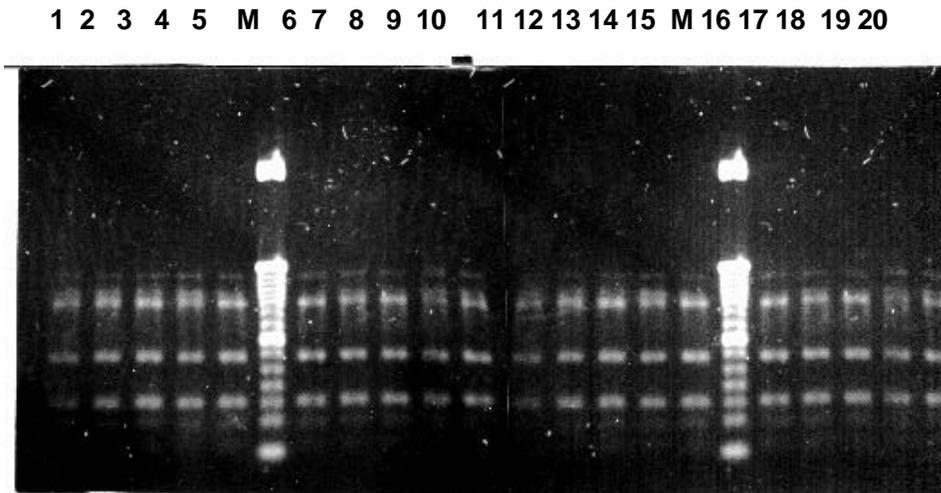


Figura 4. Produtos de digestão com a enzima *Msp* I da região ITS1-5.8s-ITS2 do rDNA das 20 linhagens de *Beauveria bassiana*. M: Marcador de 100pb DNA Ladder . Os DNA das 20 linhagens estão nos poços de 1 a 20: 1) 2912; 2) 2913; 3) 2915; 4) 2916; 5) 2917; 6) 2920; 7) 2921; 8) 2923; 9) 2924; 10) 2926; 11) 2927; 12) 2929; 13) 2930; 14) 2933; 15) 2935; 16)4548; 17) 4551; 18) 4552 ; 19) 4553; 20) 4554.

4.3. Seleção de *Primers* Para RAPD:

A linhagem de *Beauveria bassiana* 4553 foi escolhida ao acaso para os testes de seleção de *primers*. Foram testados 57 iniciadores ou *primers*, sendo 19 do Kit OPA, 20 do KIT OPW e 18 do KIT OPX, todos da Operon Technologies. Tomando como parâmetro a presença de bandas mais fortes, mais definidas e em maior número, apenas 5 *primers* testados foram escolhidos para o RAPD (Tabela 7). Nem todos os *primers* testados mostraram produtos de amplificação, como pode ser observado nas Figuras 5, 6 e 7.

Tabela 7. *Primers* selecionados para o RAPD e respectivas seqüências de nucleotídeos.

<i>Primers</i>	Direção 5' @ 3'
OPW – 19	CAAAGCGCTC
OPW – 20	TGTGGCAGCA
OPW – 04	CAGAAGCGGA
OPW – 07	CTGGACGTCA
OPX – 17	GACACGGACC

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M

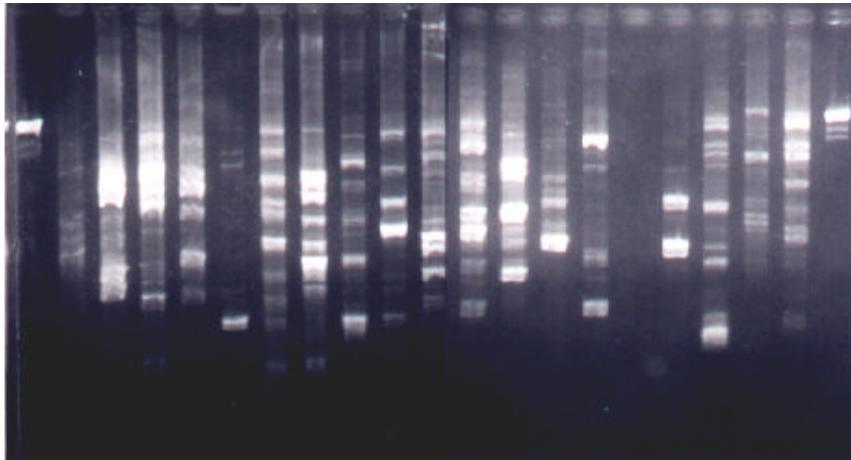


Figura 5. Seleção de *Primers* utilizando a linhagem 4553 de *Beauveria bassiana*. M: Marcador de peso molecular do DNA fago λ , cortado com a enzima HIND III; Nos poços de 1 a 19 os *primers*: 1) OPA-1; 2) OPA-2; 3) OPA-3; 4) OPA-4; 5) OPA-5; 6) OPA-7; 7) OPA-8; 8) OPA-9; 9) OPA-10; 10) OPA-11; 11) OPA-12; 12) OPA-13; 13) OPA-14; 14) OPA-15; 15) OPA-16; 16) OPA-17; 17) OPA-18; 18) OPA-19; 19) OPA-20.

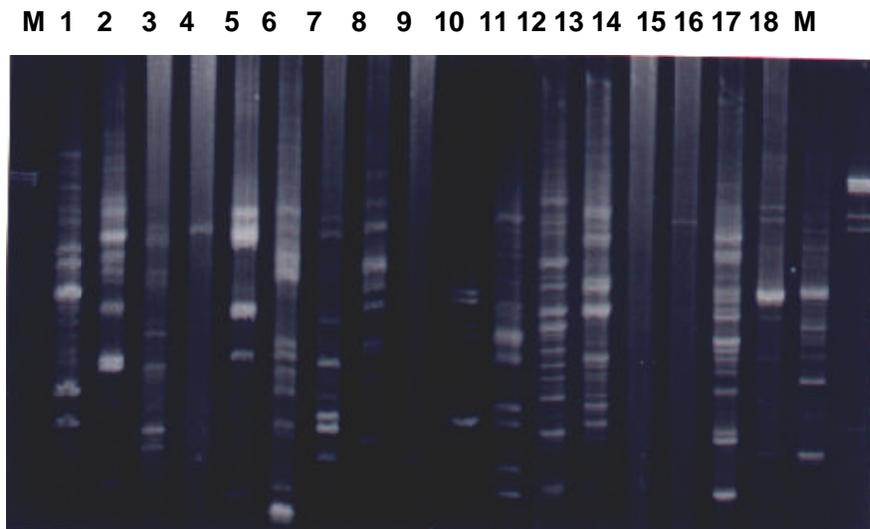


Figura 6. Seleção de *Primers* utilizando a linhagem 4553 de *Beauveria bassiana*. M: Marcador de peso molecular do DNA fago λ , cortado com a enzima HIND III; Nos poços de 1 a 18 os *primers*: 1) OPX-1; 2) OPX-2; 3) OPX-3; 4) OPX-4; 5) OPX-5; 6) OPX-6; 7) OPX-7; 8) OPX8; 9)OPX-9; 10) OPX-10; 11) OPX-11; 12) OPX-12; 13) OPX-13; 14) OPX-14; 15) OPX-15; 16) OPX-16; 17) OPX-17; 18) OPX-18 .

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M

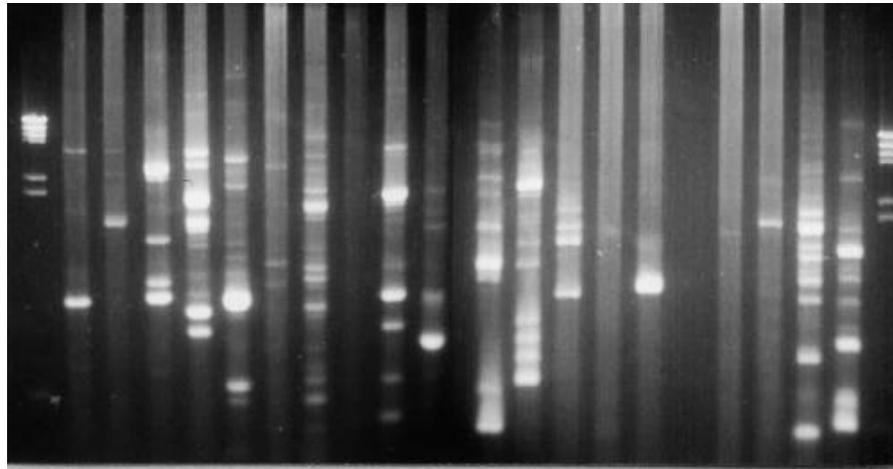


Figura 7. Seleção de *Primers* utilizando a linhagem 4553 de *Beauveria bassiana*. M: Marcador de peso molecular do DNA fago λ , cortado com a enzima HIND III; Nos poços de 1 a 20 os *primers*: 1) OPW-1; 2) OPW-2; 3) OPW-3; 4) OPW-4; 5) OPW-5; 6) OPW-6; 7) OPW-7; 8) OPW-8; 9) OPW-9; 10) OPW-10; 11) OPW-11; 12) OPW-12; 13) OPW-13; 14) OPW-14; 15) OPW-15; 16) OPW-16; 17) OPW-17; 18) OPW-18; 19) OPW-19; 20) OPW-20.

4.4. Análise da variabilidade genética do DNA genômico amplificado das linhagens de *Beauveria bassiana* pela técnica de RAPD.

Os cinco *primers* selecionados produziram um total de 442 bandas, sendo 122 bandas geradas pelo *primer* OPX-17; 108 pelo OPW -4; 52 pelo OPW-7; 87 pelo OPW-19 e 73 pelo OPW-20. Os perfis de RAPD obtidos com as vinte linhagens podem ser observados nas Figuras 8,9,10,11 e 12.

O *primer* OPW-20 gerou uma banda monomórfica, ou seja, esta banda estava presente em todas as linhagens (Figura 12).

Os dados obtidos pela análise dos perfis de RAPD foram utilizados para a construção de uma matriz de similaridade, utilizando o coeficiente de Jaccard, a partir desta matriz foi elaborado um dendrograma (Figura 13), pelo método de agrupamento UPGMA, que possibilitou a avaliação da variabilidade genética entre as linhagens.

A análise do dendrograma (Figura 13) evidenciou a formação de quatro grupos de similaridade. No primeiro estão as linhagens 2912, 2917, CG82, CG 165, CG 207, CG 217 apresentando similaridade em torno de 70%; no segundo as linhagens 2913, 2915, 2916, 2921, 2923, 2924, 2926, 2927, 2930, 2929, formam o grupo mais homogêneo, com cerca de 72% de similaridade. No terceiro grupo estão as linhagens 2920, 2933 e CG 138 com similaridade em torno de 60%, e no quarto grupo com a linhagem 2935 com similaridade em torno de 60%. As linhagens 2913 e 2915 isoladas de *Nezara viridula* e 2923 e 2924 isoladas de *Deois flavopicta* pertencentes ao grupo 2 se mostraram estreitamente relacionadas com alto nível de similaridade.

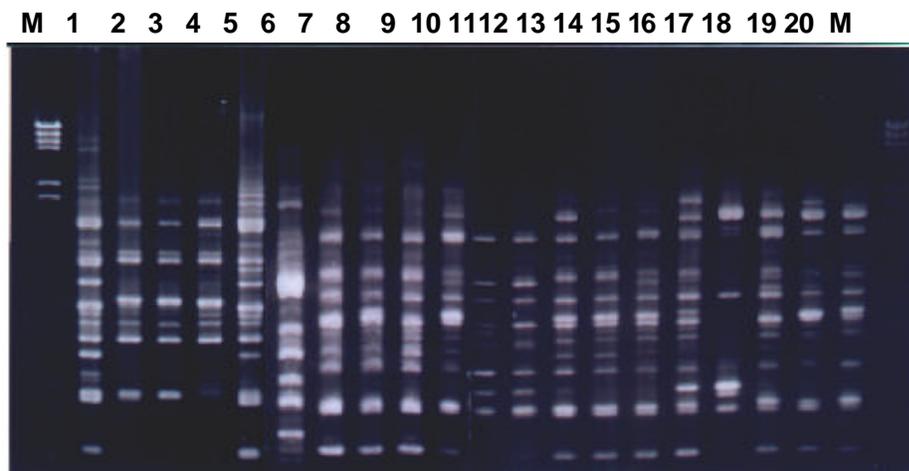


Figura 8. Perfis de RAPD de 20 linhagens de *Beauveria bassiana*, obtidos com o *primer* OPX-17. M: Marcador de peso molecular DNA de fago λ , cortado com a enzima HIND III. Os DNA das linhagens estão nos poços de 1 a 20: 1) 2912; 2) 2913; 3) 2915; 4) 2916; 5) 2917; 6) 2920; 7) 2921; 8) 2923; 9) 2924; 10) 2926; 11) 2927; 12) 2929; 13) 2930; 14) 2933; 15) 2935; 16) 4548; 17) 4551; 18) 4552 ; 19) 4553; 20) 4554.

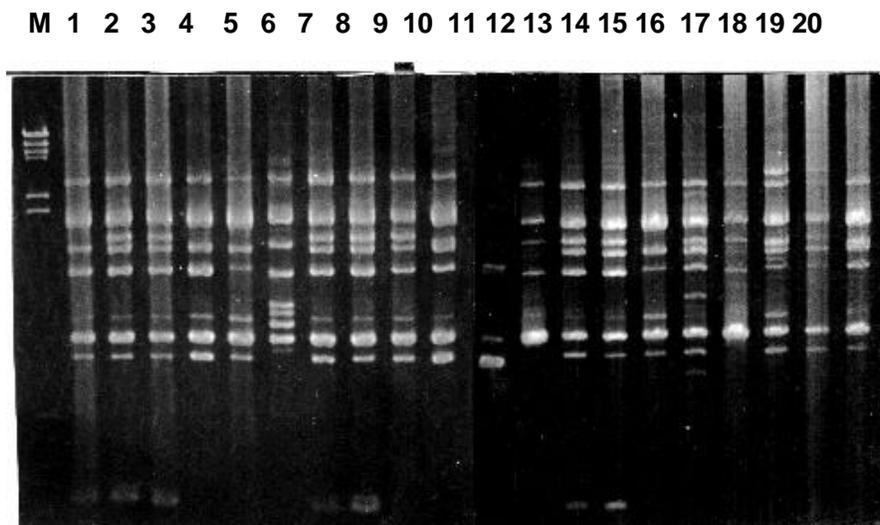


Figura 9. Perfis de RAPD de 20 linhagens de *Beauveria bassiana* obtidos com o *primer* OPW-4.M: Marcador de peso molecular DNA de fago λ , cortado com a enzima HIND III. Os DNA das linhagens estão nos poços de 1 a 20: 1) 2912; 2) 2913; 3) 2915; 4) 2916; 5) 2917; 6) 2920; 7) 2921; 8) 2923; 9) 2924; 10) 2926; 11) 2927; 12) 2929; 13) 2930; 14) 2933; 15) 2935; 16) 4548; 17) 4551; 18) 4552 ; 19) 4553; 20) 4554.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M

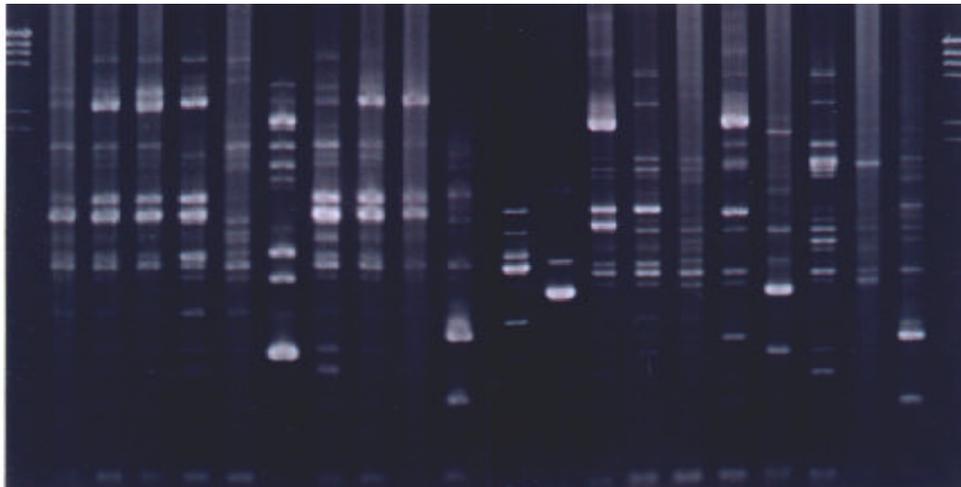


Figura 10. Perfis de RAPD de 20 linhagens de *Beauveria bassiana* obtidos com o *primer* OPW-7. M: Marcador de peso molecular DNA de fago λ , cortado com a enzima HIND III. Os DNA das linhagens estão nos poços de 1 a 20: 1) 2912; 2) 2913; 3) 2915; 4) 2916; 5) 2917; 6) 2920; 7) 2921; 8) 2923; 9) 2924; 10) 2926; 11) 2927; 12) 2929; 13) 2930; 14) 2933; 15) 2935; 16) 4548; 17) 4551; 18) 4552; 19) 4553; 20) 4554.

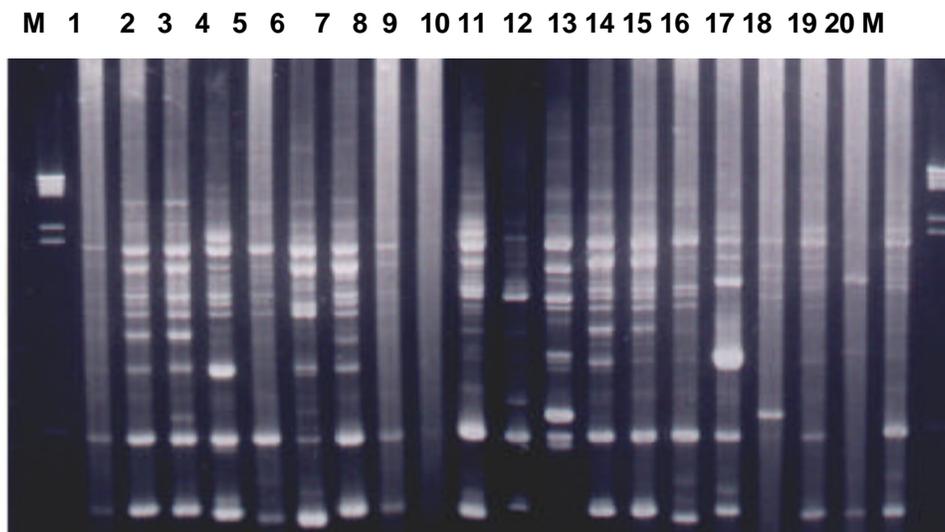


Figura 11. Perfis de RAPD de 20 linhagens *Beauveria bassiana*, obtidos com o *primer* OPW-19. M: Marcador de peso molecular DNA de fago λ , cortado com a enzima HIND III. Os DNA das linhagens estão nos poços de 1 a 20: 1) 2912; 2) 2913; 3) 2915; 4) 2916; 5) 2917; 6) 2920; 7) 2921; 8) 2923; 9) 2924; 10) 2926; 11) 2927; 12) 2929; 13) 2930; 14) 2933; 15) 2935; 16) 4548; 17) 4551; 18) 4552; 19) 4553; 20) 4554.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M

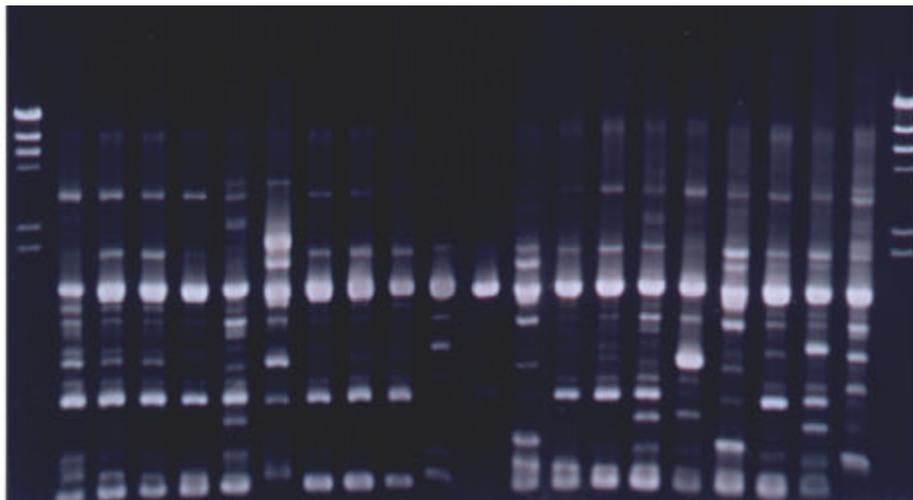


Figura 12. Perfis de RAPD de 20 linhagens de *Beauveria bassiana* , obtidos com o *primer* OPW-20. M: Marcador de peso molecular DNA de fago λ , cortado com a enzima HIND III. Os DNA das linhagens estão nos poços de 1 a 20: 1) 2912; 2) 2913; 3) 2915; 4) 2916; 5) 2917; 6) 2920; 7) 2921; 8) 2923; 9) 2924; 10) 2926; 11) 2927; 12) 2929; 13) 2930; 14) 2933; 15) 2935; 16) 4548; 17) 4551; 18) 4552 ; 19) 4553; 20) 4554.

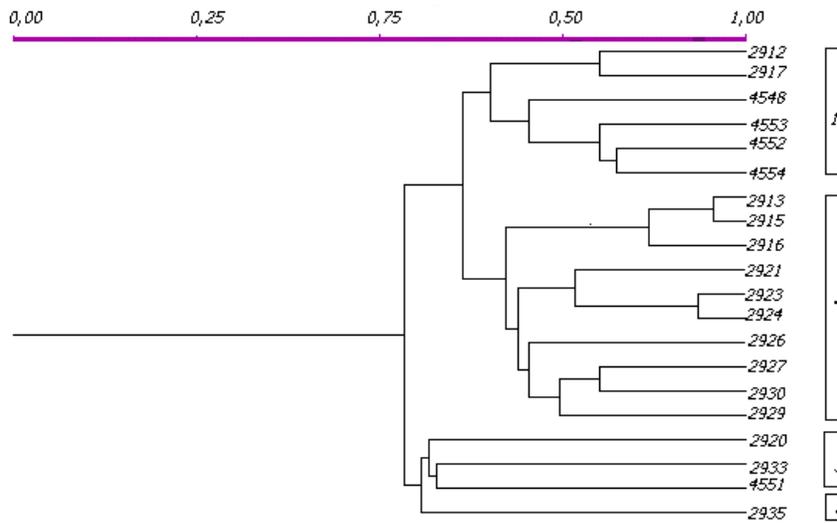


Figura 13. Dendrograma obtido com os perfis de RAPD de 20 linhagens de *Beauveria bassiana*.

4.5. Análise do perfil da Região Intron

A análise dos produtos de PCR da Região Intron usando o *primer* EI-1 foi utilizada para avaliar a variabilidade entre 20 linhagens de *B. bassiana*.

O *primer* utilizado produziu um total de 86 bandas que podem ser observadas na figura 14, onde foi evidenciada a presença de uma banda monomórfica.

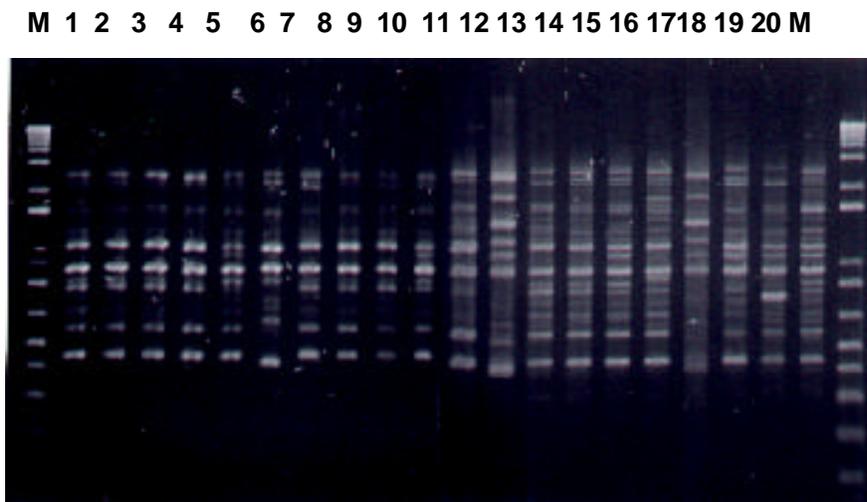


Figura 14. Produtos de amplificação da região Intron das 20 linhagens de *Beauveria bassiana*. M: Marcador Kb DNA ladder.

Os DNA das 20 linhagens estão nos poços de 1 a 20: 1) 2912; 2) 2913; 3) 2915; 4) 2916; 5) 2917; 6) 2920; 7) 2921; 8) 2923; 9) 2924; 10) 2926; 11) 2927; 12) 2929; 13) 2930; 14) 2933; 15) 2935; 16) 4548; 17) 4551; 18) 4552 ; 19) 4553; 20) 4554.

Os dados obtidos pela análise dos perfis da Região Intron foram utilizados para a construção de uma matriz de similaridade, utilizando o coeficiente de Jaccard, a partir desta matriz foi elaborado um dendrograma (Figura 15), pelo método de agrupamento UPGMA, através do qual foi possível a avaliação da variabilidade genética entre as linhagens.

Através da análise do dendrograma é possível visualizar a formação de cinco grupos. No primeiro grupo estão as linhagens 2912, 2913, 2915, 2916 2933 com similaridade em torno de 75%. No segundo grupo as linhagens 2921, CG217, 2923, 2924, 2926, 2930, 2927, 2929 e CG207, com similaridade em torno de 75%, sendo os primeiros grupos os mais homogêneos. No terceiro grupo as linhagens CG165, 2917 e CG82 com similaridade em torno de 70% . O quarto grupo com apenas uma linhagem 2920, com alta variabilidade em relação aos demais grupos, em torno de 35%, como também o quinto grupo com duas linhagens 2935 e CG 138.

As linhagens 2913, 2915 e 2933 isoladas de *Nezara viridula* encontram-se no grupo 1, apresentando alta similaridade, como também as linhagens 2923 e 2924 isoladas de *Deois flavopicta* que encontram-se em um mesmo grupo, mostrando que estas linhagens encontram-se estreitamente relacionadas.

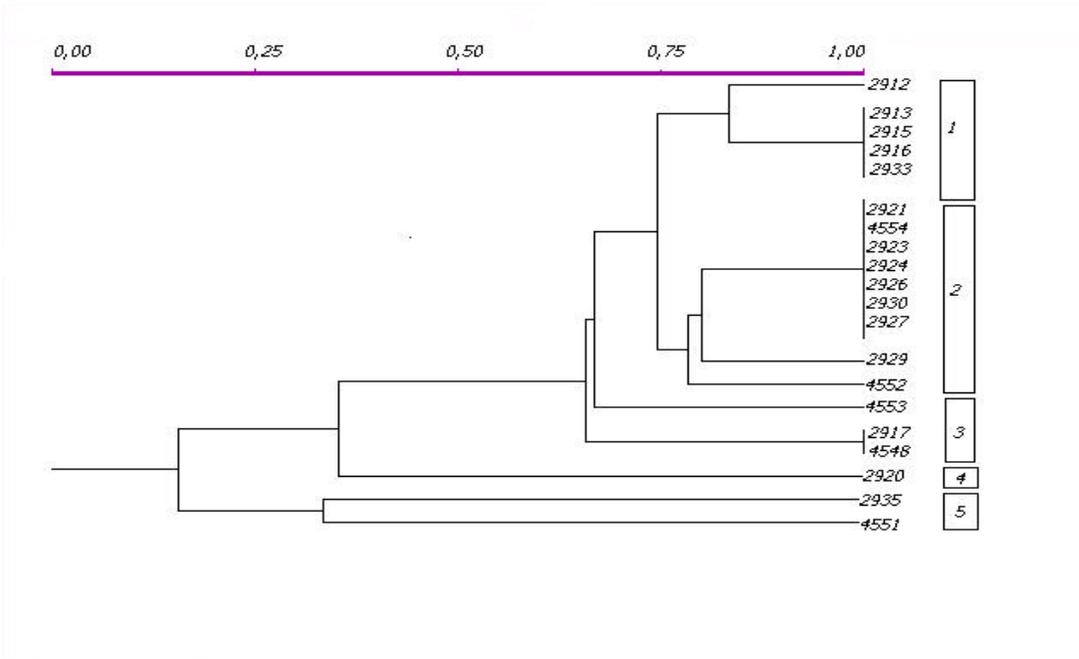


Figura 15. Dendrograma obtidos com perfis da Região Intron de 20 linhagens de *Beauveria bassiana*.

Estudos sobre a variação genética de fungos entomopatogênicos associados aos insetos tem mostrado diferentes níveis de polimorfismo. CASTRILLO & BROOKS (1999) encontraram diferentes níveis de similaridade genética ao estudarem a variabilidade intra e inter linhagens de *B. bassiana*, isoladas de uma mesma região e de regiões diferentes, associadas a *Alphitobius diaperinus* e *Coleomegilla maculata*. As linhagens coletadas de diferentes espécies de inseto e de mesma região mostraram alta similaridade, em torno de 98%, como também com insetos de regiões diferentes, em torno de 99%. Estes resultados indicam que as linhagens geneticamente similares têm sido encontradas infectando insetos de mesma espécie coletados em diferentes regiões. Estes dados concordam com os resultados obtidos no presente trabalho, quando detectou-se alto nível de similaridade, tanto em linhagens infectando a mesma espécie de insetos de mesma região quanto de regiões diferentes, como acontece com as linhagens 2923 e 2924 ambas isoladas de *Deois flavopicta*, sendo a primeira oriunda do Paraná e a segunda de Brasília.

A variabilidade genética entre 23 isolados de *B. bassiana* sobre ninfas de *Triatoma infestans*, foi avaliada por LUZ *et al.*, (1998) que detectaram alto grau de similaridade entre as linhagens, em torno de 73%, dados que corroboram com os obtidos neste trabalho, onde a similaridade foi elevada (70%). Resultados que concordam também com os de DEVI *et al.*, (2001) quando constataram alta similaridade, em torno de 70%, entre linhagens de *B. bassiana* isoladas de larvas de *Chilo partellus*, sendo que os grupos formados, foram baseados no grau de virulência das linhagens usadas.

De acordo com os dados obtidos no presente trabalho foi detectada baixa variabilidade intraespecífica, concordando com os resultados obtidos por BIDOCKA *et al.* (1994) quando por meio de RAPD avaliaram a variabilidade genética entre 24 amostras de *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* e *B. bassiana*, isoladas de diferentes espécies de hospedeiros e regiões diversificadas. Constataram que *M. flavoviride* e *B. bassiana* apresentaram um baixo nível de variabilidade intraespecífica quando comparado a *M. anisopliae* que apresentou alta diversidade.

Pela análise dos dendrogramas foi possível observar que a origem geográfica e o hospedeiro das linhagens estudadas não determinaram a formação dos grupos, exceto para as linhagens 2913, 2915, 2923 e 2924. Estes dados concordam com os resultados obtidos por BERRETA *et al.* (1998) quando detectaram a diversidade e alta similaridade genética entre amostras de *B. bassiana* da Argentina e do Brasil isoladas de espécies de hospedeiros diferentes. Sugeriram que não há correlação com a origem geográfica ou o hospedeiro, embora tenha sido formado um grupo com 80% de similaridade representado pelos isolados que exibiram maior virulência sobre *Diatraea saccharalis*.

Os resultados apresentados neste trabalho se contrapõem com os obtidos por MAURER *et al.* (1997) quando avaliaram amostras de *B. bassiana* isoladas de diversas espécies de insetos originadas de várias regiões, por RAPD e concluíram que houve formação de grupos similares e que os mesmos demonstraram maior similaridade entre as populações de *B. bassiana* e algumas espécies de hospedeiros. Também, AZEVEDO (1996) ao estudar a variabilidade genética entre isolados de *B. bassiana* provenientes da região Nordeste, constatou uma certa homogeneidade entre os isolados coletados de uma mesma espécie de inseto.

Os dados obtidos neste trabalho concordam com os de CASTRILLO & BROOKS (1998) que detectaram por meio da técnica de RAPD, que ocorreu variabilidade não só entre as linhagens de *B. bassiana* de diferentes regiões, mas também entre as linhagens coletadas de um mesmo hospedeiro; os resultados neste trabalho mostram que as linhagens 2913 e 2915 isoladas de *Nezara viridula* no Estado do Paraná estão no mesmo grupo, mas uma outra linhagem a 2933 isolada da mesma espécie de hospedeiro e do mesmo estado, encontra-se em grupo distinto. Pela análise da Região Intron as três linhagens oriundas de *N. viridula* caem no mesmo grupo, bem como as duas isoladas de *D. flavopicta*. Entretanto, ambos os grupos são capazes de ocupar o mesmo habitat ao mesmo tempo. *B. bassiana* apresentou a parasexualidade em condições de laboratório como demonstraram PACCOLA-MEIRELLES & AZEVEDO (1991), evidências sugerem que a recombinação genética entre diferentes genótipos é rara ou ausente na natureza. Portanto, co-habitação por diferentes genótipos é esperada, e o polimorfismo genético entre isolados de mesmo um hospedeiro e localização

geográfica já foi observado antes por FEGAN *et al.*, (1993), TIGANO-MILANI *et al.*,(1995), e PROPAWISK *et al.*, (1998).

5. Conclusões:

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- Não houve polimorfismo entre as linhagens utilizadas, pela análise da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, o que confirma pela alta homologia que elas pertencem a uma mesma espécie, a *B. bassiana*;
- Não foi detectada correlação entre grupos de similaridade e hospedeiro ou origem geográfica;
- Por meio da técnica de RAPD detectou-se variabilidade entre as linhagens de *B. bassiana*, com nível de similaridade em torno de 70%.
- Os dados obtidos pela análise da Região Intron das linhagens mostram a formação de 5 grupos. Alta similaridade em pelo menos três linhagens (2913, 2915 e 2933) de um mesmo hospedeiro (*Nezara viridula*) e duas (2923 e 2924) de outro (*Deois flavopicta*) foi detectada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALEXOPOULOS C. J. & MIMS, C. W. Introduction Mycology. New York, John Wiley, 1979, 632p.

ALVES, S. B.; FERRAZ, L. C. C. B. & BRANCO, Jr. A. C. Chave para Identificação de Patógenos de insetos. In: S. B. ALVES. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba-SP. FEALQ, p.1039-1074, 1998.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: S. B. Alves. **Controle Microbiano de Insetos** – 2ed. Piracicaba-SP: FEALQ, p. 289-371, 1998.

ATHAYDE, A. C. R.; BARRETO, C. A. & LUNA-ALVES LIMA, E.A. Efeito de *Beauveria bassiana* sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* do semiárido paraibano. **XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, Salvador –BA, p.96, 1999a.

ATHAYDE, A. C. R.; BARRETO, C. DE A. & LUNA-ALVES LIMA, E. A. Efeito de *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* do semi-árido paraibano – PB. **XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária** Salvador-BA, p. 95-96, 1999b.

ATHAYDE, A. C. R.; FERREIRA, U. L. & LUNA-ALVES LIMA, E. A. **Fungos Entomopatogênicos Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. V.21, p. 12-15, 2001.

AZEVEDO, A. C. S. **Variabilidade genética entre isolados de *Beauveria bassiana* obtidos de *Schizoterium palens*, *Castnia licus* e *Deois flavopicta***. Monografia. Londrina, Universidade Estadual de Londrina, 61p, 1996.

AZEVEDO, J. L. Controle microbiano de inseto-pragas e seu melhoramento genético. In: I. S. Melo & J.L. Azevedo. **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, p.69-96, 1998a.

AZEVEDO, J. L. Engenharia Genética Aplicada ao Controle Microbiano de Insetos. In: S. B. Alves. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba-SP. FEALQ, p. 239-267, 1998b.

AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOSA-GÓMEZ, D.R. & FUNGARO, M. H. P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina:Hyphomycetes) isolates. **Scientia Agricola**, v.57, p.729-732,2000.

BELLO, V. A. & PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Localization of auxotrophic and benomyl resistance markers through the parasexual cycle in *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.72, p. 119-125, 1998.

BENHAM, R. W. & MIRANDA, J. L. The genus *Beauveria*, morfological and taxonomical studies of several species and of two strains isolated from wharf-piling bores. **Mycologia**, v.45, p. 727-746, 1953.

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

BIDOCHKA, M. J.; McDONALD, M. A.; St-LEGER, R. J. & ROBERTS, D. W. Differentiation of species and strains of entomopatogenic fungi by Randon Amplified Polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetics**, v. 25, p.107-113, 1994.

BITTENCOURT, U. R. E. P. Controle Biológico de Carrapatos. In: J. S. MELO & J. L. AZEVEDO. **Controle Biológico**, EMBRAPA. Jaguariúna-SP, p.146-171, 2000.

BONATELI, Jr. R.; AZEVEDO, J. L. & VALENT, G. V. Parasexuality in a citric acid producing strain by *Aspergillus niger*. **Revista Brasileira de Genética**, v.6, p.399-405, 1983.

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

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

CHECH, R. T. Conserved sequences and structures of group I introns: Building an active site for RNA catalysis— A review. **Gene**, v. 73, p.259-271, 1988.

CLARKSON, J. M. Molecular approaches to the study of entomopathogenic fungi. In: C. J. Lomer and C. Prior. **Biological Control of Locusts and Grasshoppers**, CAB Int., Wallington, UK, p.191-199, 1992.

CRAVANZOLA, F.; PIATTI, P. BRIDGE, P. D. & OZINO, O. I. Detection of genetic polymorphism by RAPD-PCR in strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii* isolated from European cockchafer (*Melolontha* spp.). **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p.289-294, 1997.

DE HOOG, C. S. The Genera *Beauveria*, *Izaria*, *Tritirachium*, and *Acrodontium* gen. Nov. **Studies in Mycology**, v.1, , p.1-41, 1972.

DEVI, K. U.; PADMAVATHI, J.; SHARMA, H. C. & SEETHARAMA, N. Laboratory evaluation of the virulence of *Beauveria bassiana* isolates to the sorghum shoot borer *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera:Pyralidae) and their characterization by RAPD-PCR. **World Journal of Mycology & Biotechnology**, v.17, p.131-137, 2001.

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

FARAH, S. B. **DNA Segredos e Mistérios**. São Paulo. SARVIER, 1997, 276p.

FEGAN, M.; MANNERS, J. M.; MACLEAN, D. J.; IRWIN, J. A. G.; SAMUELS, K. D. Z.; HOLDOM, D. G.; & LI, D. P. Random Amplified Polymorphic DNA markers reveal high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal General Microbiology**, v. 139, p.2075-2081, 1993.

FERREIRA , M. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília. EMBRAPA/CENARGEN, 1998, 220p.

FOSTER, L. M.; KOZAK, K. R.; LOFTUS, M. G.; STEVENS, J. J. & ROSS, K. I. The Polymerase Chain Reaction and its application to filamentous fungi. **Mycological Research**, v.97, p.769-781, 1993.

FUNGARO, M. H. P & VIEIRA, M. L. C. Aplicações da PCR em Ecologia Molecular. In: I. S. Melo, de J. L. Azevedo. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa, C.A.,p.205-227, 1998.

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

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

GUARANA, C. F. R. **Aspectos citológicos e produção de enzimas extracelulares de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolado de *Cosmopolites sordidus* Germar, 1824 (Coleoptera:Curculionidae)** Dissertação de Mestrado, Recife, UFPE, 94p., 1992.

HEGEDUS, D. D. & KHACHATOURIANS, G. G. Identification of molecular variations in mitochondrial DNAs of members of the genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Peecilomyces*, and *Metharizium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p.4283-4288, 1998.

HUANG, Bo.; CHUN-RU, Li.; ZHEN-GANG, Li.; MEI-ZHEN, FAN. & ZENG-ZHI, LI. Molecular identification of the teleomorph of *Beauveria bassiana*. **Mycotaxon**, v.81, p.229-236, 2002.

HUSSEY, N. W. & TINSLEY, T. W. Impressions of insect pathology in the people's republic of China. In: H. D. Burges. **Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970-1980. London, Academic Press**, p. 785-795,1981.

KACHATOURIANS, G.G. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. In: D. K. ARORA, B. RAI. & I. MUKERII. *et al.* **Handbook of Applied Micology**. New York: Merce! Derkker, p. 613-663, 1996.

KENDRICK, B. **The Fifth Kingdom**. Newbury port: Focus Information Group, 449p.1996.

LEAL, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; BUTT. T. M. & PEBERDY, J. F. Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* by RAPD-PCR. **Mycological Research**, v.98, p.1077-1081, 1994.

LEAL, S. C. M. **Detection and Characterisation of *Metarhizium anisopliae* Using Molecular Markers**. PhD, University of Nottingham, 215p, 1996.

LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; BUTT, T. M.; PEBERDY, J. F. & BERTIOLI, J. D. Genetic exchange in *Metarhizium anisopliae* strains co-infecting *Phaedon cochleariae* is revealed by molecular markers. **Mycological Research**, v. 104, p.409-414, 2000.

LUNA-ALVES LIMA, E. A. Aspectos do ciclo biológico de *Beauveria bassiana* em meios de cultura sólidos e líquidos. **Biológica Brasílica**, v.1, p147, 1989a.

LUNA-ALVES LIMA, E.A. Aspectos taxonômicos e citológicos de Hyphomycetes (Deuteromycotina) entomopatogêncios. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**.v.84, p.17-20, 1989b.

LUNA-ALVES LIMA, E.A. & TIGANO, M. S. Citologia das estruturas leveduriformes de *Beauveria bassiana* em meios de cultura líquidos e na hemolinfa de *Spodoptera frugiperda*. **Revista de Microbiologia**, v.20, p.85-94, 1989.

LUNA-ALVES LIMA, E. A.; FERREIRA, U. L. & ATHAYDE, A. C. R. Ação de *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride* e *Beauveria bassiana* sobre ovos de *Boophilus microplus* em temperatura ambiente. **III Congresso Brasileiro de Micologia**, p.36, 2001.

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

MAGALHÃES, B. P. & FARIA, M. R. de. Desenvolvimento de bioinseticida para o controle de gafanhotos no Brasil. 4º Curso de Controle Microbiano de Insetos. Anais, Brasília, EMBRAPA, 6-11, 1996.

MAGALHÃES, B. P.; FARIA, M. R. & SILVA, J. B. T. Controle Microbiano de Gafanhotos. In: I.S. MELO & J. L AZEVEDO. **Controle Biológico**, EMPRAPA. Jaguariúna-SP, p.179-211, 2000.

MAJER, D.; MITHEN, R.; LEWIS, B. G.; VOS, P. & OLIVER, R. P. The use of AFLP fingerprint for the detection of genetic variation in fungi. **Mycological Research**, v.100, p.1107-1111, 1996.

MALAGODI, M. & VEIGA, A. F. S. L. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o cupim *Nasutitermes* (Dudley) (Isoptera:Termitidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.24, p.315-321, 1995.

MAURER, P.; COUTEAUDIER Y.; GIRARD, P. A.; BRIDGE, P.D. & RIBA, G. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatdness to host insect range. **Mycological Research**, v.101, p.159-164, 1997.

MAVIDROU, A.; CANNONE, I.; TYPAS, M.A.; Identification group I introns at three different positions within the 28s rDNA gene of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Fungal Genetics and Biology**, v.31, p.79-90, 2000.

NEUVÉGLISE, C.; BRYGOO, Y. & RIBA, G. 28s rDNA group I introns: A powerful tool for identifying strains of *Beauveria brongniartii*. **Molecular Ecology**, v.6, p.373-381, 1997.

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

PACCOLA-MEIRELLES, L. D. **Variabilidade e recombinação genética no Deuteromiceto *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.** Tese de Doutorado. Piracicaba: ESALQ, 193p, 1988.

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

PACCOLA-MEIRELLES, L. D. & AZEVEDO, J. L. Genetic recombination by protoplast fusion in the Deuteromycete *Beauveria bassiana*. **Revista Brasileira de Genética**, v. 17, p. 15-18, 1994.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; BOAS, A. M. V. & AZEVEDO, J. L. Obtention and evaluation of pathogenicity of ultra-violet resistant mutant in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Revista de Microbiologia**, v.28, p.121-124, 1997.

PAIVA, L. M.; PADOVAN, I. P. & LUNA-ALVES LIMA, E.A. Scanning electron microscopy of vegetative form of *Beauveria bassiana*(Bals.) Vuillemin. strain stored in mineral oil. **Boletim Micológico**, v.11, p.81-86, 1996.

PATARO, C.; GUERRA, J.B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; LINARDI, V.R. & ROSA, C.A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.24-31, 2000.

PIATTI, F.; CRAVANZOLA, F.; BRIDGE, P.D. & OZINO, O. I. Molecular characterization of *Beauveria brongniartii* isolates obtained from *Melolontha melolontha* in Valle d'Aosta (Italy) by RAPD-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p.317-324, 1998.

PIMENTEL, I. C.; CAMPOS, R.A.; ARAÚJO, W. L.; BARROS, N. M. & AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi isolated from maize and their possible rate for biological control. **7th International Mycological Congress**, Oslo, p.169, 2002.

POPRAWSKI, T. J.; RIBA, G.; JONES, W. A.; & AOUN, A. Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina:Hyphomycetes) established from *Sitona weevils* (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, v.17, p.275-279, 1998.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L. M.; MACDONALD. K. D.; & BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v.5, p-140-148, 1953.

PUTERKA, G. J. ; BLACK, W. C. ; STEINER, W. M. & BURTON, R. L. Genetic variation and phylogenetic relation ships among world wide collections of Russian Wheat aphid, *Diuraphis noxia*(Morlvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. **Heredity**, v.70, p.604-618, 1993.

QUINTELA, E. D.; WRAIGHT, S. P.; QUINDERE, M. A.W. & ROBERTS, D. W. Aplicação de conídios de *Beauveria bassiana*(Bals.) Vuill e *Metarhizium anisopliae*(Metsch.) Sorokin. para controle de larvas de *Chalcodermus bimaculatus* Boil (Coleoptera:Curculionidae) no solo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.23, p.367-377, 1994.

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

SAIKI, R. K. Enzymatic amplification of β -globin sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** , v.230, p.1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J.; FRISTCH, E. F. & MANIAIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. New York. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989,89p.

SAMSON, R. A. Identification of entomopathogenic Deuteromycetes. In: H. D. BURGESS. **Microbial Control of Pests and Plant Diseases**, 1970-1980. London, Academic Press, p.93-106, 1981.

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

SILVEIRA, W. D. & AZEVEDO, J. L. Protoplast fusion in *Metarhizium anisopliae*. **Enzyme Microbiology**, v.9, p.149-152, 1987.

SNEATH, P. H. & SOBRAL, R. R. **Numerical Taxonomy**. Freeman, San Francisco, 1973.

STUMMER, B. E.; ZANKER, T.; SCOTT, E. S. & WHISSON, D. L. Genetic diversity in populations of *Uncinula necator*. Comparasion of RFLP and PCR- based approaches. **Mycological Research**, v.104, p.44-52, 2000.

TAMAI, M. A.; ALVES, S. B. & NEVES, P. J. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Ao Ácaro *Tetranychus urticae* Koch. **Scientia Agricola**, v.56, p. 57-60, 1999.

TIGANO-MILANI, M. S.; HONEYCUTT, R. J.; LACEY, L. A.; ASSIS, R.; McCLELLAND, M. & SOBRAL, B. W. S. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular marker. **Journal of Invertebrate Pathology** 65: 274-282, 1995.

URTZ, B.E. & RICE, W.C. RAPD-PCR characterization of *Beauveria bassiana* isolates from the rice water weevil *Lissorhoptrus oryzophilus*. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, p. 405-409, 1997.

VILAS-BOAS, A. M. V.; OLIVEIRA, J. V.; CAMPOS, A. L.; ANDRADE, R. M. & SILVA, R. L. X. Patogenicidade de linhagens selvagens e mutantes de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* a *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera, Bruchidae). **Arquivos de Biologia Tecnologia**. v.39, p. 99-104, 1996.

WELSH, J. & McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.64-68, 1990.

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

Matriz de similaridade genética construída a partir da análise dos perfis da Região Intron através do coeficiente de Jaccard.

2912 1.000
2913 0.833 1.000
2915 0.833 1.000 1.000
2916 0.833 1.000 1.000 1.000
2917 0.500 0.600 0.600 0.600 1.000
2920 0.286 0.333 0.333 0.333 0.200 1.000
2921 0.667 0.800 0.800 0.800 0.750 0.400 1.000
2923 0.667 0.800 0.800 0.800 0.750 0.400 1.000 1.000
2924 0.667 0.800 0.800 0.800 0.750 0.400 1.000 1.000 1.000
2926 0.667 0.800 0.800 0.800 0.750 0.400 1.000 1.000 1.000 1.000
2927 0.833 1.000 1.000 1.000 0.600 0.333 0.800 0.800 0.800 0.800 1.000
2929 0.200 0.222 0.222 0.222 0.000 0.286 0.111 0.111 0.111 0.111 0.222 1.000
2930 0.667 0.800 0.800 0.800 0.750 0.400 1.000 1.000 1.000 1.000 0.800 0.111 1.000
2933 0.667 0.800 0.800 0.800 0.750 0.400 1.000 1.000 1.000 1.000 0.800 0.111 1.000 1.000
2935 0.571 0.667 0.667 0.667 0.600 0.333 0.800 0.800 0.800 0.800 0.667 0.222 0.800 0.800 1.000
4548 0.500 0.600 0.600 0.600 1.000 0.200 0.750 0.750 0.750 0.750 0.600 0.000 0.750 0.750 0.600 1.000
4551 0.143 0.167 0.167 0.167 0.000 0.250 0.200 0.200 0.200 0.200 0.167 0.333 0.200 0.200 0.167 0.000 1.000
4552 0.571 0.667 0.667 0.667 0.600 0.333 0.800 0.800 0.800 0.800 0.667 0.100 0.800 0.800 0.667 0.600 0.167 1.000
4553 0.500 0.600 0.600 0.600 0.500 0.500 0.750 0.750 0.750 0.750 0.600 0.125 0.750 0.750 0.600 0.500 0.250 0.600 1.000
4554 0.667 0.800 0.800 0.800 0.750 0.400 1.000 1.000 1.000 1.000 0.800 0.111 1.000 1.000 0.800 0.750 0.200 0.750 0.800 1.000

PIRES, A. P. D.

Diversidade Genética e Caracterização. . .

2