

Entomopatogenicidade de *Beauveria Bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 e *Metarhizium Anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 no Controle de Dípteros Muscóides

Simone Christianes Cavalcanti

1. INTRODUÇÃO

Os dípteros muscóides assumem importância em Saúde Pública devido ao alto grau de sinantropia, que possibilita a veiculação de agentes etiológicos de doenças ao homem e animais – como fungos, ovos de helmintos, cistos de protozoários e enterovírus, sendo muitos destes patógenos responsáveis pela maioria das diarreias infantis – e ainda por algumas espécies serem causadoras de miíases, conforme Greenberg (1971 e 1973); Furlanetto e colaboradores (1984); Queiroz e colaboradores (1999); Oliveira (1999); Norberg e colaboradores (1999); Schüller (2000); Oliveira e colaboradores (2002); Sukontason e colaboradores (2005).

Guimarães e colaboradores (1978) registraram a introdução de três espécies de moscas varejeiras do gênero *Chrysomya*, oriundas da África, no sul do Brasil: *C. albiceps* (Wiedemann, 1818), *C. megacephala* (Fabricius, 1794) e *C. putoria* (Wiedemann, 1819). E em 1982, Prado e Guimarães relataram que estas espécies encontravam-se amplamente distribuídas em todo o Brasil, sendo que Baumgartner (1988) observou a sua existência na região neotropical.

De acordo com Guimarães e colaboradores (*op.Cit.*), estas espécies apresentam perigo de transmissão de doenças por serem criadas em diferentes biótopos, como feiras livres, mercados, peixarias, lixeiras, fezes, carcaças humanas e de animais, bem como em tecidos necrosados.

Outros muscóides causam impacto na agricultura e na indústria biotecnológica, que gastam quantias exorbitantes em pesquisas com inseticidas químicos, cada vez menos eficazes devido à resistência de várias espécies, e com alta taxa de residualidade para os sistemas biológicos de ani-

mais e vegetais. Este último fator torna-se uma grave ameaça para as populações humanas, visto que estas substâncias são bioacumulativas e cancerígenas. Neste contexto, os fungos entomopatogênicos assumem importância como agentes biológicos de controle de insetos, devido ao seu alto potencial de infecção, que segundo Alves (1986), chega a 80% de eficácia.

O fungo *Metarhizium anisopliae* ocorre naturalmente em mais de 300 espécies de insetos de diferentes ordens, incluindo pragas importantes, e possui uma considerável especialização em relação ao hospedeiro, conforme descrito por St. Leger e colaboradores (1992). E segundo Alves (1998), o gênero *Beauveria parasita* um grande número de artrópodes, ocorrendo em mais de 200 espécies de insetos e ácaros, incluindo carrapatos. Sendo por esse motivo, os dois fungos entomopatogênicos mais bem estudados. Muitas diferenças na patogenicidade destes fungos têm sido descritas pelos autores supracitados, revelando assim, a ocorrência de variabilidade genética, sendo útil administrar esta diversidade, pois possibilita a seleção de linhagens mais eficientes para o controle de pragas e vetores específicos. Desta forma, o estudo dos fatores que modulam a patogenicidade, permite um melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos na relação parasito-hospedeiro, caracterizando assim a sua relevância.

O presente trabalho trata-se de uma pesquisa bibliográfica, que tem por objetivo descrever os fatores que determinam a entomopatogenicidade de *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae* em dípteros muscóides.

2. CONTROLE DE DÍPTEROS MUSCÓIDES

2.1. Impacto dos Dípteros Muscóides na Saúde e na Agropecuária

Os dípteros muscóides que possuem importância sanitária são vetores mecânicos de agentes etiológicos de enfermidades que afetam o homem e animais domésticos, além de produzirem miíases e pseudomiíases. São insetos de hábitos endófilos, que “desenvolveram a sinantropização, desde o início da jornada evolutiva de nossos ancestrais hominídeos, aproveitando-se de carcaças de animais, fezes acumuladas e depósitos de alimentos” (ROBINSON, 1996).

As famílias Calliphoridae, Muscidae e Sarcophagidae são incriminadas como responsáveis pela transmissão de enterobactérias patogênicas, protozoários (amebas e giárdias), helmintos (ovos e larvas) e vírus responsáveis por diarreias infantis. Algumas espécies produzem míases secundárias: *C. albiceps* (figura 1), *C. megacephala*, *C. putoria* (figura 2), *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775), *Phaenicia eximia* (Wiedemann, 1819), *Phaenicia cuprina* (Wiedemann, 1830), *Musca domestica* (Linnaeus, 1758), *Syntesiomyia nudiseta* (Wulp, 1883), *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758), *Peckia chrysostoma* (Wiedemann, 1830), *Pattonella intermutans* (Thonson, 1896), *Euboettcheria collusor* (Curan & Valley, 1934) (GREENBERG, 1971 e 1973; GUIMARÃES *et al.*, 1983; MARILUIS *et al.*, 1989; LECLERQ, 1990; FOTEDAR *et al.*, 1992; FURLANETTO *et al.*, 1984; OLIVEIRA, 1999; QUEIROZ *et al.*, 1999; NORBERG *et al.*, 1999; SCHULLER, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Densidades populacionais aumentadas destes muscóides facilitam a dispersão e a invasão dos domicílios e estruturas urbanas, incomodando, do ponto de vista estético e preocupando pelo aspecto sanitário.



Figura 1 – Mosca varejeira *Chrysomya albiceps*.

Disponível: [Http://www.axxon.com.ar/mus/info/040573.htm](http://www.axxon.com.ar/mus/info/040573.htm)

Acesso: 03/09/03



Figura 2 – Moscas varejeiras em grupo.

Disponível: [Http://www.axxon.com.ar/mus/info/040656.htm](http://www.axxon.com.ar/mus/info/040656.htm)

Acesso:03/09/03

O interesse pelo estudo dos dípteros muscóides vem crescendo devido aos ataques de suas larvas ao homem e aos animais, provocando miíases que em alguns casos levam ao óbito. Miíase é a infestação por larvas de dípteros em vertebrados vivos (larvas biontófagas), que pelo menos em parte do seu ciclo, se alimentam de substâncias corpóreas, conforme Guimarães e Papavero (1999), Marcondes (2001). “Quando as larvas se desenvolvem em substâncias orgânicas em decomposição, são consideradas necrobiontófagas (Figura 3). Entretanto, aquelas que se desenvolvem em tecidos necrosados de animais vivos, denominam-se necrófagas”. (MELLO, 2003).



Figura 3 – Larvas de *Chrysomya albiceps* e *C. megacephala*.

Disponível: <http://www.invasive.org/images.jpg>

Acesso: (21/03/03)

A presença excessiva de muscóides na produção avícola pode caracterizar uma falha no manejo de resíduos. No esterco de poedeiras e de cama de aviário criam-se principalmente *M. domestica*, além dos califorídeos conhecidos como moscas varejeiras (Figura 4) e os sarcófagídeos. Estas últimas desenvolvem-se principalmente no esterco molhado pelo vazamento de bebedouros e nos ovos quebrados ou de casca mole, que caem no esterco. Embora tenham capacidade de vôo muito grande, permanecem no mesmo local, exibindo um comportamento de proteção da espécie, uma vez que estes estercos possuem alimento e substrato de postura. Estas moscas além de serem incômodas para os trabalhadores de aviários e moradores da vizinhança, são vetores mecânicos de patógenos para aves, animais e para os seres humanos. Desta forma, a falta de controle destes dípteros ocasiona

prejuízos para os avicultores, pela transmissão de doenças e baixa produtividade dos operários (SCHÜLLER, 2000).

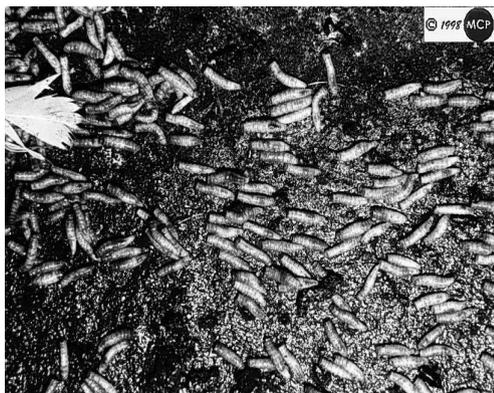


Figura 4 - Larvas de moscas varejeiras em excrementos de aviário. Disponível: <http://www.invasive.org/images/3072x2048/1276025.jpg>

Acesso:14/03/2003

No Brasil, a espécie de moscas-de-frutas de maior importância econômica é *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Figura 5), conforme Zucchi (1999 *apud* ALVES *et al.*, 2004). Esta mosca tem grande capacidade de infestar plantas exóticas e introduzidas, como *Coffea arabica* (café), que é seu hospedeiro primário. Também tem preferência por frutos maduros. Sua distribuição se faz em toda a África, sul da Europa, todas as Américas, Caribe, Austrália e Ilha do Pacífico. Com a incidência desta mosca em hospedeiros introduzidos, há um aumento de sua população, passando a atacar hospedeiros secundários, como os citros. Assim, o mercado nacional de exportação de citros fica prejudicado, conforme Souza Filho *et al.* (1999 *apud* ALVES *et al.*, 2004).



Figura 5 – *Ceratitis capitata* (mosca do Mediterrâneo) Disponível: <http://www.forestryimages.org>

Acesso: (12/01/05)

2.2. Controle Químico de Vetores e Pragas

O advento dos inseticidas e sua facilidade de uso levaram ao esquecimento vários métodos de controle de pragas que eram empregadas em cultivos: métodos culturais, mecânicos e biológicos (BERTI-FILHO, 1999).

Segundo Marcondes (2001), os inseticidas possuem algumas qualidades e várias limitações. Dentre as qualidades está o rápido efeito sobre as populações de insetos, que permite controlar uma praga ou vetor e as parasitoses que ele transmite. Esse controle também pode ser direcionado a uma área específica – que facilita a utilização em áreas urbanas, como ocorre em técnicas de dedetização – ou numa área maior, que será mais eficiente na utilização em campo. Uma limitação é a ação dos inseticidas de largo espectro. O maior efeito colateral é o aumento do raio de ação que, possibilita maior exposição dos efeitos nocivos para o homem e as outras espécies.

Diversos autores relatam que caso haja uma demora na degradação dos inseticidas, como é o caso dos organoclorados, pode haver acúmulo na cadeia alimentar e danos, principalmente em aves predadoras (ALVES, 2004). Outro problema é que esse amplo espectro atua sobre várias espécies de insetos, inclusive nos inimigos naturais, criando uma conseqüente dependência do uso de mais inseticida, favorecendo o aumento de espécies secundárias devido à ausência do controle natural. Como esse controle natural é menos eficiente no ambiente urbano e por esse motivo os dípteros sinantrópicos sofrem menos a ação desse equilíbrio natural, sendo mais notado na agricultura e pecuária (ROBINSON, 1996).

Outra grande preocupação é o aparecimento da resistência a diversos inseticidas. A exposição e o uso continuado de inseticidas realiza uma forte pressão seletiva sobre os insetos, provocando uma seleção natural das espécies resistentes, que perpetuarão este fator de resistência às gerações futuras. No início da evolução da resistência, a frequência de alelos resistentes numa população é baixa, mas com o uso contínuo de um mesmo inseticida, esta frequência de resistência poderá alcançar níveis que comprometem a sua eficácia. Desta forma, a resistência é uma condição pré-adaptativa (ROUSH e MCKENZIE, 1987).

De acordo com Georghiou e Lagunes—Tejeda (1991); Cochran, (1995 *apud* LOPES, 2005), até 1980 foram documentadas 504 espécies

de insetos e ácaros resistentes à pelo menos uma classe de produto químico. Ocorrem, sobretudo, para os maiores grupos químicos de segunda geração de inseticidas, como os organofosforados, carbamatos e piretróides. Ainda que o problema da resistência em pragas urbanas tenha intensificado as pesquisas na busca de soluções, as estratégias de manejo não estão sendo adequadas. O aumento das doses e a frequência de aplicação têm agravado o problema, de acordo com Schal e Hamilton (1990 *apud* LOPES, 2005).

Segundo Ferrari (1996), os principais mecanismos de resistência dos insetos são: a diminuição da penetração da cutícula, o aumento na capacidade de metabolizar o inseticida e a diminuição da sensibilidade nos sítios de ação do inseticida. Se mais de um desses mecanismos estiverem presentes conferindo resistência a dois ou mais inseticidas, fica caracterizada uma resistência múltipla. Porém, se um único mecanismo de defesa confere a resistência a dois ou mais inseticidas, trata-se de uma resistência cruzada.

Os organoclorados foram os primeiros inseticidas sintéticos residuais, criados em 1874 e empregados no controle de pragas a partir de 1940. Neste grupo encontra-se o DDT. Sua primeira aplicação importante foi em programas de saúde durante a Segunda Guerra Mundial, principalmente no combate ao mosquito da malária (LOPES, *op. Cit.*). Segundo Van Emden (1989), a resistência desses mosquitos começou a existir nos EUA a partir de 1949. E atualmente, este inseticida está proibido em vários países por ser extremamente danoso ao meio ambiente (GEORGHIOU e LAGUNES—T EJEDA, *op. Cit.*).

O modo de ação dos inseticidas químicos também constitui um problema. Os inseticidas neurotóxicos como os organofosforados, carbamatos (que inibem a acetilcolinesterase) e piretróides (atuam na transmissão axônica), tem ação sobre os mamíferos. Sendo por esses motivos perigosos quando aplicados no ambiente urbano (residências, restaurantes, hospitais, depósitos de alimentos, clínicas veterinárias, entre outros). Entretanto, de acordo com uma lista de produtos, publicada pelo *Pest Control Technology* em 2002, dos inseticidas comercializados para controle de pragas urbanas, 52% foram organofosforados, carbamatos ou piretróides, com o predomínio deste último (42%) (LOPES, 2005).

O inseticida regulador do crescimento (IRC) possui toxicidade baixa a mamíferos, sendo mais indicado para o controle de pragas urbanas.

Interferem no crescimento normal e reprodução do inseto, afetando o seu equilíbrio de hormônios e enzimas. O seu consumo é de apenas 8% dos existentes no mercado (LOPES, *op. Cit.*).

Pesquisas realizadas por Kostina e Melnikova (1986) sobre os efeitos de doses subletais de reguladores de crescimento nos dípteros muscóides, revelaram que fêmeas de *M. domestica* tratadas com diflubenzuron tiveram diminuição no número de ovos. Entretanto, Kotze (1992) não encontrou alterações na ovoposição e eclosão dos ovos ao alimentar adultos de *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae) com cyromazine, embora o desenvolvimento larval tenha sido inibido.

Segundo Usher e colaboradores (1997), outros inseticidas de terceira geração são os derivados de avermectinas, como a ivermectina e a abamectina, que demonstram toxicidade para a maioria dos insetos, sendo que as avermectinas têm mostrado efeito sobre os dípteros muscóides. *C. capitata* tratada com avermectinas B1 mostrou uma DL₅₀ de 0,29 µg/g (10 dias). A incidência de míases por *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1958) (Diptera: Calliphoridae) foi significativamente menor em gado tratado com ivermectina, do que no grupo não tratado.

Segundo Andress e colaboradores (2000), níveis aceitáveis de controle de *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) foram observados de 4 a 8 semanas após o tratamento de gado bovino com doramectina.

De acordo com Barros (2003), um amplo diagnóstico da suscetibilidade de *H. irritans* a inseticidas piretróides (cipermetrina e permetrina) e organofosforados (diazinon), realizado de 2000 a 2002, possibilitou conhecer melhor a situação da resistência no país. Bioensaios realizados em mais de 80 municípios e 14 estados, constataram a ocorrência de resistência a piretróides e elevada suscetibilidade a organofosforados em todas as regiões estudadas. A presença de moscas resistentes foi detectada em 95% das populações testadas, evidenciando a magnitude do problema.

O alto custo dos inseticidas químicos no controle de moscas, aliado ao efeito deletério para o meio ambiente, tem motivado a busca por outras estratégias de controle, como o controle biológico ou mesmo o controle associado (químico e biológico) (ALVES, 2004).

2.3 Controle Biológico

O controle biológico é baseado no controle natural ocorrido nos ecossistemas, em que muitas espécies são predadoras de outras, cujas populações são controladas ou mesmo erradicadas (De BACH, 1964).

Segundo Wilson e Huffaker (1976), Smith em 1919, foi o primeiro entomologista a empregar o termo “controle biológico” para designar o uso de inimigos naturais (parasitóides) no controle de insetos-praga. A “praga é uma denominação antropocêntrica de determinados organismos que afetam de modo adverso os valores ecológicos, sociais e econômicos associados às atividades humanas” (BERTI-FILHO, 1999).

O controle biológico pode ser definido também como a ação de parasitos, predadores ou patógenos na manutenção de uma densidade populacional de outros organismos em uma média mais baixa do que ocorreria em sua ausência (De BACH, *op. Cit.*). Outras definições incluem o uso de feromônio, inibidores de quitina, inseticidas de origem vegetal e inseticida à base de patógenos (vírus, bactérias e fungos), também chamados de inseticidas biológicos ou bioinseticida (LOPES, 2005).

A utilização de parasitóides como inimigo natural de moscas-de-fruta teve início em 1946, quando o Haváí foi invadido por *C. capitata*. O controle de moscas sinantrópicas com microhimenópteros parasitóides, traz uma alternativa mais segura, ecologicamente correta e de fácil manuseio e ainda apresenta custo mais baixo, que os inseticidas químicos. Entretanto, não são conhecidos os efeitos da urbanização e do desmatamento na diversidade de inimigos naturais (CARVALHO *et al.*, 2003). Esses autores fizeram um levantamento dos principais microhimenópteros parasitóides da mosca varejeira *C. megacephala*, na cidade do Rio de Janeiro, no período de 1999 a 2000, foram identificadas três espécies: *Tachinaephagus zealandicus* (Encyrtidae), *Pachycrepoideus vindemiae* (Pteromalidae) e *Nasonia vitripennis* (Pteromalidae). Esses parasitóides são de distribuição cosmopolita e têm sido encontrados em aviários brasileiros, em associação com outras espécies de moscas (CARVALHO, *op. Cit.*).

Marchiori e colaboradores (2002) realizaram uma pesquisa em Itumbiara (Goiás), de março a agosto de 2001, relatando a ocorrência do parasitismo de *Brachymeria podagrica* (Fabricius, 1787) em estádios imaturos de *Chysomya albiceps* (Díptera: Calliphoridae). Utilizaram armadilhas contendo como isca vísceras de galinha. As pupas foram obtidas pelo méto-

do de flutuação, sendo colocadas individualmente em cápsulas de gelatina e mantidas até a emergência das moscas e parasitóides. Foram obtidas 29 pupas de *C. albiceps*, quatro das quais emergiram parasitóides. A prevalência de parasitismo foi de 13,7%.

De acordo com Van Lenteren e Bueno (2003), o mercado mundial de comércio de inimigos naturais foi estimado em 25 milhões de dólares em 1997, cerca de 50 milhões de dólares em 2000, com um aumento de 15% a 20% nos anos subseqüentes. Apesar do Brasil não ter destaque na comercialização destes entomopatógenos (particularmente parasitóides), apresenta um grande potencial na área de patógenos. Desde 1970, comercializa *M. anisopliae* para o controle de cigarrinhas da cana-de-açúcar e *B. bassiana* para o controle do moleque-da-bananeira (PARRA, 2004).

2.3.1 Controle com fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos diferem dos vírus e das bactérias pois não necessitam ser ingerido para infectar seus hospedeiros. Seu mecanismo de ação é a penetração direta através do tegumento, além de possuir um amplo espectro de hospedeiros e de infectar diferentes estágios de desenvolvimento e idades do hospedeiro. Constitui o grupo de maior importância no controle biológico de insetos já que a grande maioria é suscetível a ele. São conhecidos aproximadamente 90 gêneros e 700 espécies de fungos entomopatogênicos, sendo os gêneros mais importantes *Metarhizium* e *Beauveria* (FERRON, 1978).

O papel dos fungos entomopatogênicos na manutenção do equilíbrio ambiental é bastante relevante por estes exercerem o controle de insetos em ecossistemas agrícolas. Os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são os entomopatógenos mais estudados no Brasil, com potencial para aumentar a produção de micoinseticidas, atendendo a crescentes restrições internacionais ao uso de inseticidas químicos. São mais versáteis que outros patógenos, pois não precisam ser ingeridos para iniciar a doença. Mais de 20 gêneros de fungos já foram constatados atacando insetos, de forma enzoótica ou epizoótica (ALVES, 1992).

Alves (1998) destacou as seguintes qualidades desses fungos: alta eficiência no controle, grande capacidade de disseminação, resistência a condições adversas, ótima produção de conídios e elevada taxa de crescimento (na produção industrial).

De acordo com Alves (1992), a ocorrência normal e epizootica de *M. anisopliae* na região de Campos tem despertado atenção desde 1964. Com o aparecimento da cigarrinha das folhas dos canaviais em 1969, o estudo deste fungo foi intensificado tendo sido publicados mais de 700 trabalhos sobre patologia e controle microbiano de insetos nos últimos 60 anos.

Fuxa e Tanada (1987 *apud* ALVES, 1992) descreveram que as estratégias adotadas para utilização dos fungos entomopatogênicos devem ser escolhidas em função das características do fungo, da praga e das condições das culturas. Estes autores ressaltam que apesar dos avanços já obtidos na área de controle microbiano, há necessidade de se investir em estudos de taxonomia, epizootiologia, produção, formulação e de um maior entrosamento entre os centros de pesquisas e o governo.

2.3.1.1 *Metarhizium anisopliae*

O gênero *Metarhizium* compreende o grupo de entomopatógenos mais bem estudados, com distribuição mundial. É um Deuteromiceto pertencente à ordem Moniliales, família Moniliaceae. Foi identificado pela primeira vez por Metschnikoff em 1879, em um coleóptero (*Anisoplia austriaca*), como *Entomophthora anisopliae*. Foi classificado por Sorokin em 1883, como *Metarhizium anisopliae*. É utilizado para controle de pragas em diversos países como EUA, Austrália e Brasil (ZIMMERMANN, 1993).

A classificação de Tulloch (1976) foi baseada em caracteres morfológicos, aceitando apenas as espécies *Metarhizium flavoviridae* e *M. anisopliae*, subdividindo esta última espécie em *M. anisopliae* var. *anisopliae* ou *M. anisopliae* var. *majus*, de acordo com o tamanho do conídio (ZIMMERMANN, 1993; DRIVER *et al.*, 2000).

Os conídios são uninucleados, hialinos, levemente coloridos e se formam sobre os conidióforos simples que cobrem o inseto. O seu ciclo de vida é simples, constituído por uma unidade infecciosa assexual, conidiósporo haplóide, formado em cadeias, em fiálides que podem ou não estar intumescidas. Wang e colaboradores, (2002) demonstraram que o ciclo parassexual é a principal alternativa para haver troca de material genético neste fungo. Demonstrando também que se o fungo permanecer por muito tempo em meio de cultura artificial, pode perder a sua virulência. Não é conhecida a

fase telemorfa para *Metarhizium*, exceto para *M. taii* que é *Cordyceps taii* (ALVES, 1998; DRIVER *et al.*, 2000).

Acredita-se que *M. anisopliae* ocorra em mais de 300 espécies de insetos de diferentes ordens. Muitos trabalhos têm sido realizados aproveitando-se da variabilidade natural desses fungos, com objetivo de selecionarem isolados para o controle de diversas pragas, em diferentes lugares do mundo (Figura 6) (ALVES, 1998).

2.3.1.2 *Beauveria bassiana*

A espécie *Beauveria bassiana* foi descrita por Bassi, em 1835, sendo atribuída a ela uma doença que atingia o bicho-da-seda, a “moscardina”. Em 1838 Giuseppe Balsamo Crivelli a denominou como *Botrytis bassiana*, recebendo posteriormente várias denominações: *Sporotrichum densum*, *Beauveria densa*, *Sporotrichum globuliferum*, *Beauveria blobulifera* e *B. bassiana* (AINSWORTH, 1973).

O gênero *Beauveria* foi descrito por Vuillemin, em 1912 e a partir de caracteres morfológicos e bioquímicos, seis espécies foram identificadas: *B. alba*, *B. amorpha*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. velata* e *B. vermiconia*. A espécie *B. bassiana* tem distribuição cosmopolita e pode ser encontrada infectando insetos e em amostras de solo. Vários experimentos têm mostrado a sua eficiência no controle de insetos-praga, bem como insetos vetores de doenças (MUGNAI *et al.*, 1989).

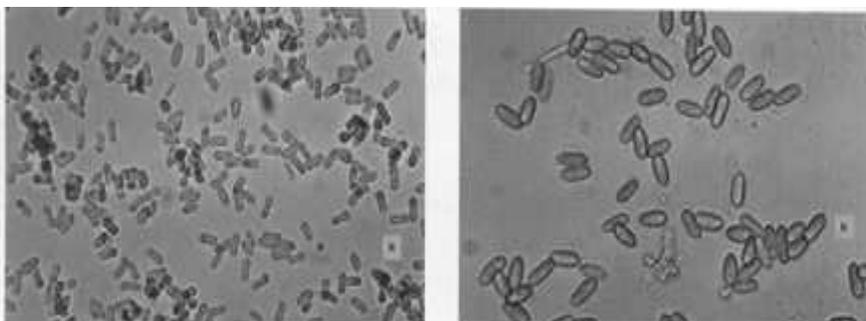


Figura 6 – Conídios de *M. anisopliae*: aumento 40X (a) e 100X (b).

Disponível: <http://www.fruit.naro.affrc.go.jp/.../speci/0204112.jpg>

Acesso: 12/01/2005

A classificação morfológica é baseada nas células conidiogênicas. *B. bassiana* possui conídios esféricos, enquanto *B. brongniartii* possui conídios elipsóides (Figura 7). Devido à variabilidade entre as cepas de *Beauveria* e a especificidade que mostram as diferentes classes e ordens de hospedeiros, atualmente se aplicam técnicas moleculares para a identificação das espécies: estudos de isoenzimas, seqüenciamento de RNAr (RNA ribossomal), RFLP (Polimorfismo na Longitude dos Fragmentos de Restrição), RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado Arbitrariamente) e PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

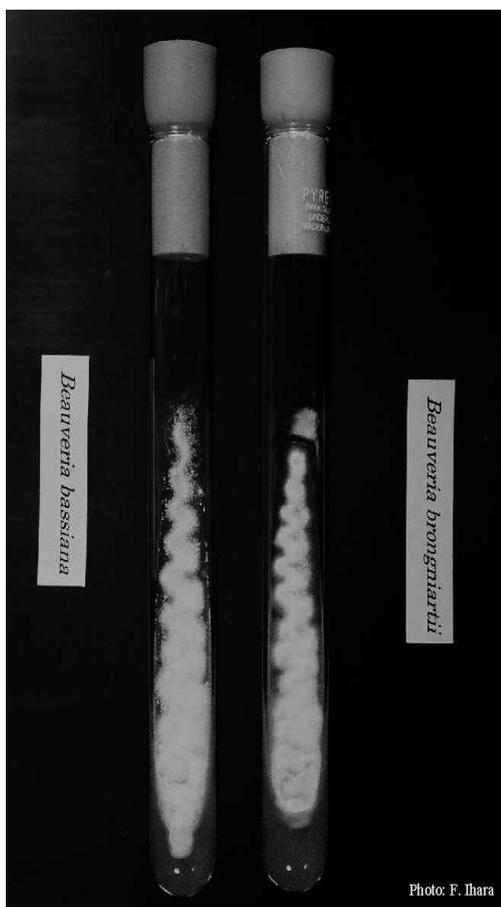


Figura 7 – Colônias de *B. bassiana* e *B. brongniartii*.

Foto: F. Ihara.1998. Disponível em:

http://www.dgpc.org/.../colloque_lome_programme.html >

Acesso: 14/03/2004.

Segundo Tigano-Milani e colaboradores (1995); Driver e colaboradores(2000); Destéfano e colaboradores (2004), antes das técnicas moleculares a classificação dos fungos entomopatogênicos baseava-se na morfologia e características bioquímicas. Estas características incluíam a reprodução, morfologia do conídio e da colônia, enzimas hidrolíticas, isoenzimas. Estes métodos determinaram os espectros de espécies dentro do gênero, e também revelaram um alto grau de variação entre isolados obtidos de diferentes países e diversos hospedeiros.

Berretta e colaboradores (1998) examinaram 18 isolados de *B. bassiana* com técnica de RAPD e verificaram alta variabilidade entre os genótipos, não encontrando correlação entre os isolados quanto a sua origem geográfica ou hospedeira.

3. ENTOMOPATOGENICIDADE DE *METARHIZIUM E BEAUVERIA*

A entomopatogenicidade do fungo é a capacidade de produzir doença nos insetos e depende de uma sequência de eventos mecânicos e bioquímicos que se desenvolvem de forma sincronizada (St. LEGER *et al.*, 1991).

Segundo Roberts e Humber (1984); Hajek e St. Leger (1994), o desenvolvimento da patogenia pode ser dividido em dez fases. A primeira é a adesão do conídio na cutícula do inseto. A interação entre o conídio e a cutícula depende de um muco que envolve o conídio, possuindo altos níveis de aminopeptidases, que podem criar condições favoráveis para a atuação de enzimas extracelulares. Os conídios podem aderir-se ao acaso de acordo com as pregas intersegmentares ou com a rugosidade da superfície da cutícula (FARGUES, 1984).

A segunda fase é a germinação do conídio na cutícula do inseto. Fisiologicamente, a germinação do conídio é a retomada da atividade ou metabolismo vegetativo (BARTNICKI-GARCIA, 1984). Morfologicamente, é a emergência da célula vegetativa de um conídio, em forma de um tubo germinativo que cresce sobre a superfície cuticular formando um apressório, que penetra diretamente na cutícula (FARGUES, 1984; BARTNICKI-GARCIA, 1984). O apressório representa uma adaptação por concentrar energia física e química em uma área muito pe-

quena, facilitando a penetração. St. Leger e colaboradores (1991), constataram que a formação de apressório é influenciada pela topografia da cutícula e estudos bioquímicos revelaram mensageiros intracelulares secundários (Ca^{+2} e CAMP) na formação desta estrutura. A germinação ocorre em condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, oxigênio e nutrição.

Na terceira fase, ocorre a penetração na cutícula. Para Alves (1998) esta penetração envolve um processo físico (com pressão da hifa terminal que rompe as áreas membranosas) e outro químico (com produção de enzimas: proteases, lipases e quitinases), formação de clamidósporos (células com nutrientes armazenados) que sustenta o fungo por longos períodos, no corpo do hospedeiro, até a esporulação superficial. Torres *et al.* (1993) mostraram que as enzimas têm efeito específico sobre cada um dos componentes da cutícula. A epicutícula ou camada mais externa formada por lipídios (ácidos graxos e parafina) é degradada pelas lipases. A quitinase degrada a quitina, substância que confere resistência e dureza à cutícula. As proteínas da cutícula são degradadas por enzimas proteolíticas produzidas pelo fungo.

Na quarta fase, ocorre o crescimento do fungo na hemocele. O fungo cresce na hemocele com hifas leveduriformes ou blastosporos, que se multiplicam por germinação (ROBERTS e HUMBER, 1984; HAJEK e St. LEGER, 1994).

Na quinta fase há a produção de toxinas. Os fungos entomopatogênicos produzem toxinas que são responsáveis pela morte do hospedeiro. Segundo Hajek e St. Leger (*op. Cit.*), o rápido desenvolvimento do fungo indica que a morte do inseto ocorre pelo crescimento vegetativo (ruptura de áreas membranosas) produzindo altos níveis de micoses.

A sexta fase é a morte do inseto. Ela pode ser antecedida por alterações de comportamento do inseto, como contrações e perda da coordenação (ROBERTS e HUMBER, *op. Cit.*).

Na sétima ocorre o desenvolvimento da fase micelial. Aparecem pequenas manchas melanizadas nos sítios de infecção, observando-se por vezes uma coloração avermelhada no inseto hospedeiro (ROBERTS e HUMBER, *op. Cit.*).

A oitava é a emergência do micélio até o exterior. Em condições de baixa ou moderada umidade relativa, o fungo continua no inseto, entretanto com alta umidade o fungo cresce através da cutícula (ROBERTS e

HUMBER, 1984).

A nona fase é da produção de unidades infectivas. O metabolismo do fungo se reduz, formando essas unidades infectivas ou conídios (ROBERTS e HUMBER, *op. Cit.*)

Na décima fase, ocorre a dispersão das unidades infectivas. Isto ocorre por meio da água e do vento (Figuras 8 e 9) (ROBERTS e HUMBER, *op. Cit.*).



Figura 8 – Díptero muscóide adulto infectado por *B. bassiana*.

Foto: K. Mishiro. Nagasaki, Japão, 2003.

Disponível: <<http://www.fruit.naro.affrc.go.jp/.../speci/0204112.jpg>>

Acesso: 14/09/04



Figura 9 – Díptero muscóide infectado por *B. bassiana* (vista dorsal)

Foto: K. Mishiro. Nagasaki, Japão, 2004.

Disponível: <<http://www.fruit.naro.affrc.go.jp/.../speci/0204113.jpg>>

Acesso: 14/09/04

3.1 Fatores de Virulência

Vários fatores de virulência estão envolvidos na colonização dos insetos. *B. bassiana* e *M. anisopliae* produzem quantidades de toxinas

significativas em seus hospedeiros. Segundo Elsworth e Grove (1977), as toxinas isoladas de insetos colonizados por *B. bassiana* foram: beauvericina, beauverolides, bassianolide e isarolides. Destruixinas (DTXs) e citocalasinas são toxinas provenientes de hospedeiros infectados por *M. anisopliae*. Dentre os componentes tóxicos isolados, somente as DTXs tem um papel definido. Clarkson e Charnley (1996) destacaram que as DTXs em lepidópteros, despolarizam a membrana muscular através de ativação de canais de Ca^{+2} . Dependendo da capacidade de destoxificação do hospedeiro, em baixas concentrações a DTXs pode ser reversível, o que reflete a suscetibilidade de cada espécie a destruxinas.

Estudos histopatológicos de tecidos infectados por *M. anisopliae*, sugerem que as toxinas (destruxinas) matam o hospedeiro por provocar degeneração dos tecidos, devido à perda da integridade estrutural das membranas e então desidratação das células por perda de fluidos (FERRON, 1981).

As destruxinas desempenham um papel importante na patogênese de *M. anisopliae*, apresentando várias propriedades biológicas, inclusive atividade inseticida e fungicida (ROBERTS, 1969; POTTERAT *et al.*, 2000; HSIAO e KO, 2001).

Kodaira em 1961, isolou duas destruxinas, A e B, de culturas filtradas de *M. anisopliae* (SUZUKI *et al.*, 1970 e 1971) isolaram mais três destruxinas: C, D e desmetildestruixina B. Esses autores verificaram que estas destruxinas agem na hemolinfa dos insetos.

Segundo Pedras e colaboradores (2002), existe atualmente um interesse crescente no estudo das destruxinas, pelo fato delas estarem envolvidas na virulência de fungos entomopatogênicos e possuírem um potencial para o controle de pragas. Já foram isoladas mais de 20 diferentes destruxinas, sendo 15 de *M. anisopliae*.

3.1.1 Enzimas degradadoras de cutícula

St. Leger e colaboradores (1987a) caracterizaram duas proteases alcalinas a partir do sobrenadante de cultivo de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, uma denominada Pr1 (com atividade tipo-subtilisina) e a outra designada Pr2 (com atividade tipo-tripsina). Segundo esses autores, as proteases do tipo Pr1 e Pr2 também foram encontradas em sobrenadante de *B. bassiana*.

St. Leger e colaboradores (1988) descreveram o papel de Pr1 na degradação das proteínas cuticulares. Verificaram que a presença de inibidor de Pr1 ou anticorpos IgG (específico para Pr1) durante a infecção do inseto com *M. anisopliae* var. *anisopliae*, reduziu a mortalidade do inseto.

St. Leger *et al.* (1989) confirmaram o papel de Pr1 na degradação localizada de proteínas cuticulares, em outro estudo, onde esta enzima foi a principal protease produzida por estruturas infecciosas (apressório e tubos germinativos) durante a infecção.

O papel de Pr2 no parasitismo ainda não está esclarecido. Para St. Leger e colaboradores (1987b), esta enzima pode estar envolvida em mecanismos de controle celular, catalisando processos de ativação e inativação proteolítica. Paterson e colaboradores (1994) relataram que Pr2 pode estar envolvida na ativação ou indução de Pr1 em *M. anisopliae*. Gillespie e colaboradores (1998) confirmaram essa hipótese investigando a produção de Pr1 e Pr2 em 19 isolados de *M. anisopliae*. Como a atividade de Pr1 foi observada após 72 horas de incubação e a atividade de Pr2 após 48 horas, deduziram que Pr2 atuaria precocemente na cutícula com liberação de peptídeos indutores de Pr1.

Urtz e Rice (2000) descreveram uma protease extracelular de *B. bassiana* denominada BBP (*Beauveria bassiana* protease) do tipo serino-protease com atividade quimotripsina. Esses autores acreditam que essa protease tem atividade degradadora de cutícula semelhante à Pr1, embora em cultivo líquido, na presença de substrato cuticular, a produção de BBP tenha ocorrido antes de Pr1.

Segundo Charnley e St. Leger (1991), *M. anisopliae* produz duas aminopeptidases extracelulares: uma cisteína protease designada Pr4 e uma aspartil protease. Para Cole e colaboradores (1993), a Pr4 apresenta maior atividade degradadora de cutícula em relação a Pr2, não estando esclarecido o seu papel no parasitismo.

Gillespie e colaboradores (1998) discutiram a produção de proteases extracelulares por *M. anisopliae*. Estes autores utilizaram cutícula de pupa de *Manduca sexta* e cutícula de diferentes partes de *Schistocerca gregaria* (abdome de ninfas de quinto instar, abdome do inseto adulto e asas), constituindo tipos cuticulares de composição protéica e grau de esclerotização diferentes. Verificando que ocorreu hidrólise destes tipos cuticulares por Pr1 em graus diferentes, sugeriram a existência de uma hierarquia das diferentes partes do inseto, quanto à suscetibilidade à ação

enzimática. Entretanto, o desempenho de Pr1 na degradação cuticular não foi o mesmo em *M. sexta* e *S. gregaria*. Estes estudos sugeriram uma possível participação de Pr1 na especificidade ao hospedeiro.

3.1.1.1 O pH extracelular na produção enzimática

St. Leger e colaboradores (1998) avaliaram a produção de Pr1 e Pr2 por *M. anisopliae* var. *anisopliae* em meio de sais (meio mínimo) e meio contendo substrato cuticular, em função de diferentes valores de pH (3 a 8). Estes autores sugeriram que a produção dessas proteases foi observada nos dois meios testados, exceto em cultivos com pH 3. As maiores atividades proteolíticas ocorreram no meio contendo cutícula. O maior nível de expressão de Pr2 foi detectado em valores de pH entre 6 e 8, com o seu ótimo ficando em pH 8. O maior nível de expressão de Pr1 foi observado em valores de pH próximos ao seu ótimo (pH 8). Desta maneira, concluíram que o pH do meio é fator preponderante na produção de proteases. Estes mesmos autores observaram que *in vitro* a expressão de Pr1 e Pr2 sugere que o pH fisiológico no local da infecção seria alcalino, indicando ser um sinal fisiológico que dispara a produção desses fatores de virulência.

3.2 Mecanismos de Defesa dos Insetos Contra os Fungos

As barreiras estruturais constituem a defesa primária dos insetos contra os patógenos e endoparasitos, onde as principais são: o rígido exoesqueleto (cutícula) e a membrana peritrófica que envolve o bolo alimentar e protege as paredes do epitélio intestinal (BORROR *et al.*, 1981). Os fungos que atravessam estas estruturas e chegam até a hemocele, necessitam superar as defesas secundárias ativas como a fagocitose, encapsulação e melanização, além da atividade da lisozima que é a enzima que hidrolisa as paredes dos patógenos e as proteínas que bloqueiam o crescimento dos fungos (KUNO *et al.*, 1981; DUNN, 1986).

A habilidade de um fungo para infectar um inseto pode estar influenciada pelo estado fisiológico do hospedeiro, já que os fungos podem infectar especificamente um estágio de desenvolvimento como ovos, larvas, pupas ou adultos (BOUCIAS e PENDLAND, 1984). Acredita-se que a cutícula possui substâncias de inativação e que alguns dos estágios de desenvolvimentos, poderiam apresentar condições fisiológicas desfavoráveis

para o fungo (KUNO, *Op. Cit.*). Segundo Boucias e Pendland (1984), existe uma idade de maturidade da resposta imune e por esse motivo, os primeiros estádios larvares são mais suscetíveis a baixas doses dos fungos entomopatogênicos.

Conforme o inseto se desenvolve, ele realiza ecdises, sendo este um mecanismo importante de defesa (VADENBERG e colaboradores, 1998). Entretanto, a cutícula recém mudada é vulnerável ao ataque fúngico (BOUCIAS e PENDLAND, 1984).

3.3 Fatores Ambientais de Interferência

Vilacorta (1978) observou que os fatores ambientais interferem de forma particular em cada fase do ciclo dos fungos entomopatogênicos. *Metarhizium* apresenta crescimento e esporulação ótimos em temperatura entre 20°C e 30°C (Figura 10). Segundo Alves e Nogueira (1984), a germinação dos conídios é nula, quando em temperaturas abaixo de 16°C e acima de 36°C, havendo a perda da viabilidade após exposição a 40°C por 24 horas. Segundo Ferron (1978), nas temperaturas inferiores há um retardo no desenvolvimento, um aumento na formação do micélio e uma redução na formação de conídios.

Segundo Ferron (1981), *M. anisopliae* possui um ótimo crescimento para a maioria das cepas em 27°C e 28°C, embora algumas exce-

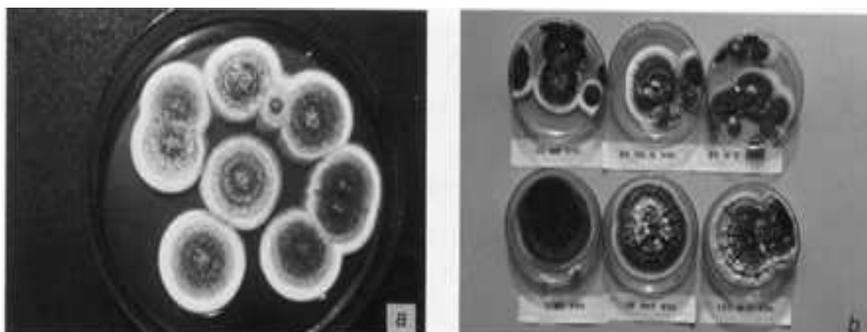


Figura 10 – Colônias de *M. anisopliae* em meio de cultura (Agar, dextrose, malta, peptona), a 20°C, com 7 dias (a); (b) diferenças entre cepas.

Disponível: <http://www.fruit.naro.affrc.go.jp/.../speci/0204116.jpg>

Acesso: 12/01/05

ções de cepas resistentes a frio e resistentes a calor tem sido relatadas (BIDOCHKA *et al.*,1998; BOUCIAS e PENDLAND, 1984).

Ferron (*op. Cit*) ressaltou que os conídios de *M. anisopliae* necessitam de uma umidade relativa (UR) de no mínimo 92% para germinar. Foram encontrados conídios em longa sobrevivência em uma combinação de temperaturas moderadas e altas UR (26°C e 97% UR ou 19°C e 97% UR) ou baixa temperatura e baixa UR (4°C e 0% UR), conforme observações de Daust e Roberts (1983).

Segundo os autores supracitados, esses fungos podem ser facilmente cultivados *in vitro*, sendo que as condições de armazenamento são mais críticas para a sobrevivência e virulência do que o substrato sobre o qual os conídios foram produzidos. De acordo com Zimmermann (1982) e Morley-Davies e colaboradores(1995), quando a umidade relativa é alta, os conídios podem ser totalmente tolerantes a altas temperaturas. Contudo, a viabilidade conidial decresce rapidamente quando expostos à luz ultravioleta (UV). Em experimento da viabilidade conidial usando um simulador de luz solar a 40°C, a germinação ficou entre 10% e 50% depois de 24 horas de exposição à UV (MORLEY-DAVIES *op. Cit*).

Em alguns casos ocorre a mudança na coloração dos conídios em resposta à composição do meio (LUNA. 1985; PAMPHILE, 1992). Esses fungos são tolerantes a uma faixa de pH de 2,0 a 8,5, sendo que o melhor pH para crescimento vegetativo e esporulação é 6,9. O crescimento vegetativo que precede e acompanha a esporulação é uma fase de extrema importância na capacidade invasiva do inseto, tanto no laboratório, como na produção de inóculos, quanto no campo. A produção de conídios também é indispensável, pois sem esporos não há inoculo (JABOR *et al.*, 2003)

Segundo Clark e colaboradores (1968), a umidade é considerada um dos fatores críticos que afetam tanto o laboratório quanto os testes de campo com *B. bassiana*. A ótima germinação dos conídios deste fungo ocorre em UR acima de 94%. Entretanto, Ferron (1981) relatou que as infecções parecem não ser dependente unicamente da temperatura e a combinação com alta umidade pode ser nociva para os conídios.

De acordo com Alves (1998), Tanada e Kaya (1993) e Milward-de-Azevedo e Parra (1989), as características físicas do solo são capazes de afetar tanto a estabilidade e viabilidade dos entomopatógenos como também o desenvolvimento normal de dípteros muscóides.

3.4. Atividade entomopatogênica de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* nos dípteros muscóides

A entomopatogenicidade dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* vem sendo testada, por meio de pesquisas que visam à utilização destes fungos na produção de biopesticidas, como uma solução efetiva e ecológica para o controle de dípteros muscóides.

Steinkraus (1990 *apud* MACIEL *et al.*, 2005) realizaram infecções experimentais com larvas de terceiro ínstar e adultos de *M. domestica*, inoculando suspensões conidiais de *B. bassiana*. Estes autores observaram que as larvas tratadas apresentavam uma baixa viabilidade pupal, embora a puparização ainda tenha ocorrido. Estes resultados contrastam com os obtidos por Bernardi e colaboradores (2006).

Bernardi e colaboradores (2006) avaliaram o potencial patogênico de dois isolados fúngicos, sendo um de *B. bassiana* e o outro de *M. anisopliae*, sobre larvas de terceiro ínstar de *M. domestica*. O isolado de *M. anisopliae* apresentou maior potencial entomopatogênico sobre pupas de *M. domestica*, sendo que com o aumento da concentração da suspensão de conídios ocorreu diminuição do número de emergência de insetos. Entretanto, o isolado de *B. bassiana* não apresentou efeito sobre o desenvolvimento das larvas e pupas deste díptero muscóide.

Barson e colaboradores (1994) avaliando o potencial entomopatogênico de seis espécies de fungos, citam *M. anisopliae* como a espécie de maior potencial patogênico sobre as larvas de terceiro ínstar de *M. domestica*, quando estas foram mergulhadas em suspensões de 1×10^6 e 1×10^5 conídios/mL emergindo apenas 1% e 16%, respectivamente. Com o aumento da concentração ocorreu a morte de todas as larvas. Todavia, Watson e colaboradores (1995) verificaram resultados contraditórios, observando a morte de 56% e 48% das larvas de *M. domestica* quando testadas com a concentração de 1×10^{10} conídios de *B. bassiana*. Desta forma, larvas de *M. domestica* expostas a *M. anisopliae* reduzem a viabilidade pupal, enquanto *B. bassiana* não afeta o desenvolvimento larval nem pupal.

Segundo Senna-Nunes e colaboradores (2002), *M. anisopliae* assume importância no controle biológico de *M. domestica*, porém nos experimentos realizados com esses dípteros muscóides não foram utilizados isolados fúngicos a partir dos insetos naturalmente infectados.

Kaaya e Munyinyi (1995) realizaram um experimento com esporos de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, misturados com areia esterilizada em diferentes concentrações (1,0 e 0,5 g/L) e larvas de *Glossina morsitans morsitans*, simulando locais de campo para a larviposição. Adultos de *Glossina spp.* emergindo para pupas nas misturas de esporos com areia, sofreram intensa mortalidade (2-10 dias após a emergência). A alta mortalidade registrada foi de 97% para *B. bassiana* e de 80% para *M. anisopliae*. Concentrações baixas de esporos produziram redução de mortalidades. Este experimento contrasta com outros, no tocante a maior eficiência de *B. bassiana* sobre o controle de moscas, em comparação com *M. anisopliae*.

Segundo Renn e colaboradores (1999), durante uma investigação sobre a transmissão horizontal de conídios para a esporulação de *M. anisopliae* na morte e vida de *M. domestica*, não foi observada mortalidade em nenhum dos controles reproduzidos. Quando as moscas foram expostas a outros muscóides mortos com esporulação de *M. anisopliae*, não houve diferenças significativas no número de machos e fêmeas de moscas mortas em cada dia (ANOVA $P > 0,05$). Todavia, houve diferença significativa nas taxas de mortalidade de cada sexo, com um acréscimo significativo (ANOVA $P < 0,001$), na mortalidade de machos de 4 dias, quando 9,3% foram mortos; de 5 e 6 dias, quando 65,3% e 89% foram mortos, respectivamente. Com as fêmeas houve acréscimo significativo (ANOVA $P < 0,001$) em mortes de 3 dias 0%; para 4 dias 20%; para 5 dias 48%; para 6 dias 77,3% e finalmente, para 8 dias 97,33% tinham sido mortas.

Estudos de Renn e colaboradores (1999), feito com iscas contendo formulações a base de *M. anisopliae*, dentro de recipientes, após 10 dias de exposição, machos e fêmeas de *M. domestica* foram altamente suscetíveis, com 92,5% e 100% de mortalidade, respectivamente. Inclusive, variando o número de iscas usadas em cada recipiente, não houve diferença para o número de moscas mortas. Esta observação contrasta com um estudo anterior de RENN (1994) em que números muito altos de iscas formuladas com o nematódeo entomopatogênico *Steinernema feltiae*, reduziu a mortalidade de moscas. Este autor assinalou que a presença de várias iscas causaria perda de tempo em iscas individuais, retardando o sucesso dos nematódeos. Semelhante interferência poderia ter ocorrido durante o estudo com *M. anisopliae*. Contudo, a aderência de conídios deste fungo sobre *M. domestica* seria um processo mais passivo, desde que os conídios caíssem ou se atritassem nas moscas, enquanto elas se moviam através da isca.

Ao passo que os nematódeos sobem na mosca, vindos do substrato das iscas (de onde eles foram inicialmente aplicados). Desta forma indicando que as moscas teriam adquirido um número letal de conídios logo após entrarem no recipiente da isca.

A disseminação dos fungos dentro de uma população de hospedeiros ocorre devido a atividades e movimentos destes hospedeiros, onde podem explorar o seu comportamento e se propagarem nesta população. Considerando o estado fisiológico das fêmeas e a natural exibição no momento dos bioensaios, pode-se supor que exista uma autodisseminação de *M. anisopliae* da fêmea para o macho resultante de acasalamentos (RENN *et al.*, 1999).

Maciel e colaboradores (2005) avaliaram os aspectos do comportamento de *B. bassiana* e sua ação sobre larvas de *Cochliomyia macellaria*, sob condições controladas de laboratório (28 ± 1 °C). Foram feitas suspensões de conídios 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/mL⁻¹ e um grupo controle, em tratamentos compostos de 30 larvas com quatro repetições. *B. bassiana* interferiu nos estágios pré-pupal, pupal e de larvas de *C. macellaria*, embora os resultados obtidos ainda sejam considerados índices semelhantes aos encontrados para a biologia desta mosca, conforme descrito por Greenberg (1971 *apud* MACIEL *et al.*, 2005). A viabilidade pupal diminuiu com o aumento das concentrações, embora a pupação ainda tenha ocorrido com êxito, conforme verificado por Steinkraus (1990 *apud* MACIEL *et al.*, 2005), quando testaram *B. bassiana* em *M. domestica* e *Glossina morsitans morsitans*, respectivamente. O ritmo de emergência de *C. macellaria*, foi analisado, observando-se que a emergência ocorreu entre o 4° e o 6° dia pós-pupação, com um pico no 5° dia para todos os tratamentos com *B. bassiana*, concordando com Cunha e Silva (1990 *apud* MACIEL *et al.*, 2005).

Quanto ao comportamento de *B. bassiana* após a passagem em L3, os referidos autores verificaram os seguintes resultados: o percentual de conídios germinados foi de 79,93%, semelhante ao controle 79,13%. Esses dados são inferiores aos de Smith e colaboradores (1986), provavelmente pela umidade utilizada (66%), pois a germinação apresenta índices maiores em ambiente com percentual de umidade acima de 80%.

Em relação à esporulação após 15 dias, foi encontrado $5,3 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹, dado superior ao controle: $3,34 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹. De acordo com Kalsbeek e colaboradores (2001), o fungo apresenta um número maior

de esporos após a passagem em insetos, embora Luz e Fargues (1998) tenham encontrado um número menor de conídios, mas esta diferença é caracterizada pela virulência entre cepas.

O crescimento colonial e o número de colônias até 15 dias foram maiores do que o controle, não diferindo daquele observado por Rodrigues (2002 *apud* MACIEL *et al*, 2005). Isto está provavelmente correlacionado com fatores como a diferença de temperatura utilizada, de acordo com Luz e Fargues (1998).

O percentual de germinação, esporulação, crescimento colonial e número de colônias de *B. bassiana* após a passagem em larvas L3 de *C. macellaria* foram maiores que o controle, caracterizando a virulência da cepa, determinando que este fungo entomopatogênico pode ser uma alternativa para o controle deste díptero em questão, conforme descrito por Maciel e colaboradores (2005).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A entomopatogenicidade dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* nos dípteros muscóides está na dependência de fatores extrínsecos—como temperatura, umidade, luz, pH, radiação ultravioleta, composição do solo de origem, fatores nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro – e fatores intrínsecos a sua própria virulência adquirida geneticamente, as características morfológicas e fisiológicas, que apresentam grande variação em diferentes meios.

Os níveis de patogenicidade de *M. anisopliae* e *B. bassiana* variam em função do hospedeiro, pois os inóculos provenientes de diferentes hospedeiros possuem graus de patogenicidade diferentes. Esses níveis parecem estar associados a características enzimáticas do fungo, pois algumas partes da cutícula do inseto, são mais suscetíveis ao ataque enzimático do que outras e a atividade de algumas enzimas, como as proteases, são determinantes sobre todos os estágios iniciais da infecção, enquanto que as quitinases são manifestadas em estágios tardios.

Quando a atividade enzimática é reduzida, a baixa patogenicidade pode estar associada a pouca agressividade das toxinas do fungo. Esta ação enzimática é muito complexa, pois para que haja a decomposição de cada um dos componentes da cutícula atuam várias enzimas.

Os estudos de controle de dípteros muscóides com fungos entomopatogênicos no Brasil ainda são muito incipientes, uma vez que não existe um entrosamento entre os centros de pesquisas para a criação de um banco de dados que agilize esses estudos na busca de soluções imediatas.

REFERÊNCIAS

AINSWORTH, G.C. Introduction and keys to higher taxa. In: Ainsworth, G. C., Sparrow, F.K., Sussman, A. S. **The fungi: an advanced treatise**. New York: Academic Press, 1973. Vol. IV.

ALVES, S.B.; NOGUEIRA. Efeito da temperatura na germinação e viabilidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) sorokin. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9, 1984, Londrina. **Resumos...** Londrina: 1984.p.170.

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Editora Manole, 1986. 407p.

ALVES, S.B. Perspectivas para Utilização de Fungos Entomopatogênicos no Controle de Pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária no Brasil**, Brasília, v. 27, s/n, p. 77-86, abr. 1992.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. **Controle Microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998, p. 289-381.

ALVES, S.B.; ROSSI, L.S.; WALDER, J.M.M.; VIEIRA, S.A. Avaliação de fungos entomopatogênicos para *Ceratitis capitata*. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia**, Costa Rica, n. 72, p.31-38, 2004.

ANDRESS, E.R.; DEROUEN, S.M.; FOIL, L.D. **Efficacy of doramectina 0,5% w/v Pour-On for control of the horn fly, *Haematobia irritans***. Vet. Parasitol. v. 90, 2000. p. 327-331.

BARROS, A.T.M. Desenvolvimento e Situação Atual da Resistência da Mosca-dos-chifres a Inseticidas. **Biológico**, São Paulo, v.65, n.1,2, p. 23-24, jan. / dez. 2003.

BARSON, G.; RENN, N.; BYWATER, A. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica* L.), a pest of intensive animal units. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, p. 107-113, 1994.

BARTNICKI-GARCIA, S. Spore Germination in fungi: Basic concepts. In: Roberts, D., Aist, J. (Eds.). **Infection Process of Fungi. A Bellagio Conference**, New York: The Rockefeller Foundation, 1984. p. 111-117.

BAUMGARTNER, D.L. Spread of introduced *Chrysomya* blowflies (Diptera, Calliphoridae) in the neotropics with records new to Venezuela. **Biotropica**, v.20, 1988. p. 167-168.

BERNARDI, E.; PINTO, D.M.; NASCIMENTO, J.S.; RIBEIRO, P.B.; SILVA, C.I. EFEITO DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS METARHIZIUM ANISOPLIAE E BEAUVERIA BASSIANA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA MUSCA DOMESTICA L. (DIPTERA: MUSCIDAE) EM LABORATÓRIO. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 73, n.1, p.127-129, jan. / mar. 2006.

BERTI-FILHO, E. **Controle biológico de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1999. 80p.

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.; KASPERSKI, J.E., WILD, G.A.M. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. **Canadian Journal of Botany / Review Canadien de Botanique**, v. 70, p. 1198-1204, 1998.

BORROR, D.; LONG, D.; TRIPLEHORN, C. **An Introduction to the study of insects**. 5 ed. USA: Saunders College Publishing, 1981. 827p.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C. Host Recognition and Specificity of Entomopathogenic Fungi. In: ROBERTS, D.; AIST, J. (Org.). **Infection**

Processes of Fungi. A Bellagio Conference, New York: The Rockefeller Foundation, 1984. p.185-196.

CARVALHO, A.R.; MELLO, R.P.; D'ALMEIDA, J.M. Microhimenópteros parasitóides de *Chrysomya megacephala*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 6, dez. 2003

CHARNLEY, A.K.; St. LEGER, R.J. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: COLE, G.T.; HOCH, M.C. (Eds.). **The fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals**. New York: Plenum, 1991.p.267-268.

CLARK, T.B.; KELLEN, W.; FUKUDA, T.; LINDEGREN, J.E. Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.11, p. 1-7, 1968.

CLARKSON, J.M.; CHARNLEY, A.K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**, v.4, n.5, p. 197-203, 1996.

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

DAOUST, R.A.; ROBERTS, D.W. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of growth substrate on conidial survival and virulence against mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.41, p.161-170, 1983.

DE BACH, P. **Biological control of insect pests and weeds**. New York: Reinhold, 1964, 844 p.

DESTÉFANO, R.H.R.; DESTÉFANO, S.A.L.; MESSIAS, C.L. Detection of *Metarhizium anisopliae* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n.2, p. 245-252, 2004.

DRIVER, F.; MILNER, R.J.; TRUEMAN, J.W.H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological research**, v.104, n.2, p.134-150, 2000.

DUNN, P. Biochemical aspects of insect immunology. **Annual Review of Entomology**, v.31, p.321-339, 1986.

ELSWORTH, J.F.; GROVE, J.F. Cyclodepsipeptides from *Beauveria bassiana* Bals. Part 1. Beauverolides H and I. **Journal of American Chemical Society** [Perkin 1], v.3, p.270-273, 1977.

FARGUES, J. Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity. In: ROBERTS, D.; AIST, J. (Eds). **Infection Processes of Fungi. A Bellagio Conference**, New York: The Rockefeller Foundation, 1984. p. 90-110.

FERRARI, J.A. Insecticide Resistance. In: BEATY, B.I.; MAQUART, W.C. (Eds). **The Biology of Disease Vectors**. USA: University Press of Colorado, 1996, p.512-529.

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução al Uso de Marcadores Moleculares em el Análisis Genético. **EMBRAPA—CENARGEN**, Brasília-DF, 220p. 1998.

FERRON, P. Biological Control of Insect Pests by Entomogenous Fungi. **Annual Review of Entomology**, v.23, 1978. p.409-442.

FERRON, P. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: BURGESS, H.D. (Ed.). **Microbial Control of Pests and Plant Diseases**. London: Academic Press, 1981, v.24. p.465-482.

FOTEDAR, R.; BANERJEE, U.; SAMANTRAY, J.C.; SHRINIWAS. Vector potential of hospital houseflies with special reference to *Klebsiella* species. **Epidemiology and infection**, v.109, n.1, p.143-147, 1992.

FURLANETTO, S.M.P.; CAMPOS, M.L.C.; HARSI, C.M.; BURALLI, G.M.; ISHIHATA, G.M. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencente ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. **Rev. Microbiol.**, v.15, p.170-174, 1984.

GEORGHIOU, G.P.; LAGUNES-TEJEDA, A. **The occurrence of resistance to pesticides in arthropods**. Rome: Food Agricultural Organization, 1991. 318 p.

GILLESPIE, J.P.; BATEMAN, R.; CHARNLEY, A.K. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locusts, *Schistocerca gregaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.71, p.128-137, 1998.

GREENBERG, B. **Flies and disease – ecology, classification and biotic association**. New Jersey: Princeton Univ. Press, 1971, v.1, 856p.

GREENBERG, B. **Flies and disease. Biology and disease transmission**. Princeton: Princeton Univ. Press, 1973, v.2, 447p.

GUIMARÃES, J.H.; PAPAVERO, N. **Myiasis in man and animals in the Neotropical region**. São Paulo: PLÊIADE, 1999. 308p.

GUIMARÃES, J.H.; PRADO, A.P.; LINHARES, A.X. Three newly introduced blowfly species in southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v.22, n.1, p.53-60, 1978.

GUIMARÃES, J.H.; PAPAVERO, N.; PRADO, A.P. As miíases na região neotropical (Identificação, biologia, bibliografia). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.1, n.4, p.239-416, 1983.

HAJEK, H.A.; St. LEGER, R.J. Interactions between fungal pathogens and insect host. **Annual Review of Entomology**, v.39, p.293-322, 1994.

HSIAO, Y.M.; KO, J.L. Determination of destruxins, cyclic peptide toxins, produced by different strains of *Metarhizium anisopliae* and their mutants induced by ethyl methane sulfonate and ultraviolet using HPLC method. **Toxicon**, v.39, p.837-841, 2001.

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

KAAYA, G.P.; MUNYINYI, D.M. Biocontrol Potential of the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for *Tsetse* Flies (*Glossina* spp.) at Developmental Sites. **Journal of Invertebrate Pathology**, n.66, p.237-241, 1995.

KALSBECK, V.; JUDITH, K.P.; STEEMBERG, T. Sporulation by *Entomophthora schizophorae* (Zygomycetes: Entomophthorales) from Housefly Cadavers and the Persistence of Primary Conidia at Constant Temperatures and Relative Humidities. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.77, p.79-86, 2001.

KOSTINA, M.N.; MELNIKOVA, N.G. Actividad biológica del Dimilin com relación a los diferentes estádios de la *Musca domestica*. **Cuestiones Desinfección Esterilización**, v.1, p. 73-76, 1986.

KOTZE, A.C. Effect of cyromazine on reproduction and offspring development in *Lucilia cuprina* (Diptera: Muscidae). **J. Econ. Entomol.** V.85, p.1614-1617, 1992.

KUNO, G.; MULETT, J.; DE HERNÁNDEZ, A. **Patología de insectos com énfasis em las enfermedades infecciosas y sus aplicaciones em el control biológico**. Cali: Universidad Del Valle, 1981. 75p.

LECLERQ, M. Les myases. **Ann. Soc. Ent.**, France, v.26, p.335-350, 1990.

LOPES, R.B. **CONTROLE DE *Blattella germanica* (L.) COM *Metarhizium anisopliae* E INSETICIDAS REGULADORES DE CRESCIMENTO**. 2005. 121 f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

LUNA, E.A. **Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. 1985. Tese. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LUZ, C.; FARGUES, J. Factors Affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from Fungus-killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.72, p.97-103, 1998.

MACIEL, M.V.; LIMA, E.A.L.A.; ALVES, N.D.; FEIJÓ, F.M.C. **AÇÃO DE *Beauveria bassiana* NO DESENVOLVIMENTO DE *Cochliomyia macellaria* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) EM LABORATÓRIO**. **CAATINGA**, Mossoró-RN, v.18, n.1, p.1-5, jan./mar. 2005.

MARCHIORI, C.H.; PEREIRA, L.A.; FILHO, O.M.S. *Brachymeria podagrica* (Fabricius) (Hymenoptera: Chalcididae) as a parasitoid of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae): first report in Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, n.5, out. 2002.

MARCONDES, C.B. **ENTOMOLOGIA Médica e Veterinária**. São Paulo: Atheneu, 2001. 432p.

MARILUIS, J.C.; LAGAR, M.C.; BELLEGARDE, E.J. Diseminación de enteroparasitos por Calliphoridae (Insecta, Diptera). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.349-351, 1989.

MELLO, R.P. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorhapha) encontradas no Brasil. **Entomologia y Vectores**, Rio de Janeiro, v.10, n.2, p.255-268, 2003.

MILWARD-De-AZEVEDO, E.; PARRA, J.R.P. Influência da Umidade em dois tipos de solo na emergência de *Ceratitits capitata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.23, n.3, p. 321-327, 1989.

MORLEY-DAVIES, J.; MOORE, D.; PRIOR, C. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria spp.* conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. **Mycological Research**, v.100, p.31-38, 1995.

MUGNAI, L.; BRIDGE, P.D.; EVANS, H.C. A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. **Mycological Research**, v.92, n.2, p.199-209, 1989.

NORBERG, A.N.; QUEIROZ, M.M.C.; MAURE, E.A.P.; TOLEDO, R.F.; GAZETA, G.S.; NORBERG, C.M.B.M.; GUIMARÃES, R.R. Vetoração de Fungos por Moscas Sinantrópicas Coletadas em Hospitais, Restaurantes e Feiras da Baixada Fluminense. In: XIV CONGRESSO LATINO AMERICANO DE PARASITOLOGIA, 1999, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: 1999, 103p.

OLIVEIRA, V.C. **Avaliação do Potencial de dípteros Caliptrados como Veiculadores de Ovos de Helminthos na Fundação Rio-Zoo**.1999. 86p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

OLIVEIRA, V.C.; MELLO, R.P.; D'ALMEIDA, J.M. Dípteros muscóides como vetores mecânicos de ovos de helmintos em jardim zoológico, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.36, n.5, p.614-620, 2002.

PAMPHILE, J.A. **Estudos genéticos no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. 1992. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PARRA, J.R.P. Controlando pragas com inimigos naturais. **Ciência Hoje**, v.35, p.18-23, 2004.

PATERSON, I.C.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M.; CLARKSON, M. Partial characterization of specific inducers of cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology**, v.140, p.3153-3159, 1994.

PEDRAS, M.S.C.; ZAHARIA, L.I.; WARD, D.E. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. **Phytochemistry**, v.59, p.579-596, 2002.

POTTERAT, O.; WAGNER, K.; HAAG, H. Liquid chromatography – electrospray time-of-flight mass spectrometry for on-line accurate mass determination and identification of Cyclodepsipeptides in a crude extract of the fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Chromatography A**, v.872, p.85-90, 2000.

PRADO, A.P.; GUIMARÃES, J.H. Estado atual de dispersão e distribuição do gênero *Chrysomya* Robineu-Desvoidy na região neotropical (Diptera: Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.26, n.3, 4, p.225-231, 1982.

QUEIROZ, M.M.C.; NORBERG, A.N.; MAURE, E.A.P.; TOLEDO, R.F.; GAZETA, G.S.; DUTRA, A.E.A.; GUIMARÃES, R.R. Veiculação de bactérias patogênicas por Moscas Sinantrópicas Coletadas em Hospitais, restaurantes e feiras da Baixada Fluminense. In: XIV CONGRESSO LATINO AMERICANO DE PARASITLOGIA, 1999, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: 1999. 103p.

RENN, N. A comparison of baits containing different isolates of entomopathogenic nematodes for the control of *Musca domestica*, using

a large-scale laboratory facility. In: **Proc. Brighton Crop Protection Conf.** UK: The British Crop Protection Council, Farnham, v.3, 1994, p.1061-1066.

RENN, N. BYWATER, A.F.; BARSON, G. A bait formulated with *Metarhizium anisopliae* for the control of *Musca domestica* L. (Dipt., Muscidae) assessed in large-scale laboratory enclosures. **Journal of Applied Entomology**, v.123, p.309-314, 1999.

ROBERTS, D.W. Toxins for the Entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*: isolation of destruxins from submerged cultures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.14, p.82-88, 1969.

ROBERTS, D.Y.; HUMBER, R. Entomopathogenic Fungi. In: ROBERTS, D.; AIST, J. (Eds) **Infection Processes of Fungi. A Bellagio Conference.** New York: The Rockefeller Foundation, 1984, p.1-12.

ROBINSON, W.H. **Urban entomology: insect and mite pests in the human environment.** London: Chapman & Hall, 1996. 430p.

ROUSH, R.T.; MCKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide resistance monitoring programs. **Ann. Rev. Entomol.**v.32, p.361-380, 1987.

SCHÜLLER, L. As moscas domésticas e sua importância na transmissão de intoxicações e infecções alimentares. **Higiene Alimentar**, v.14, n.73, p.28-38, 2000.

SENNA-NUNES, M.S.; COSTA, G.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; SOUZA, E. Avaliação in vitro dos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophilum* em adultos de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Parasitol. Latinoam.**, v.57, p.9-14, 2002.

SMITH, K.G.V. **Manual forensic entomology.** Oxford: University Printing House, 1986, 251p.

St. LEGER, R.J.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.113, p.1-7, 1994.

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

St. LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.253, p.221-232, 1987a.

St. LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.58, p.415-426, 1991.

St. LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Distribution of chymoelastases and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic deuteromycetes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.258, p.123-131, 1987b.

St. LEGER, R.J.; DURRANDS, P.K.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Role of extracellular chymoelastases in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.52, p.285-293, 1988.

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

St. LEGER, R.J.; FRNK, D.C.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **European Journal of Biochemistry**, v.204, p.991-1001, 1992.

SUKONTASON, K.L.; NARONGCHAI, P.; SRIPAKDEE, D.; BOONCHU, N.; CHAIWONG, T.; NGERN-KLUN, R.; PIANGJAI, S. First report of human Myiasis caused by *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) in Thailand, and its implication in forensic entomology. **J. Med. Entomol.** v.42, p.702-704, 2005.

SUZUKI, A.; KAWAKAMI, K.; TAMURA, S. Isolation and structure elucidation of three new insecticidal cyclodepsipeptides, destruxins C and D and desmethyldestruxin B, produced by *Metarhizium anisopliae*. **Biological Chemistry**, v.34, n.5, p.813-816, 1970.

SUZUKI, A.; KAWAKAMI, K.; TAMURA, S. Detection of destruxins in silkworm larvae infected with *Metarhizium anisopliae*. **Biological Chemistry**, v.35, n.10, p.1641-1643, 1971.

TANADA, Y.; KAYA, H.K. **Insect Pathology**. San Diego: Academic Press, 1993.

TIGANO-MILANI, M.S.; GOMES, A.C.M.M.; SOBRAL, B.W.S. Genetic variability among Brazilian isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.65, p.206-210, 1995.

TORRES, H.; ORTEGA, A.; ALCÁZAR, J.; AMES, T.; PALOMINO, L. **Control Biológico del Gorgojo de los Andes (*Premnotrypes spp.*) com *Beauveria brongniartii***. Guia de Investigación CIP 8. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima: 1993, 43p.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.66, p.407-411, 1976.

URTZ, B.E.; RICE, W.C. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, v.104, p.180-186, 2000.

USHER, C.B.; CRUZ, J.; CARVALHO, L.; BRIDI, A.; FARRINGTON, D.; BARRICK, R.A. & EAGLESON, J. Prophylactic use of ivermectin against cattle myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858). **Vet. Parasitol.** v.72, p.215-220, 1997.

VADENBERG, J.; RAMOS, M.; ALTRE, J. Dose-Response and Age and temperature-related susceptibility of the Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to two isolates of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliaceae). **Environmental Entomology**, v.27, n.4, p.1017-1021, 1998.

VAN EMDEN, F.H. **Pest control**. 2ed. Edward Arnold, v.7, 1989, 117p.

VAN LENTEREN, J.C.; BUENO, V.H.P. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. **Biocontrol**, v.48, p.123-139, 2003.

VILACORTA, A. Efeito da temperatura e da nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolados de *Metarhizium anisopliae*, Sorokin. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE ENTOMOLOGIA, 3, 1978, Bahia. **Resumos...** Bahia: 1978. p.70.

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

WATSON, D.W.; GEDEN, C.J.; LONG, S.J.; RUTZ, D.A. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). **Biological control**, v.5, p.405-411, 1995

WILSON, B.H.; BURNS, E.C. Induction of resistance to *Bacillus thuringiensis* in a laboratory strain of house flies. **Econ. Entomol.**, v.61, p.747-748, 1968.

WILSON, F.; HUFFAKER, C.B. The physiology, scope and importance of biological control. In: HUFFAKER & MESSENGER (Eds.). **Theory and practice of biological control**. New York: Academic Press, 1976 p.3-14.

ZIMMERMANN, G. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.40, p.36-40, 1982.

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. **Pesticide Science**, v.37, p.375-379, 1993.