

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Josiane Bettim Bandinelli

**Diversidade genética e relações evolutivas entre as cepas do fungo
Metarhizium anisopliae inferidas a partir da análise das sequências de DNA da
protease tipo subtilisina PR1A**

Porto Alegre, RS
Abril de 2010

Josiane Bettim Bandinelli

**Diversidade genética e relações evolutivas entre as cepas do fungo
Metarhizium anisopliae inferidas a partir da análise das sequências de DNA da
protease tipo subtilisina PR1A**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador
Prof. Dr. Maurício Reis Bogo

Porto Alegre, RS
Abril de 2010

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Bandinelli e Inácia, e às minhas estimadas irmãs Marcele e Michele pelo carinho, apoio e compreensão incondicionais.

Aos amigos, Aline Melo, Caroline Rückert, Flávia Ribeiro, Fernanda Britto, Igor Nornberg, Jacqueline Piccoli, Simone Senna e Taíse Lorenzi, que através das incontáveis conversas sempre me apoiaram e me incentivaram a concluir esta dissertação.

Ao meu querido Vinícius Simões pelo companheirismo e carinho que tornam os meus dias mais felizes.

Aos colegas das áreas de química e de biologia do Colégio de Aplicação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela amizade, incentivo e carinho.

Ao Centro de Biologia Genômica e Molecular da PUCRS por me acolher e por participar do meu processo de formação através dos seus inúmeros ensinamentos.

RESUMO

Para avaliar o grau de variabilidade genética do gene *pr1A* de *Metarhizium* sp., 31 sequências completas foram analisadas conjuntamente com 25 sequências (sendo quatro sequências completas e 21 parciais) retiradas do GenBank. A diversidade global de nucleotídeos para *pr1A* foi 0,032. As árvores filogenéticas, baseadas nas sequências desse gene, foram construídas utilizando os métodos neighbor-joining (NJ), máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI). O fungo entomopatogênico *Lecanicillium psalliotae* foi utilizado como grupo externo em todas as análises filogenéticas. Embora alguns valores de bootstrap tenham sido baixos, em geral, os clados foram consistentes, independentemente dos métodos empregados. Os resultados dos dados das sequências não demonstraram uma ligação clara entre as linhagens e os grupos de hospedeiros. Entretanto, alguns agrupamentos podem ser melhor correlacionados à distribuição geográfica. Além disso, algumas cepas, previamente classificadas como pertencentes à variedade *acridum* e à variedade *majus*, demonstraram perfis genéticos idênticos ao *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, o que pode indicar a existência de uma classificação equivocada nas bases de dados taxonômicos existentes. Por fim, nossos resultados sugerem que a seleção positiva pode ter influenciado parcialmente a atual diversidade do gene *pr1A* existente entre as cepas de *Metarhizium anisopliae*.

Palavras chaves: *Metarhizium anisopliae*; *Pr1A* gene; Diversidade genética; Filogenia molecular de *Metarhizium*; Protease tipo subtilisina PR1A.

ABSTRACT

To assess the extent of genetic variability in the *pr1A* gene of *Metarhizium* sp., 31 complete sequences of this gene were obtained by PCR amplification and analyzed together with 25 additional sequences (being four complete and 21 partial sequences) retrieved from GenBank. Overall, the nucleotide diversity for this gene was 0.032. Phylogenetic trees based on *pr1A* sequences were constructed using neighbor-joining (NJ), maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML), and Bayesian Inference (BI). The entomopathogenic fungus *Lecanicillium psalliotae* was used as outgroup in all phylogenetic analysis. In general, clades were consistently recovered irrespective of the methods used, even though some support values were low. Our results from *pr1A* gene sequence data showed that there was no clear correlation between strains and host groups. Rather, some clades may be better explained by geographic affinities. Moreover, some strains classified within variety *acridum* and variety *majus* showed identical genetic profiles with the *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, and may represent erroneous classification in existing databases. Finally, our results suggest that positive selection may have partially shaped current *pr1A* diversity in this fungus.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*; *Pr1A* gene; Genetic diversity; *Metarhizium* phylogeny; Subtilisin-like protease PR1A.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO.....	II
ABSTRACT	III
1. CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1.1. INTRODUÇÃO	1
1.1.1. Controle Biológico	1
1.1.1.1. Métodos de Controle Biológico.....	2
1.1.1.2. Agentes de Controle Biológico	3
1.1.2. Fungos Entomopatogênicos e Acaricidas	5
1.1.2.1. <i>Metarhizium anisopliae</i>	7
1.1.2.1.1. Diversidade Genética de <i>Metarhizium anisopliae</i>	8
1.1.2.1.2. O Processo de Infecção de <i>Metarhizium anisopliae</i>	10
1.1.3. Protease Tipo Subtilisina PR1A	11
1.2. OBJETIVOS	15
1.2.1. OBJETIVO GERAL.....	15
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2. CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO	16
3. CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXO – Comprovante de submissão de artigo científico	54

1. CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. INTRODUÇÃO

1.1. 1. Controle Biológico

O uso de pesticidas químicos ainda é dominante sobre os sistemas de produção agrícola. A alta e rápida eficiência, o custo relativamente baixo, a facilidade na manipulação e a versatilidade justificaram por muito tempo a sua utilização (DENT, 1995). No entanto, nas últimas décadas, esta prática vem decaindo devido aos casos de resistência, contaminação ambiental e riscos para a saúde humana (THOMAS; READ, 2007).

A crescente preocupação com o meio ambiente, juntamente com a ampla divulgação dos problemas que os pesticidas químicos têm ocasionado, acentuaram as buscas por métodos alternativos para minimizar ou, até mesmo, substituir o emprego dos mesmos. Dentro desse contexto, o controle biológico ganhou importância, uma vez que há exigências cada vez mais restritivas à presença de pesticidas nos produtos alimentícios a serem comercializados no mercado mundial (DE NARDO; MORAES; DE SÁ et al., 1998). A utilização do controle biológico tem sido vista como uma opção viável e extremamente racional, especialmente em países em desenvolvimento, carentes de recursos financeiros e possuidores de vastas áreas agriculturáveis, como é o caso do Brasil (MELO; AZEVEDO, 2000).

O termo controle biológico pode sofrer algumas variações no seu significado, de acordo com a formação do praticante. Contudo, a definição mais aceita entre as disciplinas envolvidas no manejo de pragas é a mesma empregada pelos entomologistas (DENT, 1995). Sendo assim, podemos definir controle biológico como o uso de populações de parasitóide, predador, competidor, patógeno, ou antagonista para suprimir populações-praga, potencializando uma abundante diminuição dos danos que essas poderiam causar (VAN DRIESCHE; JR BELLOWS, 1996a).

Entende-se por população-praga qualquer organismo que venha a competir com o homem pelo alimento por ele produzido, ocasionando prejuízos econômicos (GARCIA, 1999). As práticas de biocontrole não visam extinguir os agentes importunos, mas apenas regular a sua densidade populacional, por ação direta de outros seres vivos, denominados inimigos naturais.

1.1.1.1. Métodos de Controle Biológico

Os três principais métodos, amplamente aceitos, de controle biológico são: a conservação, o incremento e a introdução. O método da conservação das espécies inimigas naturais envolve técnicas que propiciam a sobrevivência e a reprodução das mesmas, como a identificação e a retificação das possíveis influências negativas que essas podem estar sofrendo (VAN DRIESCHE; JR BELLOWS, 1996b).

No controle por incremento, devido ao fato do inimigo natural estar ausente, ou chegar tarde, ou simplesmente estar muito escasso para prover o manejo (KING; HOPPER; POWELL, 1985), pode-se fazer a inoculação de um pequeno número de

agentes de controle, aguardar que eles se multipliquem naturalmente e façam a regulação da população praga. Ou, adotar a técnica do incremento por inundação, a qual consiste na liberação em massa de uma grande quantidade de inimigos naturais competentes para realizar o controle imediato (VAN DRIESCHE; JR BELLOWS, 1996b).

A introdução de espécies de inimigos naturais, comumente conhecida como “controle biológico clássico”, por refletir a predominância histórica desse método, incide na importação de agentes, nativos ou não, capazes de conter os organismos indesejáveis (ORR; SUH, 1998). Esse procedimento é amplamente utilizado na manutenção de pragas exóticas, visto que os inimigos naturais estão ausentes no novo ambiente de colonização (DENT, 1995).

A utilização desses métodos fornece um componente sustentável e ambientalmente seguro para um moderno método de manejo dos agroecossistemas (WAAGE, 1994). Porém, Sosa-Gómez et al. (1998) ressalta que a implementação de programas de controle biológico requer amplos estudos de impacto ambiental a fim de estimar os possíveis efeitos dessa prática não só sobre a praga e as espécies a ela relacionadas, mas também sobre os demais componentes que ocupam este ambiente.

1.1.1.2. Agentes de Controle Biológico

Os agentes de controle biológico foram utilizados, primeiramente, em insetos, ácaros e plantas daninhas. Posteriormente, os programas se difundiram e outros

invertebrados, patógenos de plantas e até mesmo vertebrados foram incluídos como possíveis alvos desses agentes (VAN DRIESCHE; JR BELLOWS, 1996b).

Os insetos-praga são os organismos nos quais as práticas do controle biológico estão mais difundidas (LAING; HAMAI, 1976). Possuem cerca de um milhão de espécies identificadas, dessas, aproximadamente, 1% pode ser considerada prejudicial ao homem, provocando danos econômicos na ordem de bilhões de dólares por ano em todo o mundo (MOSCARDI, 2002).

O controle microbiano de insetos entrou em ascensão com o aumento das publicações científicas a respeito das patologias dos insetos. A aquisição de novos conhecimentos e a evolução dos programas de pesquisa forneceram subsídios para o desenvolvimento da bacteriologia, virologia e micologia como agentes de controle para esses organismos (FERRON, 1978; DEBACH; ROSEN, 1991).

Não só bactérias, vírus e fungos são responsáveis por desenvolverem enfermidades em insetos. Protozoários e nematóides também geram processos patológicos e, portanto, são do mesmo modo relevantes para o controle dos insetos-praga, bem como para a cura das doenças dos insetos úteis. Contudo, os fungos são responsáveis por aproximadamente 80% das moléstias que ocorrem entre os insetos. Por exemplo, no Brasil, mais de 20 espécies atuam sobre insetos-praga de importância econômica, dentre eles podemos citar: *Metarhizium anisopliae* no controle da cigarrinha (*Mahanarva posticata*) da cana-de-açúcar; *Beauveria bassiana* para a regulação da broca-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus*) e dos percevejos da soja; *Nomuraea rileyi* empregado no manejo da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) (ALVES, 1998).

1.1.2. Fungos Entomopatogênicos e Acaricidas

Fungos são organismos eucariontes, aclorofilados, heterótrofos, de tamanho e forma variáveis. Podem ser unicelulares, como no caso das leveduras, ou constituídos por um conjunto filamentosos de micélio, por sua vez composto de células denominadas hifas, com parede celular contendo celulose e/ou quitina, além de outros açúcares, como as glucanas (ALVES, 1998). Podem ser saprófitas ou parasitas, mas em ambos os casos, as substâncias nutritivas são adsorvidas após terem sido parcialmente digeridas por meio de enzimas. Embora a maioria das espécies de fungos sejam saprófitas, há um número expressivo de espécies responsáveis pelo desenvolvimento de enfermidades em diversos animais e plantas.

Os fungos entomopatogênicos e acaricidas são inimigos naturais comuns de artrópodes em todo o mundo, e atraem a atenção como agentes potenciais de controle biológico (SHAH; PELL, 2003). Inúmeras pesquisas estão sendo desenvolvidas focando aspectos teóricos e práticos da biologia, fisiologia, ecologia e epidemiologia desses organismos, mas os estudos sobre a sua potencial capacidade de regular a população hospedeira são predominantes (ROY, 2006).

Mais de 700 espécies pertencentes a aproximadamente 90 gêneros de fungos foram identificados como agentes entomopatogênicos (FREIMOSER et al. 2003). Dentre esses gêneros, *Metarhizium* e *Beauveria* são mundialmente conhecidos e intensamente investigados como agentes de controle biológico para diversas pragas agrícolas de expressão econômica (BROOKS; WALL, 2005).

Os fungos entomopatogênicos e acaricidas acometem diversos artrópodes, principalmente, insetos fitófagos, aquáticos e pragas de solo em diferentes fases do

seu ciclo de desenvolvimento (ovos, larvas, ninfas e adultos). Apresentam disseminação horizontal e a grande maioria trata-se de patógenos epizooticos – possuem elevadas taxas de crescimento e de reprodução, possuindo unidades infectantes com grande capacidade de sobrevivência, infecção, colonização e dispersão (FUXA, 1987; ALVES, 1998).

Por essas várias razões, esses organismos, constituem um grupo muito promissor para o desenvolvimento de micopesticidas (ST LEGER et al, 1996). Sem mencionar o fato do processo de infecção, em geral, ocorrer via tegumento, possibilitando a contaminação do hospedeiro independentemente da sua atividade alimentar. Isso os coloca em vantagem quando comparados a outros grupos de patógenos (FERRO, 1978; FUXA, 1987; BITTENCOURT, 2000; PEDRINI; CRESPO; JUÁREZ, 2007; THOMAS; READ, 2007).

A atividade dos fungos é fortemente influenciada por fatores abióticos como, por exemplo, alta umidade do ar, para a germinação dos conídios, infecção e esporulação, e temperatura, responsável por modular a velocidade com que o parasita mata o hospedeiro. Essa dependência relativa aos fatores abióticos, talvez, seja a maior desvantagem do processo de infecção desses organismos patogênicos (FERRO, 1978; FUXA, 1987).

1.1.2.1. *Metarhizium anisopliae*

O fungo filamentosso entomopatogênico e acaricida, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), é usualmente conhecido como agente causador da doença muscardine verde (DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000). Essa espécie foi descrita pela primeira vez em 1879 por Metschnikoff, na Rússia, com o nome de *Entomophthora anisopliae* e, em 1883, passou a ser denominada *Metarhizium anisopliae*, por Sorokin (TULLOCH, 1976). Segundo a revisão taxonômica realizada por DRIVER et al. (2000) a espécie *M. anisopliae* apresenta quatro variedades (var.): var. *anisopliae*, var. *acridum*, var. *majus* e var. *lepidiotum*, todas elas patogênicas aos artrópodes.

Metarhizium anisopliae (Metschn.) Sorokin é amplamente empregado no controle biológico de muitos artrópodes, principalmente insetos e ácaros importantes economicamente (FRAZZON et al., 2000; KANZOK; JACOBS-LORENA, 2006), sendo inclusive utilizado comercialmente em muitos países, como Austrália, Brasil, Estados Unidos e Filipinas (BRIDGE et al., 1993; DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000). No Brasil, o programa de controle biológico da cigarrinha da folha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata* (Stal.), na região nordeste, desde 1970, é um exemplo sólido da aplicabilidade desse entomopatógeno (OLIVEIRA, 2006). Nesse programa, o método adotado para o biocontrole das cigarrinhas é a técnica do incremento por inoculação. Os organismos da espécie *M. anisopliae* que têm sido utilizados foram selecionados por meio de bioensaios, partindo-se de um grande número de isolados coletados na região nordeste. Essa linhagem foi devidamente

caracterizada e armazenada em condições especiais para que não perca a identidade e, principalmente, a sua virulência (ALVES, 1998).

Muitas pesquisas vêm sendo conduzidas para aperfeiçoar a produção e a estocagem dos conídios de *Metarhizium* (LEEMON; JONSSON, 2008). Os fungos crescem facilmente *in vitro* em diversos meios de cultura, utilizando como fonte de carbono amido, glicose, glicerina, levulose, maltose, sacarose e quitina (JABOR et al., 2003). No entanto, as condições de armazenamento são mais críticas para a manutenção da viabilidade e virulência dos esporos (DAOUST; ROBERTS, 1983a; RATH et al., 1995), uma vez que são drasticamente afetados pelos fatores ambientais como umidade relativa, temperatura e luminosidade. Por exemplo, a viabilidade dos conídios diminui rapidamente quando expostos à radiação ultravioleta (MORLEY-DAVIES; MOORE; PRIOR, 1995), entretanto, podem sobreviver por longo período de tempo sob temperatura moderada e alta umidade relativa (26°C e 97% UR ou 19°C e 97% UR) ou temperatura e umidade baixa (4°C e 0% UR) (DAOUST; ROBERTS, 1983b). Essas influências ambientais podem interferir não só na produção e estocagem dos conídios, mas também na própria manutenção do desenvolvimento do fungo no campo.

1.1.2.1.1. Diversidade Genética de *Metarhizium anisopliae*

Vários estudos moleculares, empregando diferentes estratégias, como polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), DNA polimórfico amplificado randomicamente (RAPD), DNA microssatélite, sequências de espaçadores internos transcritos – (ITS)-rDNA – sequências de regiões intergênicas

não-transcritas – (IGS)-rDNA – sequências de DNA mitocondrial (mtDNA), têm sido conduzidos a fim de estimar a diversidade genética das populações de fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium* (FEGAN et al., 1993; LEAL et al., 1994; LEAL et al., 1997; MAVRIDOU; TYPAS, 1998; PANTOU; MAVRIDOU; TYPAS, 2003; HUGHES et al., 2004; VELÁSQUEZ et al., 2007; YANAKA-SCHÄFER et al., 2008), bem como tentar esclarecer os conflitos existentes na identificação e classificação de espécies e isolados, previamente estabelecidos, com base em caracteres morfológicos (MILNER et al., 1994; DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000).

O potencial limitado das características morfológicas utilizadas na distinção entre espécies de *Metarhizium* tem sido sistematicamente demonstrado quando as metodologias moleculares são empregadas para avaliar a variabilidade genética inter e intraespecíficas. Por exemplo, Leal et al. (1997) empregou a técnica baseada na digestão de endonucleases de restrição de produtos da PCR provenientes do gene da protease Pr1 para caracterizar cepas de *Metarhizium*. Nesse estudo, Leal et al. (1997) identificou 15 perfis diferentes para as 40 cepas de *Metarhizium* estudadas. Outro exemplo são as análises das sequências das regiões ITS e do segmento de expansão D3 do gene LSU rDNA que permitiram identificar em nível de subespécies do gênero *Metarhizium*. Ao correlacionar-se os dados dessas sequências com os perfis de RAPD foram encontrados um grau muito maior de variabilidade, sendo capaz de distinguir diferentes cepas dentro de uma mesma variedade (DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000).

As abordagens moleculares para detectar polimorfismos em fungos têm, certamente, adicionado valiosas informações acerca da diversidade desses organismos. A genotipagem das linhagens permite estabelecer uma correlação entre os genótipos e as características de interesse, como o grau de patogenicidade, o

qual é uma informação relevante para a engenharia genética do controle microbiano de artrópodes.

1.1.2.1.2. O Processo de Infecção de *Metarhizium anisopliae*

O processo de infecção do fungo *M. anisopliae* é bem estudado e, basicamente, combina mecanismo físico, devido à pressão exercida pelo apressório e pelo grampo de penetração, e químico, resultante da degradação da cutícula do hospedeiro pela ação sinérgica de enzimas hidrolíticas como as proteases, quitinases e lipases (PATERSON et al., 1994; CLARKSON; CHARNLEY, 1996; GIMÉNEZ-PECCI, 2002). O passo inicial da micose consiste na adesão do conídio sobre a cutícula do hospedeiro. Sob condições favoráveis acontece a germinação do conídio originando o tubo germinativo. Na extremidade do tubo germinativo ocorre uma dilatação das hifas, formando o apressório. Na porção inferior desse apressório uma hifa sofre diferenciação, tornando-se mais fina e saliente, denominado grampo de penetração, o qual tem a função de iniciar o processo de penetração. A partir da penetração ocorre o desenvolvimento do micélio, primeiramente no tegumento e posteriormente na hemocele. Normalmente, o micélio não se propaga demasiadamente antes da morte do hospedeiro, somente após a morte do hospedeiro há a disseminação de hifas filamentosas sobre todos os tecidos (ALVES, 1998). Após a ramificação do micélio, são produzidos conídios de coloração esverdeada, que cobrem a superfície do cadáver, resultando na mumificação do indivíduo, doença conhecida por muscardine verde (SMALL, BIDOCHKA, 2005). A

morte do hospedeiro ocorre entre quatro e dezesseis dias (dependendo da espécie hospedeira) após a contaminação com o fungo (SCHOLTE et al., 2004).

A cutícula é a primeira linha de defesa contra as infecções, a segunda é a resposta imune inata do hospedeiro. O sucesso da infecção depende da capacidade do fungo de romper a cutícula e de superar a resposta imune do indivíduo. Essa resposta imune pode ser tanto celular quanto humoral e a ativação desse sistema ocorre assim que se inicia a degradação da cutícula durante a penetração (GILLESPIE et al., 2000). As toxinas e enzimas secretadas durante a infecção, além de danificar a cutícula, também atuam na redução das defesas do organismo parasitado (PEDRINI; CRESPO; JUÁREZ, 2007). Essas toxinas e enzimas têm sido estudadas com a finalidade de correlacioná-las aos processos de especificidade, patogenicidade, virulência, evolução do sistema parasita-hospedeiro e diversidade genética das espécies e cepas.

1.1.3. Protease Tipo Subtilisina PR1A

Os fungos entomopatogênicos exibem muitos atributos que determinam a sua virulência sobre os seus hospedeiros. De particular importância são as enzimas degradativas (TIAGO; FUNGARO; FURLANETO, 2002), tais como proteases, lipases e quitinases (ST LEGER; CHARNLEY; COOPER, 1986). A ação sinérgica dessas enzimas é fundamental para o processo de infecção, pois degradam os componentes presentes na cutícula do hospedeiro, permitindo o desenvolvimento da micose (ST LEGER; CHARNLEY; COOPER, 1986; GIMÉNEZ-PECCI et al., 2002).

Muitos trabalhos têm sido conduzidos a fim de identificar e caracterizar proteases produzidas pelo fungo *M. anisopliae*, dentre elas a protease tipo subtilisina PR1 (ST LEGER; CHARNLEY; COOPER, 1987; ST LEGER; BIDOCHKA; ROBERTS, 1994a; ST LEGER, 1995), cuja função também foi descrita por St. Leger et al. (1988).

A PR1 é uma das enzimas mais importantes produzidas durante o processo de infecção (ST LEGER et al., 1992; ST LEGER, 1995; GILLESPIE; BATEMAN; CHARNLEY, 1998) e, também, a mais conhecida (ROBERTS; GUPTA; ST LEGER, 1992). Essa protease possui atividade tipo quimoelastase, que permite a adsorção à cutícula (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1994), sendo capaz de hidrolisar proteínas insolúveis presentes no tegumento do hospedeiro, favorecendo a penetração do fungo através da cutícula com concomitante provisão de nutrientes (ST LEGER; BIDOCHKA; ROBERTS, 1994b).

Um estudo realizado com inibidores específicos de PR1 ou anticorpos policlonais contra-PR1 evidenciou uma notável redução da virulência de *M. anisopliae* sobre o inseto *Manduca sexta*. Os autores observaram que ocorreu a germinação dos conídios na superfície do tegumento do inseto, porém não houve a penetração das hifas através da cutícula, e a taxa de mortalidade dos insetos foi atenuada. Esse trabalho sugere que PR1 é um fator de virulência, porque está intrinsecamente relacionada à habilidade do fungo em degradar as proteínas cuticulares, permitindo uma rápida invasão (ST LEGER et al., 1988). Posteriormente, em 1989, St Leger e colaboradores identificaram a PR1 como a principal protease secretada durante o processo de infecção e, portanto, associada à patogenicidade. Mais recentemente, outro estudo evidenciou que quando cópias múltiplas do gene *pr1A* – denominação utilizada após a publicação do trabalho de Joshi et al. (1997) –

foram fusionadas a um promotor constitutivo, a virulência dos fungos *M. anisopliae* transformados foi substancialmente aumentada, ocorrendo uma redução de 25% no tempo necessário para matar as larvas de *Manduca sexta*, em relação à linhagem selvagem. Esse trabalho também associou o poder de infecção à atividade de PR1A (ST LEGER et al., 1996).

Distintas isoformas de protease tipo subtilisina PR1 (PR1A, PR1B e PR1C) foram reconhecidas por meio de análises de eletroforese de focalização isoeletrica e caracterizadas através de métodos de especificidade por substratos (ST LEGER; BIDOCHKA; ROBERTS, 1994b), clonagens e seqüenciamentos (ST. LEGER et al., 1992; JOSHI; ST LEGER; ROBERTS, 1997). Diferenças na atividade catalítica foram observadas, sugerindo uma possível relação ao grau de virulência do patógeno (JOSHI; ST LEGER; ROBERTS, 1997).

Bidochka e Melzer (2000) conduziram estudos sobre a variabilidade genética das isoformas (PR1A, PR1B e PR1C) fazendo uso da técnica de RFLP em cepas de *M. anisopliae*. Os resultados indicam que os genes *pr1* representam uma família multigênica, possivelmente, derivada de um ancestral comum do gene da protease tipo subtilisina. PR1A revelou grande variação no perfil RFLP entre todos os isolados de *Metarhizium*, enquanto poucas diferenças foram observadas nas isoformas PR1B e PR1C. Os autores propõem que o gene *pr1A* codifica a protease tipo subtilisina ancestral, e as demais isoformas surgiram a partir de eventos de duplicação e rearranjo gênico.

Em 2004, Baga e equipe identificaram 11 genes *pr1* (*pr1A* até *pr1K*) em isolados de *M. anisopliae* por análises de etiquetas de sequências expressas (EST), realizando uma caracterização global da diversidade das subtilisinas desse patógeno. Os resultados de EST para PR1A corroboram a predominância dessa

enzima durante a degradação da cutícula do hospedeiro, a qual é dez vezes mais abundante que a segunda mais expressa (PR1J). O significado adaptativo dessas isoformas ainda não está claro. Contudo, presumivelmente, a diversidade das subtilisinas pode estar relacionada à patogenicidade, aumentando a adaptação ao amplo número de hospedeiros (BAGGA et al., 2004), visto que a composição da cutícula varia entre as diversas espécies de artrópodes (GILLESPIE; BATEMAN; CHARNLEY, 1998).

Estudos adicionais em relação à variabilidade intra e interespecífica dessas isoformas, para os principais gêneros de fungos entomopatogênicos e acaricidas, podem contribuir para a engenharia dos biopesticidas.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste projeto de pesquisa é inferir a diversidade genética do gene *pr1A* entre distintos isolados de *Metarhizium anisopliae*, agente patogênico de inúmeros artrópodes, provenientes de diferentes localidades do Brasil e do mundo.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar as forças seletivas que atuam na evolução da estrutura primária da protease PR1A entre as distintas linhagens de *Metarhizium anisopliae*.
- Verificar se há correlação entre os genótipos encontrados e o tipo de hospedeiro.
- Estabelecer a filogenia molecular das linhagens de *Metarhizium anisopliae* a partir da análise da sequência do gene *pr1A*.

2. CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO

Genetic diversity and evolutionary relationships among strains of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* inferred from DNA sequences of the subtilisin-like *pr1A* gene

Josiane Bettim Bandinelli, Fernanda Britto da Silva, Jaqueline Battilana, Talita Carneiro Brandão Pereira, Nicole de Miranda Scherer, Nelson Jurandi Rosa Fagundes, Maurício Reis Bogo

Artigo submetido ao periódico Mycopathologia

Genetic diversity and evolutionary relationships among strains of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* inferred from DNA sequences of the subtilisin-like *pr1A* gene

Josiane Bettim Bandinelli¹, Fernanda Britto da Silva¹, Jaqueline Battilana², Talita Carneiro Brandão Pereira¹, Nicole de Miranda Scherer³, Nelson Jurandi Rosa Fagundes⁴, Maurício Reis Bogo^{1*}

¹Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681 – Prédio 12, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

²Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Avenida Luis de Camões, 2090, 88520-000 Lages, SC, Brazil.

³Bioinformatics Department, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstr. 1, Geb. 25.02.02, 40225 Düsseldorf, Germany.

⁴Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500 – Prédio 43312, sala 108, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author: Maurício Reis Bogo, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681 – Prédio 12, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil. Telephone: +55 51 3320 3500/ Ext. 4727. Fax: + 55 51 3320 3568. E-mail address: mbogo@pucrs.br

Genetic diversity and evolutionary relationships among strains of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* inferred from DNA sequences of the subtilisin-like *pr1A* gene

Abstract

To assess the extent of genetic variability in the *pr1A* gene of *Metarhizium* sp., 31 complete sequences of this gene were obtained by PCR amplification and analyzed together with 25 additional sequences (being four complete and 21 partial sequences) retrieved from GenBank. Overall, the nucleotide diversity for this gene was 0.032. Phylogenetic trees based on *pr1A* sequences were constructed using neighbor-joining (NJ), maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML), and Bayesian Inference (BI). The entomopathogenic fungus *Lecanicillium psalliotae* was used as outgroup in all phylogenetic analysis. In general, clades were consistently recovered irrespective of the methods used, even though some support values were low. Our results from *pr1A* gene sequence data showed that there was no clear correlation between strains and host groups. Rather, some clades may be better explained by geographic affinities. Moreover, some strains classified within variety *acridum* and variety *majus* showed identical genetic profiles with the *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, and may represent erroneous classification in existing databases. Finally, our results suggest that positive selection may have partially shaped current *pr1A* diversity in this fungus.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*; *Pr1A* gene; Genetic diversity; *Metarhizium* phylogeny; Subtilisin-like protease PR1A

Introduction

Biological insecticides are achieving prominence in pest management, in view of the growing concerns about environmental degradation and the need to minimize the use of chemical insecticides [1]. *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) is an entomopathogenic filamentous fungus that parasitizes a wide range of insect hosts and has considerable potential as a biological control agent [2]. Like most fungal pathogens, *Metarhizium anisopliae* uses a combination of mechanical force and enzymatic mechanisms to transverse the first physical barrier to insect infection, which is the insect cuticle, composed primarily of proteins, and thus access the nutrient-rich haemolymph [3].

The best-known determinant of fungal entomopathogenicity and virulence is based on the subtilisin-like serine protease (designated Pr1) of *Metarhizium anisopliae*, where its role in host invasion has been clearly demonstrated [4-6]. This enzyme is adapted to extensively degrade insect cuticular proteins [7] and has been ultrastructurally located in the host cuticle during the early stages of penetration [8]. Four isoforms of Pr1 were separated from *M. anisopliae* by isoelectric focusing and characterized according to substrate specificity [9]. Three of these Pr1 isoforms (Pr1A, Pr1B, and Pr1C) have been cloned and sequenced [5, 10], and among them, Pr1A showed the greatest variation in RFLP patterns between all *Metarhizium* isolates while few differences were observed for Pr1B and Pr1C [11].

Several kinds of molecular approaches have been utilized to study the genetic diversity, to establish the phylogenetic relationships within the *Metarhizium* species and to resolve problems regarding the identification of species and isolates based on morphological characters, which generally have limited power to distinguish

members of different genera or varieties within species [12]. In 1997 the use of a method that combines the polymerase chain reaction (PCR) technique with RFLP was described by Leal *et al.* [13] to detect and characterize strains of *M. anisopliae* in infected insects. In this method, endonuclease digestion of PCR products derived from the *pr1* protease gene with subsequent analysis by electrophoresis led to the differentiation of 15 restriction profiles among 40 *Metarhizium* strains. Because *pr1A* is has an important role in infection, it is interesting to compare the level and structuring of genetic diversity within this gene to those reported using “neutral” markers such as rDNA sequence data, which have been widely used to investigate genetic diversity within fungus populations [14-18].

In this study, we determined the level of intraspecific genetic variability among *Metarhizium* strains using DNA sequences of the *pr1A* gene, and we also attempted to understand which forces are the major determinants of its evolution. Analyses of the genetic variation in genes encoding proteases of entomopathogenic fungi may have the additional advantage of contributing to the exploitation of antifungal agents.

Materials and Methods

Isolates

DNA samples of the 31 *Metarhizium* strains used in this study are available in the Centro de Biologia Genômica e Molecular at the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). These samples were provided by the Brazilian Agricultural Research Corporation (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa), the Genetics and Biotechnology Research unit (Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN), Brasília-DF, Brazil; the School of Biological Sciences, University of Wales, University College Swansea, Swansea, Wales, UK; and the Luiz de Queiroz College of Agriculture (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ), São Paulo, Brazil. An additional 25 *Metarhizium anisopliae pr1A* DNA sequences were retrieved from GenBank using the Basic Alignment Search Tool (BLAST) and included in the analysis. All new sequences were submitted to GenBank. The entomopathogenic fungus *Lecanicillium psalliotae* (AY870806) was used as the outgroup in phylogenetic analyses. See Table 1 for the basic information about the samples used in this study.

Amplification and Sequencing

The Pr1AF (5' ATGCATCTGTCTGCTCTTCTC 3') and Pr1AR (5' TTAGGCACCGTTGCCGTTGTAG 3') primer set was designed to amplify the *pr1A* gene. Reactions were carried out in volumes of 25 µl, consisting of 25 ng of DNA template, 0.2 mM of dNTP, 0.4 µM of each primer, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl, 1 unit of Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 2.0 mM of MgCl₂ and ultra-pure

water. Amplifications used an initial denaturing step at 94 °C for 1 min followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 60 °C for 1 min and 72 °C for 2 min, followed by a final extension step at 72 °C for 10 min. PCR products were stained with GelRed (Biotium), visualized by agarose gel electrophoresis and purified with polyethylene-glycol 8000. The sequencing reactions were performed using the DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare) and were read in a MegaBACE 1000 sequencer (GE Healthcare). Pr1ARN (5' GCATCTTCAGCTCCTCCTTGG 3') and Pr1AFC (5' GTAGCAATGTTCTTTCCACCTGG 3') were designed as additional internal sequencing primers.

Data Analysis

Chromatograms were read using Chromas 2.23 software (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). Alignments were performed with ClustalX [19] and edited by visual inspection with the program BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Levels of nucleotide and haplotype diversity, neutrality tests (Tajima's D, Fu and Li's D, Fu and Li's F, and Fu's Fs) and G+C content were calculated using DnaSP 4.10.4 [20] and Arlequin 2.0 [21]. Transition/transversion ratios, nucleotide and amino acid compositions were estimated using MEGA 4 [22].

The evolutionary model of nucleotide substitution was selected by the Akaike information criterion (AIC) implemented in Modeltest 3.06 [23], in which the TVM+G model was selected. Phylogenetic analyses were estimated using neighbor-joining (NJ), in MEGA 4 [22], maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML), in PAUP* 4.0b10 [24], and Bayesian Inference (BI), in MRBAYES [25]. The NJ tree was based on p-distance and 1000 bootstrap replicates were performed to

determine the reliability of the observed groups. The MP tree was generated using ten replicates of heuristic searches with random addition of sequences, and branch support was evaluated with 100 bootstrap replicates. The ML tree was performed using a TVM+G model with heuristic searches using neighbor-joining starting trees and tree-bisection-reconnection branch swapping. For bootstrap support values, 100 replicates were conducted using same search strategy. Bayesian Inference (BI) was performed with four Markov Chain Monte Carlo (MCMC) and was carried out under the TVM+G model using 1,000,000 MCMC steps and sampling every 100 steps. The chains became stationary after 16,500 steps, so previous steps were discarded as burn-in. The estimation of the tree with the highest posterior probability was done through the majority-rule consensus of the remaining trees. For each clade, the nucleotide diversity and its standard error were calculated using DnaSP 4.10.4 [20].

To assess which selective forces may have influenced *pr1A* evolution, we tested different codon-based ML substitution models, implemented in the codeml program from the package PAML 4 [26]. Under these models, the rate of non-synonymous (dN) and synonymous (dS) substitutions are estimated, and their ratio ($\omega = dN/dS$) measures the selective pressure at the protein level [27]. A value of $\omega < 1$ indicates negative (purifying) selection, while $\omega = 1$ is interpreted as neutral evolution, and $\omega > 1$ means positive (adaptive/diversifying) selection. Analyses were performed using six models: M0 (one ratio), which averages ω over all codon sites; M1a (nearly neutral) assumes two site classes of ω ($\omega_0 < 1$ and $\omega_1 = 1$); M2a (positive selection) adds a third class for which ω is higher than 1 ($\omega_2 > 1$); M3 (discrete) also uses three classes, but differently from the previous model each class can assume any value of ω ; M7 (beta) assumes that (ω) is beta-distributed across sites following ($0 \leq \omega \leq 1$); and

M8 (beta & omega) adds an extra class that accounts for sites for which $\omega > 1$. Likelihood ratio tests (LRT) were used to compare nested models (M0 vs. M3, M1a vs. M2a and M7 vs. M8), and AIC was used to compare all models. All molecular evolution analyses were performed using only complete coding sequences, with introns and identical sequences excluded from the alignment, resulting in a final dataset containing 20 sequences and 390 codons.

Results and Discussion

Analysis of *pr1A* gene sequences

In total, 56 sequences of the *pr1A* gene, from isolates of *Metarhizium anisopliae*, were analyzed. Of these, 31 complete sequences are exclusive from this study and 25 were retrieved from GenBank (four complete sequences and 21 partial sequences). One additional sequence of the *pr1A* gene, of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium psalliotae*, was used as outgroup in all phylogenetic analysis. The *pr1A* gene sequence has four exons and three introns conservatively inserted in the gene. The description of the gene structure and the basic statistics are shown in Table 2.

According to Wang *et al.* [28], all introns have the typical 5' and 3' boundaries GT and AG of spliceosomal introns and decoding analysis indicated that these introns were phase 0 introns, i.e., the exons of *pr1A* were symmetric. However, we found different sizes for introns I and III. Strain CG648 is the only to have 68 bp in intron I, because it has a deletion of eight nucleotides at positions 304-311, while all other examined strains have 76 bp. Intron III has four different sizes: 70 bp: due to a deletion of bases AC at positions 1178-1179 in five strains: CG38, CG191, V218, V248 and V301, or due to a deletion of CA bases at positions 1179-1180 in 24 strains: CG30, CG31, CG32, CG33, CG37, CG39, CG40, CG41, CG43, CG143, CG144, CG340, CG341, CG419, CG423, CG438, CG491, CG578, CG626, CG644, CG648, CG858, V285 and M5; 68 bp: with the deletion of ACCT bases at positions 1132-1135 in four strains: ARSEF2575, ARSEF3540, V208 and Ma23; 67 bp, with the deletion of five bases in two strains: CQMa102 and ARSEF324, being a deletion of four base-pairs at positions 1132-1135 (ACCT bases) plus another deletion at

position 1145; 66 bp: with a deletion of six nucleotides in two strains: CG34 and CG489, consisting of a four base-pair deletion at positions 1132-1135 (ACCT) and a two base-pair deletion at positions 1179-1180. All remaining strains had 72 bp in intron III. In relation to the exons, a deletion of six bp (two codons) was found in the sample AJ1416695 (strain ARSEF2575). It was the only one, at the positions 1379-1384 (AACGGT bases). The result is an encoded sequence of 388 amino acids, while the other sequences have 390.

The transition/transversion ratios are $k1 = 2.468$ (purines) and $k2 = 1.546$ (pyrimidines), and the overall transition/transversion bias was 1.106. The G+C content of these sequences was about 54% (the median percentages of the nucleotide composition were T = 25%, C = 29%, A = 21% and G = 25%). The G+C content in the total coding region was 56%, and at second and third codon position was 52% and 58%, respectively. The mean percentages of the most frequent amino acids were 12% for Alanine and Glycine and 10.5% for Serine, the least frequent aminoacid being Tryptophan (0.6%).

The genetic diversity data and the neutrality tests are shown in Table 3. The nucleotide diversity among samples of the *pr1A* sequences ($\pi = 0.032 \pm 0.004$) was lower than IGS sequence data ($\pi = 0.090 \pm 0.007$), published in Yanaka-Schäfer *et al.* [18], revealing a high similarity among *M. anisopliae* varieties. Although we could not reject the null hypothesis of neutrality, all tests consistently resulted in negative values, which might be indicative of population growth or purifying selection acting on this gene as a whole.

Further data about the impact of selective forces on *pr1A* evolution is given by the analysis of codon-based models. Main results are shown in Table 4. Overall the best model is M3, for which two of the three classes resulted in ω values higher than

one, indicative that some codons might be experiencing positive selection. Moreover, for all comparisons between nested models (M2a vs. M1a; M3 vs. M0; and M8 vs. M7), the null model was rejected, supporting the inference of positive selection. The comparison of M1a against M2a, and of M7 against M8 tests explicitly for positive selection, while the comparison of M0 against M3 is suggested as a test for site rate variation [29]. In our case, however, M3 also points towards positive selection, given the ω values higher than one assigned to two codon classes.

Relatively few sites are indicative of selection, given that in all comparisons the frequency of sites for which $\omega > 1$ is much lower than the frequency of sites for which $\omega \leq 1$, suggesting that analyses of the full *pr1A* gene are less likely to present a signature for positive selection without taking into account more powerful codon models. The model showing more sites possibly under positive selection is M3. However, M3 may inflate the number of inferred positively selected sites if the codon classes in this model are insufficient to account for all heterogeneity presented in the dataset. For this reason, the list of sites under positive selection inferred with this model should be taken carefully. Nevertheless, five sites (126N, 173E, 190K, 226S, and 373T), show consistent results for positive selection, and they likely represent the best candidates for further studies about *pr1A* molecular evolution. Importantly, the last four of these sites lie in the gene region encoding the mature protease [30].

Phylogenetic Relationships

The phylogenetic relationships among all 56 strains and isolates of *M. anisopliae* and one strain of *Lecanicillium psalliotae*, based on *pr1A* sequences, are shown in Figure 1. Even though we only present the ML tree, similar topologies were recovered by all methods. The bootstrap values obtained from ML, MP, NJ and BI

are represented above the branches. Although some support values were low, clades were recovered by all methods. The relationships inferred among the clusters have also been observed in other studies using other molecular approaches and loci such as analysis of rDNA and mtDNA RFLPs [15], IGS and ITS sequence data [16], and IGS sequence data comparisons [18].

Clade A revealed a nucleotide diversity of 0.024 ± 0.004 and was composed of strains V275, Ma5, CG644, CG438, PPRC29 and IMBST9601, which were previously identified as *M. anisopliae* var. *anisopliae* with exception of strain CG644 which was identified as *M. anisopliae* var. *majus*. The clustering of strain CG644 among clade A is also supported by high bootstrap values within this clade. These results allow us to question the taxonomic classification of the strain CG644. Similar conclusions have been put forward by Yanaka-Schäffer *et al.* [18] based on rDNA IGS sequences. In general, relationships in Cluster A seem to be quite independent of either host or geography, since it contains Asian, European and African strains. This clade has been reported in other studies [14, 16, 18] with different genes.

Clade B had a nucleotide diversity of 0.011 ± 0.002 and clustered strains identified as *M. anisopliae* var. *anisopliae* and *M. anisopliae* var. *acridum*. According to Wang *et al.* [28] some strains may be classified as var. *acridum*, but exhibit closer similarity with var. *anisopliae*, possibly due to problems in the delimitation of var. *acridum*. The subgroup composed of strains CG191, V248 and V301, share a deletion at positions 1178 and 1179 (AC bases) and are all from soil. Again, for this cluster there was no obvious association with host specificity or geography, even though all strains in this cluster (except CG191, isolated from Brazil) came from regions of temperate climates.

Clade C is very similar to the group D found in the study of Yanaka-Schäfer *et al.* [18] with IGS sequence data, and contains all Brazilian strains except CG191. The nucleotide diversity found among strains of this clade was 0.013 ± 0.002 . This clade was subdivided into five subgroups: C1 and C2a-C2d. Subgroup C1 is further supported by the presence of a deletion of four nucleotides at positions 1132-1135. These subgroups, as well as subgroups C2a-C2c are formed by American and Brazilian strains, with the exception of the strain V285, from the Phillipines. It is noteworthy that despite a somewhat dense coverage, almost all Brazilian samples fall into one of these subgroups (especially C2b and C2c), suggesting, in accordance with Yanaka-Schäfer *et al.* [18], low genetic diversity of this fungus in Brazil. Moreover, our study suggests that strains CG423 (*M. anisopliae* var. *acridum*) and V285 (*Ma. anisopliae* var. *majus*) are in fact the *M. anisopliae* var. *anisopliae*, corroborating Yanaka-Schäfer *et al.* [18] conclusions. Subgroup C2d is the same group observed by Wang *et al.* [28], with the addition of strains CG38 and V218 from our study, and is apparently more associated with strains sampled from Asia.

Clades D and E are more likely outgroups to *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Clade D is represented by *M. anisopliae* var. *lepidiotum* strain CG648. This variety appears as sister-group of *M. anisopliae* var. *anisopliae* in our results, in agreement with the studies of Pantou *et al.* [16] and Driver *et al.* [31]. This strain has a distinctive eight base-pair deletion at positions 304-311. Finally, clade E was exclusively formed by strains of *M. anisopliae* var. *acridum* and show a nucleotide diversity of 0.005 ± 0.002 . The strains of the group E share a four base-pair deletion at positions 1132-1135, which also occurs in clade C1, plus a deletion at position 1145.

Overall, our results from *pr1A* gene sequence data suggest that some sites in this gene may be evolving under positive selection, even though further studies are necessary to elucidate the precise function of these residues and to test, *in vitro* or *in vivo*, the inference of positive selection. Additionally, there was no clear correlation between strains and host groups, but for some clades geography seems to be a better predictor of the relationships among strains. Concerning fungus taxonomy, some strains (CA22, IMI330189, Ma6, CG191, CG423 and V285) classified as variety *acridum* or variety *majus* show identical genetic profiles with the *M. anisopliae* var. *anisopliae*, suggesting they have been misidentified. Actually, our data suggest that *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *lepidiotum* and *M. anisopliae* var. *acridum* clustered in distinct clades for the *pr1A* gene. Finally, our results corroborate previous findings suggesting that the genetic diversity of this fungus in Brazil may be particularly low.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors thank Dr. Soraya C.M. Leal-Betolin and Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) for some DNA strains used in this work.

References

- [1] Freimoser FM, Hu G, St Leger RJ. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. *Microbiol.* 2005;151:361-371.
- [2] Gillespie AT, Claydon N. The use of entomopathogenic fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pestic Sci.* 1989;27:203-215.
- [3] St Leger RJ. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Can J Bot.* 1995;73:1119-1125.
- [4] St Leger RJ, Durrands PK, Charnley AK, Cooper, RM. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *J Invertebr Pathol.* 1988;52:285-293.
- [5] St Leger RJ, Frank DC, Roberts DW, Staples RC. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*. *Eur J Biochem.* 1992;204:991-1001.
- [6] St Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Roberts DW. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93:6349-6354.

- [7] St Leger RJ, Charnley AK, Cooper RM. Characterization of cuticle degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. Arch Biochem Biophys. 1987;253:221-232.
- [8] Goettel MS, St Leger RJ, Rizzo NW, Staples RC, Roberts DW. Ultrastructural localization of a cuticle degrading protease produced by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* during penetration of host cuticle. J Gen Microbiol. 1989;135:2223-2239.
- [9] St Leger RJ, Bidochka MJ, Roberts DW. Characterization of a novel carboxypeptidase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Arch Biochem Biophys. 1994;314:392-398.
- [10] Joshi L, St Leger RJ, Roberts DW. Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (pr1B) from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential display–RT–PCR. Gene. 1997;197:1-8.
- [11] Bidochka MJ, Melzer MJ. Genetic polymorphisms in three subtilisin-like protease isoforms (Pr1A, Pr1B, and Pr1C) from *Metarhizium* strains. Can J Microbiol. 2000;46:1138-1144.
- [12] Sosa-Gómez DR, Humber RA, Hodge KT, Binneck E, da Silva-Brandão KL. Variability of the mitochondrial SSU rDNA of *Nomuraea* species and other entomopathogenic fungi from hypocreales. Mycopathologia. 2009;167:145-54.

- [13] Leal SCM, Bertioli DJ, Butt TM, Carder JH, Burrows PR, Peberdy JF. Amplification and restriction endonuclease digestion of the Pr1 gene for the detection and characterization of *Metarhizium* strains. *Mycol Res.* 1997;101:257-265.
- [14] Hughes WOH, Thomsen L, Eilenberg J, Boomsma JJ. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting and nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *J Invertebr Pathol.* 2004;85:46-53.
- [15] Mavridou A, Typas MA. Intraspecific polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* revealed by analysis of rRNA gene complex and mtDNA RFLPs. *Mycol Res.* 1998;102:1233-1241.
- [16] Pantou MP, Mavridou A, Typas MA. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. *Fungal Genet Biol.* 2003;38:159-174.
- [17] Velásquez VB, Cárcamo MP, Meriño CR, Iglesias AF, Durán JF. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. *Gen Mol Biol.* 2007;30:89-99.

- [18] Yanaka-Schäfer FY, Dall'Onder LP, Panichi MC, Mendes RG, Fagundes NJR, Bandinelli JB, Bogo MB. Sequence Analysis of the rDNA Intergenic Spacer of *Metarhizium* strains isolated in Brazil. *Genet Mol Biol.* 2008;31:116-121.
- [19] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc Acids Res.* 1997;24:4876-4882.
- [20] Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics.* 2003;19:2496-7.
- [21] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. ARLEQUIN: A Software for Population Genetic Data Analysis, Version 2.0. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva, Switzerland. 2000.
- [22] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007;24:1596-1599.
- [23] Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 1998;14:817-8.
- [24] Swofford DL. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) 4.0 Beta, Florida State University. CD-ROM. 2002.

- [25] Ronquist F, Huelsenbeck JP. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003;19:1572-1574.
- [26] Yang Z. PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol Biol Evol*. 2007; 24:1586-1591.
- [27] Yang Z, Nielsen R, Goldman N, Pedersen AMK. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics*. 2000;155:431-449.
- [28] Wang C, Typas MA, Butt TM. Phylogenetic and exon-intron structure analysis of fungal subtilisins: support for a mixed model of intron evolution. *J Mol Evol*. 2005;60:238-46.
- [29] Wong WSW, Yang Z, Goldman N, Nielsen R. Accuracy and power of statistical methods for detecting adaptive evolution in protein coding sequences and for identifying positively selected sites. *Genetics*. 2004;168:1041-1051.
- [30] Zhang W, Yueqing C, Yuxian X. Cloning of the subtilisin Pr1A gene from a strain of locust specific fungus, *Metarhizium anisopliae*, and functional expression of the protein in *Pichia pastoris*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2008;24: 2481-2488.
- [31] Driver F, Milner RJ, Trueman WH. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol Res*. 2000;104:134-150.

Table 1: Background information on the examined strains of *Metarhizium anisopliae*.

GenBank number	Variety	Strain	Host	Origin
FJ659159	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG489	<i>Deois</i> sp. (Homoptera)	PR – Brazil
FJ659160	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG034	<i>Conotrachelus</i> sp. (Coleoptera)	AM – Brazil
FJ659161	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG032	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera)	BA – Brazil
FJ659162	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG341	Unknown	Unknown
FJ659163	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG041	<i>Nezara viridula</i> (Hemiptera)	DF – Brazil
FJ659164	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG419	Soil	SE – Brazil
FJ659165	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG043	<i>Zulia entreriana</i> (Homoptera)	MG – Brazil
FJ659166	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG040	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera)	DF – Brazil
FJ659167	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	V218	<i>Teleogryllus commodus</i> (Orthoptera)	Australia
FJ659198	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG038	Coleoptera	RO – Brazil
FJ619569	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG033	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera)	MT – Brazil
FJ659170	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	V248	Soil	Finland
FJ659171	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	V301	Soil	England
FJ659172	<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	CG191	Soil	RS – Brazil
FJ659173	<i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i>	CG438	Unknown	Philippines
FJ659174	<i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i>	CG644	<i>Oryctes</i> sp. (Coleoptera)	Philippines

FJ659175	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	M5	<i>Deois</i> sp. (Homoptera)	PE – Brazil
FJ659176	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG143	Homoptera	BA – Brazil
FJ659177	<i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i>	V285	Coleoptera	Philippines
FJ659178	<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	CG423	<i>Schistocerca pallens</i> (Orthoptera)	RN – Brazil
FJ659179	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG030	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera)	ES – Brazil
FJ659180	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG491	<i>Deois</i> sp. (Homoptera)	PR – Brazil
FJ659181	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG340	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera)	PE – Brazil
FJ659182	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG626	<i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera)	AL – Brazil
FJ659183	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG144	<i>Piezodorus guildinii</i> (Hemiptera)	GO – Brazil
FJ659184	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG578	<i>Zulia entreriana</i> (Homoptera)	TO – Brazil
FJ659185	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG037	Soil	TO – Brazil
FJ659186	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG039	Soil	MS – Brazil
FJ659187	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG858	<i>Mahanarva fimbriolata</i> (Homoptera)	SP – Brazil
FJ659188	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	CG031	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera)	RJ – Brazil
FJ659189	<i>M. anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i>	CG648	Coleoptera	Australia
AB073326 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	990	<i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera)	Japan
AB073327 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	5940	Unknown	Unknown
AB073344 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	511	<i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera)	Japan
AB073345 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	KM25	Unknown	Japan

AJ416688*	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	ARSEF820	Curculionidae (Coleoptera)	Unknown
AJ416691*	<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	ARSEF324 (FI-985)	<i>Austracris guttulosa</i> (Orthoptera)	Unknown
AJ416695*	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	ARSEF2575 (ME1)	<i>Curculio caryae</i> (Coleoptera)	Unknown
AY389119 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	V275	<i>Cyndia pomonella</i> (Lepidoptera)	Austria
AY389120 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	IMBST9601	<i>Melolontha melolontha</i> (Coleoptera)	Austria
AY389121 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	V208	Tettigonidae (Orthoptera)	Brazil
AY389122 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	Ma1	Ipidae (Coleoptera)	China
AY389123 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	Ma5	Tettigonidae (Orthoptera)	China
AY389124 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	Ma6	Unknown	China
AY389125 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	Ma9	Scarabeidae (Coleoptera)	China
AY389126 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	PPRC29	<i>Pachnoda interrupta</i> (Coleoptera)	Ethiopia
AY389127 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	V245	Soil	Finland
AY389128 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	0500B	Soil with <i>Tenebrio molitor</i>	Taiwan
AY389129 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	687	<i>Ixodes ricinus</i> (Acari)	United Kingdom
AY389130 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	IMI330189	Unknown	United Kingdom
AY389131 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	Ca22	Unknown	USA
AY389132 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	ESC1	Blattidae (Blattodea)	USA
AY389133 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	Ma23	<i>Conoderus</i> sp. (Coleoptera)	USA
AY389134 ^{t*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	ARSEF3540	Soil with <i>Galleria</i> sp. (Lepidoptera)	USA

AY389135 ^{†*}	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	F52	Aphididae (Homoptera)	USA
AY849935 [*]	<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	CQMa102	Unknown	Unknown
AY870806 [*]	<i>Lecanicillium psalliotae</i>	YMF1.00602	Unknown	Unknown

*Sequence retrieved from GenBank. [†]Partial sequence. Brazilian state codes: AL, Alagoas; AM, Amazonas; BA, Bahia; DF, Distrito Federal; ES, Espírito Santo; GO, Goiás; MG, Minas Gerais; MS, Mato Grosso do Sul; MT, Mato Grosso; PR, Paraná; PE, Pernambuco; RJ, Rio de Janeiro; RN, Rio Grande de Norte; RO, Roraima; RS, Rio Grande do Sul; SE, Sergipe; SP, São Paulo; TO, Tocantins.

Table 2: Data from sequences of the gene.

<i>Pr1A</i> sequence	Full length	Conserved sites	Variable characters	Parsimony informative sites
Gene	1370-1380 bp	1091	289	198
Exon I	282 bp	250	32	19
Exon II	186 bp	157	29	20
Exon III	513 bp	388	125	87
Exon IV	186 ^a /192 ^b bp	153	39	28
Exons total	1167 ^a /1173 ^b bp	948	225	154
Intron I	68 ^c /76 ^b bp	47	29	24
Intron II	59 bp	46	13	10
Intron III	66 ^d /67 ^e /70 ^f /72 ^b bp	50	22	10
Introns total	199 ^c /201 ^d /202 ^e /205 ^f /207 ^b bp	143	64	44
Amino acid	388 ^a /390 ^b aa	286	104	70

^aStrain ARSEF2575. ^bData referred to the other studied strains. ^cStrain CG648.

^dStrains CG34 and CG489. ^eStrains ARSEF324 and CQMa102. ^fStrains CG38, CG191, V218, V248, V301, CG30, CG31, CG32, CG33, CG37, CG39, CG40, CG41, CG43, CG143, CG144, CG340, CG341, CG419, CG423, CG438, CG491, CG578, CG626, CG644, CG648, CG858, V285 and M5.

Table 3: Genetic diversity and neutrality tests of *Metarhizium anisopliae* sample sequences.

<i>M. anisopliae</i>	N	H	Hd	π	Tajimas's D	Fu and Li's D	Fu and Li's F	Fu's FS
Gene	56	42	0.971 ± 0.0002	0.032 ± 0.004	-1.356*	-1.121*	-1.453*	-4.181*
Introns	56	29	0.927 ± 0.024	0.042 ± 0.006	-1.330*	-0.882*	-1.255*	-8.443*
Exons	56	39	0.929 ± 0.030	0.0298 ± 0.0038	-1.335*	-1.120*	-1.441*	-4.052*

N: Sample number. H: Number of haplotypes. Hd: Haplotype diversity. \pm : Standard deviation. π : Nucleotide diversity. *Not significant ($P > 0.10$).

Table 4: Molecular evolution of the *pr1A* gene.

Model	<i>lnL</i>	AIC	Estimates [‡]	LRT (<i>P</i> -value)	Positive selected sites*
M0	-3056.09	6174.18	p: 1.00 ω: 0.47	M3:M0 209.99	
M3**	-2951.09	5972.19	p: 0.84; 0.15; 0.01 ω: 0.09; 2.85; 19.72	(<0.001)	58T, 75H, 91E, 126N , 127R, 159E , 164F , 166R , 170S , 173E , 174T , 190K , 191S , 201Y, 226S , 286S, 294D , 295S , 296S , 298R , 305F, 307R , 317G , 324G , 326S , 351Q , 355T , 362K, 366T, 371A , 373T , 374G, 382Y
M1a	-2981.69	6027.38	p: 1.00 ω: ≤1.00	M2a: M1a 54.245	
M2a	-2954.57	5977.13	p: 0.94; 0.06 ω: ≤1.00; 6.87	(<0.001)	126N , 173E , 190K , 226S , 373T
M7	-2981.77	6027.54	p: 1.00 ω: ≤1.00	M8:M7 54.114	
M8	-2954.71	5977.42	p: 0.95; 0.05 ω: ≤1.00; 7.20	(<0.001)	126N , 173E , 190K , 226S , 373T

[‡]Estimated values of p: proportion of sites. ω: Selection coefficient. *Sites having evidence of positive selection with $P < 0,05$ ($P < 0,01$ for sites in bold). **Best model globally according to AIC.

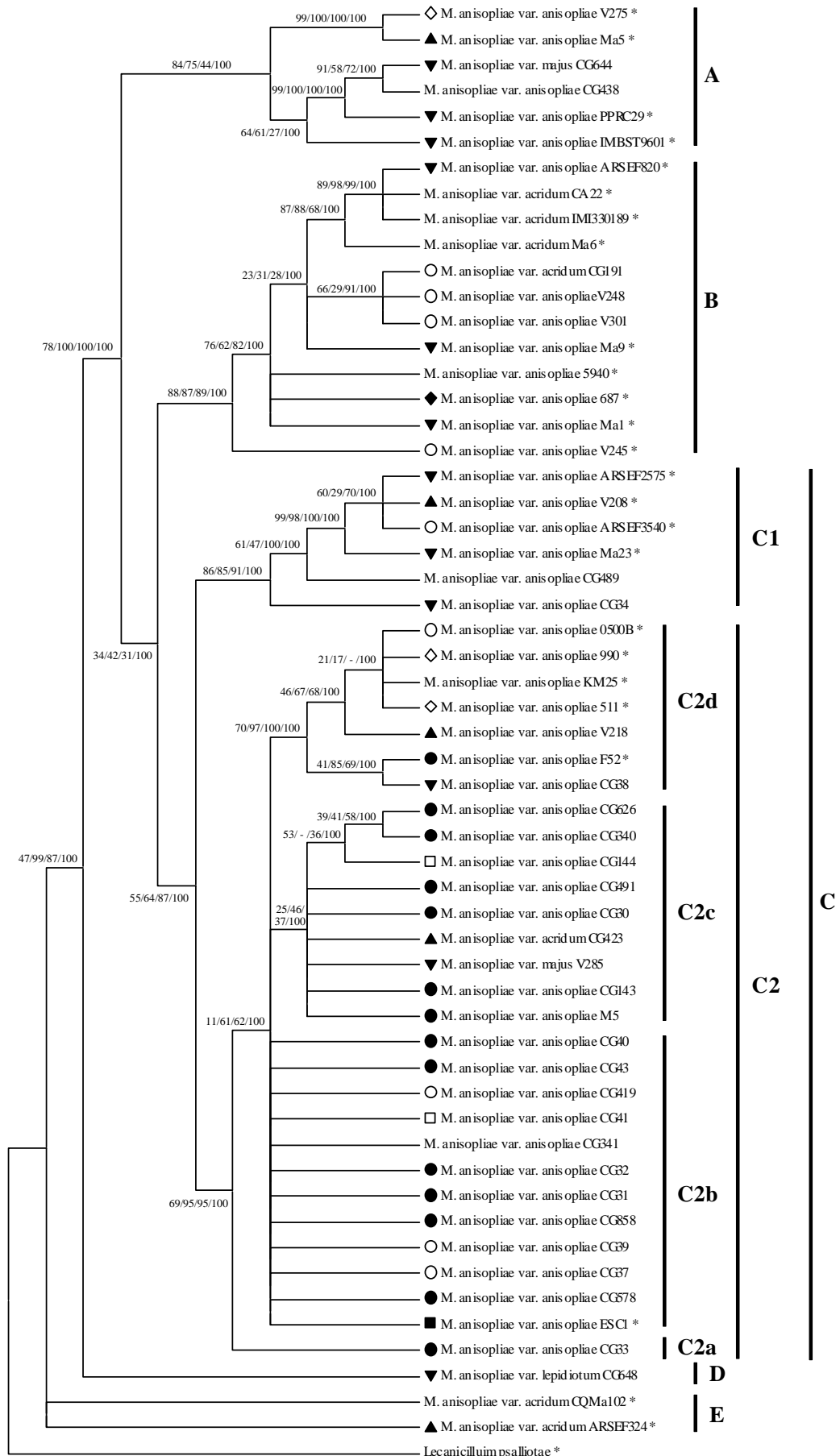


Fig. 1: Cladogram of the *pr1A* gene based on Maximum Likelihood analysis. The numbers represent the bootstrap values obtained with Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Neighbor-Joining and Bayesian Inference respectively. Symbols indicate the environment or host from which the isolate was obtained: ○ Soil, ● Homoptera, □ Hemiptera, ■ Blattodea, ▼ Coleoptera, ▲ Orthoptera, ◇ Lepidoptera, ◆ Acari. *Samples retrieved from GenBank.

3. CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a crescente preocupação com o meio ambiente, os riscos para a saúde humana, os casos de resistência provocados pelo uso indiscriminado de agrotóxicos na produção agrícola e animal, as práticas de controle biológico estão ganhando destaque. Com isso, a necessidade de melhoramento dos biopesticidas tornou-se um amplo campo de investigação a ser explorado.

As ferramentas moleculares têm permitido a expansão das pesquisas que visam controles microbianos mais eficientes. O melhoramento e a seleção de agentes mais hábeis no combate às pragas decorrem, por exemplo, da pesquisa acerca da variabilidade genética e das biomoléculas envolvidas nos mecanismos de virulência.

O presente estudo buscou avaliar o grau de diversidade genética existente entre as cepas do fungo *Metarhizium anisopliae*, pois ele pertence a um grupo promissor para o desenvolvimento de micopesticidas. Essa diversidade foi explorada a partir da análise das sequências do gene que codifica para a protease PR1A, uma vez que essa proteína é considerada o fator de virulência desse agente patogênico de inúmeros artrópodes.

O projeto desenvolvido adicionou ao banco de dados internacional GenBank 31 sequências completas do gene *pr1A* contribuindo, significativamente, com a comunidade científica, uma vez que até o presente momento apenas quatro sequências completas haviam sido depositadas. Foi possível constatar que o gene *pr1A* conseguiu distinguir diferentes variedades de *M. anisopliae*, permitindo a inferência da filogenia dessas a partir de um gene ligado à patogenicidade do

organismo. Por fim, ao investigarmos as forças seletivas que podem ter influenciado na evolução de *pr1A*, encontramos cinco sítios que apresentaram resultados consistentes para a seleção positiva, e provavelmente representam os melhores candidatos para estudos sobre a evolução molecular da protease PR1A.

REFERÊNCIAS

ALVES, SB. Fungos entomopatogênicos. In: _____. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-381.

BAGGA, S et al. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**. v. 324, n. 7, p. 159-169, Jan. 2004.

BIDOCHKA, MJ; KHACHATOURIANS, GG. Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 64, p. 26-32, 1994.

BIDOCHKA, MJ; MELZER, MJ. Genetic polymorphisms in three subtilisin-like protease isoforms (Pr1A, Pr1B, and Pr1C) from *Metarhizium* strains. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 1138-1144, 2000.

BITTENCOURT, VREL. Controle biológico de carrapatos. In: MELO, IS; AZEVEDO, JL. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. p. 145-172.

BRIDGE, PD et al. Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. **Journal of General Microbiology**, v.139, p. 1163-1169, 1993.

BROOKS A; WALL R. Horizontal transmission of fungal infection by *Metarhizium anisopliae* in parasitic Psoroptes mites (Acari: Psoroptidae). **Biological Control**, v. 34, p. 58-65, 2005.

CLARKSON, JM; CHARNLEY, AK. New insights into mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 197-203, 1996.

DAOUST, RA; ROBERTS, DW. 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, 1983a.

DAOUST, RA; ROBERTS, DW. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 41, p.143-150, 1983b.

DE NARDO, EAB; MORAES, GJ; DE SÁ, LAN. Regulamentação do uso de agentes microbianos de controle. In: Alves, SB. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 1119-1142.

DEBACH, P; ROSEN, D. The natural enemies. In: DeBach, P; Rosen, D. **Biological control by natural enemies**. New York: Cambridge university press, 1991. p. 35-87.

DENT, DR. Control measures. In: Dent, D. **Integrate pest management**. London: Chapman & Hall, 1995. p. 47-85.

DRIVER, F; MILNER, RJ; TRUEMAN, WH. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, 2000, v. 104, p. 134-150.

FEGAN, M et al. Random amplified polymorphic markers reveal high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, v. 13, p. 2075-2081, 1993.

FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Annual Review of Entomology**, v.23, p. 409-42, 1978.

FRAZZON, APG et al. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 94, p. 117-125, Dec, 2000.

FREIMOSER, FM et al. Expresses sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. **Microbiology**, v. 149, p. 239-247, 2003.

FUXA, JR. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. **Annual Review of Entomology**, v. 32, p. 225-251, 1987.

GARCIA, FRMG. Conceito de praga. In: _____. **Zoologia agrícola: manejo ecológico de pragas**. Porto Alegre: Rigel, 1999. p. 23-24.

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

GILLESPIE, JP et al. Fungi as elicitors of insect immune responses. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 44, n. 2, p. 49-68, Jun. 2000.

GIMÉNEZ-PECCI, MP et al. Characterization of mycoviruses and analyses of chitinase secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. **Current Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 334-339, 2002.

HUGHES, WHO et al. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting and nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p.46-53, 2004.

JABOR, IAS et al. Analysis of nutritional medium composition on development of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 25, n. 2, p. 497-501, 2003.

JOSHI, L; ST LEGER, RJ; ROBERTS, DW. Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (pr1B) from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential display-RT-PCR. **Gene**,v. 197, p. 1-8, 1997.

KANZOK, SM; JACOBS-LORENA, M. Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. **Trends in parasitology**, v. 22, p. 49-51, 2006.

KING, EG; HOPPER, KR; POWELL, JE. Analysis of systems for biological control of crop arthropod pests in U.S. by augmentation of predators and parasites. In: Hoy, MA; Herzog, DC. **Biological Control in Agricultural IPM Systems**. Orlando: Academic Press, 1985. p. 201-227.

LAING, JE; HAMAI, J. Biological Control of insect pests and weeds by imported parasites, predators, and pathogens. In: Huffaker, CB; Messenger PS. **Theory and Practice of Biological Control**. New York: Academic Press, 1976. p. 685-743.

LEAL, SCM et al. Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* by RAPD-PCR. **Mycological Research**, v. 98, p. 1077-1081, 1994.

LEAL, SCM et al. Amplification and restriction endonuclease digestion of the Pr1 gene for the detection and characterization of *Metarhizium strains*. **Mycological Research**, v. 101, p. 257-265, 1997.

LEEMON, DM; JONSSON, NN. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, n. 1, p. 40-49, 2008.

MAVRIDOU, A; TYPAS, MA. Intraspecific polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* revealed by analysis of rRNA gene complex and mtDNA RFLPs. **Mycological Research**, v. 102, p. 1233-1241, 1998.

MELO, IS; AZEVEDO, JL. Prefácio. In: _____. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. p. 7-8.

MILNER, RJ et al. Recent problems with the taxonomy of the genus *Metarhizium*, and a possible solution. In: SYMPOSIUM ON BACTERIAL CONTROL PROGRAMS IN EUROPE. **VIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control**. Montpellier, France, 1994. p. 252-253.

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.

MOSCARDI, F. Apresentação. In: Parra, JR et al. **Controle Biológico no Brasil**. Barueri: Manole. 2002. p. xiii-xiv.

OLIVEIRA, MAP. **Efeitos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Sobre parâmetros biológicos e fisiológicos de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae)**. Pernambuco: UFRP, 2006. 57 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2006.

ORR, DB; SUH, CPC. Parasitoids and predators. In: Rechcigl, JE; Rechcigl, NA. **Biological and biotechnological control of insect pests**. Boca Raton: Lewis, 1998. p. 2-33.

PANTOU, MP; MAVRIDOU, A; TYPAS, MA. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 3, p. 159-174, 2003.

PATERSON, IC, et al. Partial characterization of specific inducers of a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology**, v. 140, p. 3153-3159, 1994.

PEDRINI, N; CRESPO, R; JUÁREZ, P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 124-137, 2007.

RATH, AC et al. Virulence of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *Metarhizium flavoviridae* games and rozsygal and *Beauveria bassiana* (Ballsamo) Vuillemin to *Adoryphorus coulini* (Burmeister) (Coleoptera: Scarabaeidae). **Journal of the Australian Entomological Society**, v. 34, p. 181-186, 1995.

ROBERTS, DW; GUPTA, S; ST LEGER, RJ. Metabolite production by entomopathogenic fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 325-347, Abr. 1992.

ROY, HE. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. **Annual review of entomology**, v. 51, p. 331-357, 2006.

SCHOLTE, E-J et al. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. **Journal of Insect Science**, v. 4, p. 19-42, Jun. 2004.

SHAH, PA; PELL, JK. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 4, p. 13-23, 2003.

SMALL, CN; BIDOCHKA, MJ. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 109, n. 3, p. 307-313, Mar. 2005.

SOSA-GÓMEZ, DR; PEREIRA, RM; ALVES, SB. Impacto ambiental de entomopatógenos. In: Alves, SB. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 1075-1118.

ST LEGER, RJ; CHARNLEY, AK; COOPER, RM. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 47, p. 295-302, 1986.

ST LEGER, RJ; CHARNLEY, AK; COOPER, RM. Characterization of cuticle degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 253, p. 221-232, 1987.

ST LEGER, RJ et al. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, p. 285-293, 1988.

ST LEGER, R.J et al. 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, RJ et al. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*. **European Journal of Biochemistry**, v. 204, p. 991-1001, 1992.

ST LEGER, RJ; BIDOCHKA, MJ; ROBERTS, DW. Characterization of a novel carboxypeptidase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 314, p. 392-398, 1994a.

ST LEGER, RJ; BIDOCHKA, MJ; ROBERTS, DW. Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 protease and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 313, p. 1-7, 1994b.

ST LEGER, RJ. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 1119-1125, 1995.

ST LEGER, RJ et al. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 6349-6354, 1996.

THOMAS, M; READ, A. Can fungal biopesticides control malaria? **Nature Reviews. Microbiology**, v. 5, p. 377-383, May. 2007.

TIAGO, PV; FUNGARO, MHP; FURLANETO, MC. Cuticle-degrading proteases from the entomopathogen *Metarhizium flavoviride* and their distribution in secreted and intracellular fraction. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 91-94, 2002.

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

VAN DRIESCHE, RG; JR BELLOWS, TS. Pest origins, pesticides, and the history of biological control. In: _____. **Biological Control**. New York: Chapman & Hall, 1996a. p. 3-20.

VAN DRIESCHE, RG; JR BELLOWS, TS. Kinds of biological control targets, agents and methods. In: _____. **Biological Control**. New York: Chapman & Hall, 1996b. p. 21-33.

VELÁSQUEZ, VB et al. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 89-99, 2007.

WAAGE, JK. Biodiversity as a resource for biological control. In: Hawksworth, DL. **The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture**. London: Cab international, 1994. p. 149-163.

YANAKA-SCHÄFER, FY et al. Sequence Analysis of the rDNA Intergenic Spacer of *Metarhizium* strains isolated in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 116-121, 2008.

ANEXO – Comprovante de submissão de artigo científico

De: em.myco.0.1a75e8.d4c26978@editorialmanager.com

[mailto:em.myco.0.1a75e8.d4c26978@editorialmanager.com] Em nome de Mycopathologia

Enviada em: Monday, April 19, 2010 4:30 PM

Para: Mauricio Reis Bogo

Assunto: Submission Confirmation

Dear Dr Bogo,

Thank you for submitting your manuscript, "Genetic diversity and evolutionary relationships among strains of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* inferred from DNA sequences of the subtilisin-like pr1A gene", to Mycopathologia

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site: <http://myco.edmgr.com/>

If your manuscript is accepted for publication in Mycopathologia, you may elect to submit it to the Open Choice program. For information about the Open Choice program, please access the following URL: <http://www.springer.com/openchoice>

With kind regards,

Editorial Office Mycopathologia

Springer

P.O. Box 990

3300 AZ DORDRECHT

The Netherlands