

# Biotecnologia aplicada ao CONTROLE BIOLÓGICO

## O entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*

Grupo de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul da UFRGS

**Melissa Franceschini**

Doutoranda em Biologia Celular e Molecular  
UFRGS  
melifran@dna.cbiot.ufrgs.br

**Ana Paula Guimarães**

Graduanda em Ciências Biológicas  
UFRGS  
apgm@dna.cbiot.ufrgs.br

**Melissa Camassola**

Graduanda em Ciências Biológicas  
UFRGS  
melissa@dna.cbiot.ufrgs.br

**Ana Paula Frazzon**

Doutoranda em Biologia Celular e Molecular  
UFRGS  
apaulaf@dna.cbiot.ufrgs.br

**César Milton Baratto**

Doutorando em Biologia Celular e Molecular  
UFRGS  
baratto@dna.cbiot.ufrgs.br

**Viviane Kogler**

Graduanda em Ciências Biológicas  
UFRGS  
vkogler@dna.cbiot.ufrgs.br

**Márcia Vanusa da Silva**

Doutoranda em Biologia Celular e Molecular  
UFRGS  
marcia@dna.cbiot.ufrgs.br

**Valéria Dutra**

Doutoranda em Biologia Celular e Molecular  
UFRGS  
valdutra@dna.cbiot.ufrgs.br

**Luciano Nakazoto**

Doutorando em Biologia Celular e Molecular  
UFRGS  
lucnak@dna.cbiot.ufrgs.br

**Luíza Castro**

Mestranda em Biologia Celular e Molecular  
UFRGS  
luiza@dna.cbiot.ufrgs.br

**Lucélia Santi**

Graduanda em Ciências Biológicas  
UFRGS  
lucelia@dna.cbiot.ufrgs.br

**Marilene Henning Vainstein**

Ph.D., Professora Adjunta do Depto. de  
Microbiologia e Pesquisadora do Centro de  
Biotecnologia  
CBiot-UFRGS  
mbv@dna.cbiot.ufrgs.br

**Augusto Schrank (Chefe do Grupo)**

Ph.D., Professor Adjunto do Depto. Biologia  
Molecular e Biotecnologia e Pesquisador do Centro  
de Biotecnologia  
CBiot-UFRGS  
augusto@dna.cbiot.ufrgs.br

Fotos cedidas pelos autores

## Controle Biológico

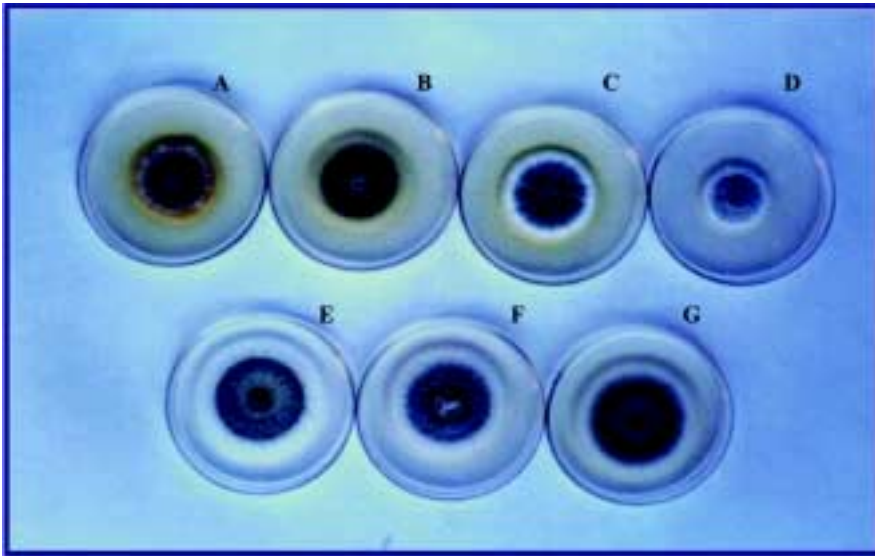
Apesar de os defensivos agrícolas terem uma alta e rápida eficiência, são necessárias aplicações repetidas desses produtos, o que representa grandes quantidades lançadas no ambiente e um alto custo. Esses produtos químicos propiciam uma alta produtividade, mas têm efeitos negativos sobre o solo, o clima, a vegetação, as águas, os animais e o homem, e provocam a seleção de mutantes resistentes, resultantes da forte pressão seletiva. Além disso, seu tempo de degradação no ambiente é da ordem de décadas, o que provoca uma concentração elevada dessas substâncias na cadeia alimentar. Nesse contexto, o controle biológico é uma alternativa viável para o combate de pragas e patógenos e vantajosa em relação ao controle químico, especialmente quanto ao impacto ambiental, ao custo, à especificidade e ao desenvolvimento de resistência.

Entre os microrganismos patogênicos com aplicação potencial em controle biológico destacam-se os fungos filamentosos. Quando comparados a outros sistemas utilizados em controle biológico, como bactérias produtoras de toxinas, protozoários e vírus, os fungos apresentam como vantagem um mecanismo especializado de infecção, que ocorre pela sua penetração ativa nos hospedeiros, não dependendo, assim, da sua ingestão para que se inicie o processo de infecção.

O maior entrave para a utilização de fungos filamentosos no controle biológico é o grande lapso de tempo entre a sua aplicação e a morte dos hospedeiros, se comparados com os pesticidas químicos. Durante esse período de tempo, as pragas agrícolas podem causar sérias perdas na produtividade da cultura-alvo. Um dos objetivos comuns no estudo desses microrganismos em controle biológico visa a aumentar a velocidade de morte dos hospedeiros para melhorar a eficiência do biocontrolador. Têm sido feitos esforços no intuito de melhorar a produção, a estabilidade e a aplicação de inóculos desses fungos. O entendimento das características básicas da relação entre o fungo e o inseto hospedeiro tem permitido conhecer a natureza da patogenicidade, possibilitando a introdução de genes específicos, altamente expressos em condições de infectividade, com vistas a acelerar o processo de infecção e de diminuir, assim, o tempo entre o início da infecção e a morte do hospedeiro (ST. LEGER *et al.*, 1996).

## O Entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*

O fungo *Metarhizium anisopliae* é um Deuteromiceto amplamente distribuído na natureza e pode ser encontrado facilmente nos solos, onde sobrevive por longos períodos (ALVES, 1998). *M. anisopliae* infecta mais de 300 espécies de insetos das diferentes ordens, incluindo



**Figura 1:** Linhagens brasileiras do fungo *Metarhizium anisopliae*. A) RJc (*Deois flavopicta* – Rio de Janeiro); B) RJd (*Deois flavopicta* – Rio de Janeiro); C) M5 (*Deois* sp. - Pernambuco); D) AL (*Mahanarva postigata* - Alagoas); E) MT (*Deois* sp. – Mato Grosso); F) E9 (*Deois flavopicta* – Espírito Santo); e, G) E6S1 (*Deois flavopicta* – Espírito Santo). Ambas crescidas em Meio Cove sólido. Entre parênteses está descrito o hospedeiro em que a linhagem foi isolada e o Estado de origem

pragas importantes (ALVES, 1998). Alguns de seus hospedeiros são pragas na agricultura, como a cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*), a cigarrinha-das-pastagens (*Deois* sp e *Zulia* sp), a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*), a formiga saúva (*Atta sexdens*), os térmitas subterrâneos (Isoptera : Rhinotermitidae). Sua patogenicidade tem sido ainda demonstrada para carrapatos de diferentes gêneros e espécies (KAAYA *et al.*, 1996; ZHIOUA *et al.*, 1997; FRAZZON

*et al.*, 2000). Vários fatores têm sido apontados como possíveis determinantes de patogenicidade, entre os quais, a produção de toxinas e a produção e secreção de enzimas hidrolíticas, como quitinases, proteases e lipases (CLARKSON & CHARNLEY, 1996). Alguns autores sugerem ainda que a expressão diferenciada das superóxido dismutases (SODs), enzimas que atuam como um sistema de defesa contra radicais livres de oxigênio (SCHRANK *et al.*, 1993), e a presença

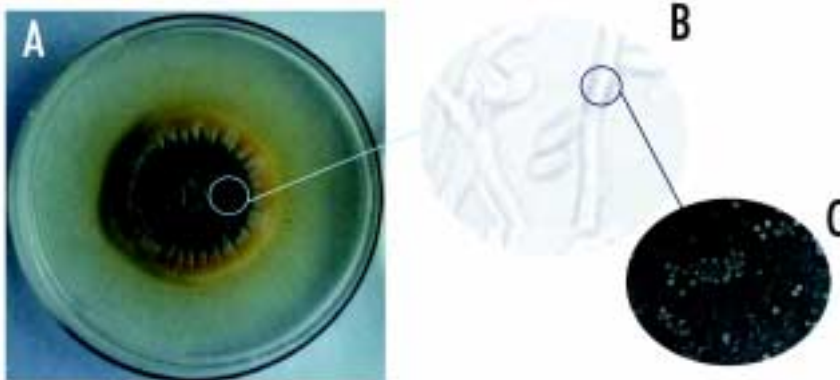
de micovírus, com genoma de dsRNA (BOGO *et al.*, 1996b), influenciam a patogenicidade de *M. anisopliae*. São necessárias, entretanto, confirmações experimentais para essas observações.

Por ser considerado um dos agentes mais promissores no controle de pragas, *M. anisopliae* tem sido um dos modelos mais estudados em relação ao isolamento e à seleção de linhagens do ambiente, ao isolamento de mutantes com características importantes para o controle biológico, ao estudo dos mecanismos de infecção, ao desenvolvimento de metodologias de biologia molecular e a estudos alternativos para produção, manutenção da viabilidade e formulação de biopesticidas. A Figura 1 mostra algumas linhagens brasileiras do fungo *M. anisopliae*, e suas origens. A Figura 2 mostra detalhes morfológicos do fungo *M. anisopliae*. O nosso grupo de pesquisa tem estudado alguns aspectos básicos da biologia molecular de *M. anisopliae*, em especial o desenvolvimento de sistemas de transformação para permitir a re-introdução de genes manipulados *in vitro* (BOGO *et al.*, 1996a), o estudo da regulação de quitinases (PINTO *et al.*, 1996) e a clonagem e a caracterização do gene *chit1*, que codifica uma dessas quitinases (BOGO *et al.*, 1998). O grupo dedica-se, ainda, ao estudo da aplicação de *M. anisopliae* como biocontrolador do carrapato *Boophilus microplus* (FRAZZON *et al.*, 2000).

### O processo de infecção

O processo de infecção de *M. anisopliae* em seus hospedeiros ocorre em fases sucessivas de germinação, diferenciação, penetração, colonização, reprodução e disseminação (SCHRANK *et al.*, 1993; ALVES, 1998).

O processo de infecção é iniciado pela germinação dos esporos sobre a cutícula do hospedeiro. Na superfície do esporo, ainda não germinado, foi detectada a presença de enzimas (proteases, esterases e N-acetilglicosidasas) que têm efeito na adesão, na aquisição preliminar de nutrientes e que também causam modificações superficiais nas camadas mais externas da cutícula do hospedeiro (ST. LEGER *et al.*, 1990). O esporo germina e o tubo germinativo se diferencia por

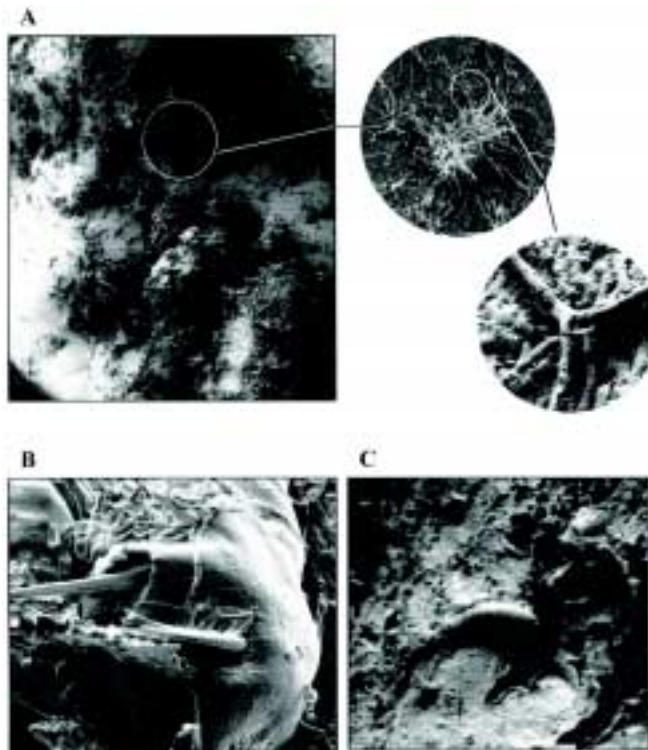


**Figura 2:** Detalhes morfológicos de *Metarhizium anisopliae*. A) O fungo *M. anisopliae* apresenta micélio hialino e septado e esporos de coloração verde. B) Os esporos são cilíndricos. C) Algumas linhagens de *M. anisopliae* são infectadas por micovírus

dilatação da extremidade das hifas para a formação do apressório, uma estrutura especializada de penetração, estimulada pelo contato físico com a cutícula do hospedeiro (ST. LEGER *et al.*, 1991b). Esse estímulo também é sensível a alterações da superfície, indicando um possível mecanismo pelo qual o patógeno reconhece seu hospedeiro (ST. LEGER *et al.*, 1990).

Após a formação do apressório, ocorre o desenvolvimento de estruturas denominadas grampos de penetração, que são caracterizadas por uma alteração na parede celular da parte do apressório que está em contato com o hospedeiro, sendo mais fina e saliente (ST. LEGER *et al.*, 1991b). Evidências obtidas por microscopia eletrônica e histoquímica sugerem que a etapa de penetração ocorre por uma combinação de degradação enzimática e pressão mecânica (ST. LEGER *et al.*, 1988a). Nesse processo são produzidas algumas enzimas como lipases, quitinases e proteases (ST. LEGER *et al.*, 1986a, b, 1988b, 1991a; PINTO *et al.*, 1996; ALVES, 1998).

Após o processo de penetração, o fungo inicia a etapa de colonização do hospedeiro. As hifas que atravessam a cutícula do hospedeiro sofrem um engrossamento e se ramificam inicialmente no tegumento e, posteriormente, na cavidade geral do corpo, liberando toxinas e ocasionando a morte do hospedeiro devido à produção de metabólitos secundários denominados destruxinas, que afetam os canais de transporte de íons, envolvidos na resposta muscular e a integridade da membrana celular. O hospedeiro exhibe



**Figura 3:** Cutícula de teleóquina de *Boophilus microplus* infectada com esporos de *Metarhizium anisopliae*.  $10^8$  esporos do fungo foram incubados com cutícula de carrapato a 28 °C por 24 horas. Fotos de microscopia eletrônica de varredura. A) Germinação de esporos com aumento de 100 vezes; primeiro detalhe, aumento de 605 vezes; segundo detalhe, aumento de 4.900 vezes. B) Preferência dos esporos em germinar próximo a locais porosos e articulados da cutícula; no caso, pêlos; aumento de 2.000 vezes. C) Ponta de hifa do acaricida que atravessou a cutícula do carrapato. Aumento de 1.500 vezes

vários sintomas incluindo inquietação, perda de coordenação e parada da ingestão de alimento (LAVERLAM, 1999).

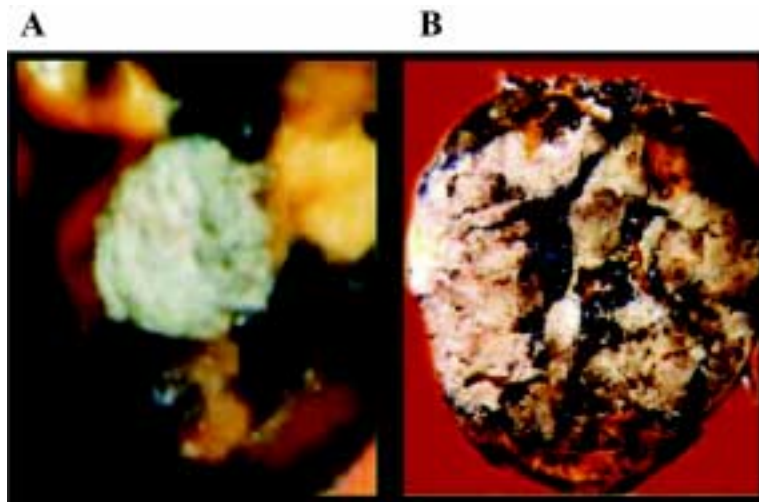
Após a morte do hospedeiro, que ocorre de 4 a 5 dias após a infecção, as hifas se desenvolvem invadindo os diversos órgãos internos. Após o esgotamento dos nutrientes, as hifas se estendem para fora do corpo do hospedeiro, formando um micélio, que

cobre a superfície do tegumento, resultando na mumificação. Sob condições ambientais apropriadas, ocorre a produção de esporos, que poderão ser disseminados pelo vento para infectar outros indivíduos (LAVERLAM, 1999). As Figuras 3 e 4 mostram os estágios inicial e final do processo de infecção do fungo *M. anisopliae* em teleóquina do carrapato *B. microplus*.

### As proteases

Foi demonstrado que entre os genes expressados especificamente durante o processo de infecção de *M. anisopliae* no hospedeiro está o gene *pr1A*, originalmente *pr1*, que codifica uma protease do tipo subtilisina (PR1A), que tem uma participação marcante na penetração da cutícula do hospedeiro pelo fungo.

ST. LEGER *et al.* (1992) demonstrou que a protease PR1A é mais efetiva na degradação estrutural das proteínas ligadas à cutícula por ligação covalente, devido aos resíduos de carga



**Figura 4:** Teleóquinas do carrapato *B. microplus* infectadas com o fungo acaricida *M. anisopliae*. A) Detalhe de hifas do fungo *M. anisopliae* se estendendo para fora do corpo de teleóquina de *B. microplus* completamente infectada. B) Detalhe de uma teleóquina de *B. microplus* completamente infectada pelo fungo *M. anisopliae*. A cutícula da teleóquina foi parcialmente retirada

**Tabela 1** Quitinasas e genes de quitinasas isolados de *Metarhizium anisopliae*.

Quitinasas	Indução	Ação	Linhagem
<b>CHIT30</b>	Quitina	Exo / Endoquitinase	E6
<b>CHIT33</b>	Quitina	Endoquitinase	ME1
<b>CHIT43,5</b>	Cutícula	Endoquitinase	ME1
<b>CHIT45</b>	Cutícula	Endoquitinase	ME1
<b>CHIT60</b>	Quitina	Exo / Endoquitinase	ATCC 20500
<b>CHIT110</b>	Inibida por NAG	Quitobiase	ME1

Genes	Cópias	Nº de Aminoácidos	Linhagem
<b>chit1 (42 kDa)</b>	Única	423	E6
<b>chi11 (58 kDa)</b>	Única	523	ATCC 20500
<b>chi2 (43 kDa)</b>	-	414	ME1
<b>chi3 (34 kDa)</b>	-	317	ME1

positivas que se formam na superfície da molécula de PR1A em pH neutro ou alcalino. A Figura 5 mostra a capacidade do fungo *M. anisopliae* de alcalinizar o meio contendo substrato para proteases, confirmando pH ótimo para proteases sendo igual a 8 (ST. LEGER *et al.*, 1999).

O gene *pr1A* é altamente regulado e somente expressado durante a fase de penetração (ST. LEGER *et al.*, 1992). Esse gene está sob controle duplo de expressão: i) pelo mecanismo de repressão catabólica regulado pelos níveis de carbono e nitrogênio (ST. LEGER *et al.*, 1988b) e, ii) pela indução específica promovida pelas proteínas da cutícula (PATERSON *et al.*, 1994). A protease PR1A hidrolisa de 25% a 30% das proteínas da cutícula dos hospedeiros liberando peptídeos que servirão de nutrientes para o fungo e substratos para a elaboração de outros determinantes da patogenicidade (ST.

LEGER *et al.*, 1986a).

PR1A é a única protease de cutícula produzida em quantidade elevada em vários isolados patogênicos de *M. anisopliae*. Foi observado por ST. LEGER *et al.* (1987) um aumento da protease PR1A durante a penetração do fungo *M. anisopliae* na cutícula de larvas de *Manduca sexta*.

O gene *pr1A* foi clonado sob o controle de um promotor constitutivo e os transformantes, superexpressando PR1A, mostraram-se 25% mais eficientes na infecção de insetos (ST. LEGER *et al.*, 1996). Nesse trabalho, foi definitivamente demonstrado o potencial da manipulação genética para ser efetivamente utilizada na construção de linhagens mais eficientes para o controle biológico a partir do conhecimento dos fenômenos básicos da etapa de penetração. A Figura 6 mostra a superprodução de PR1A de uma linhagem transformada de *M. aniso-*

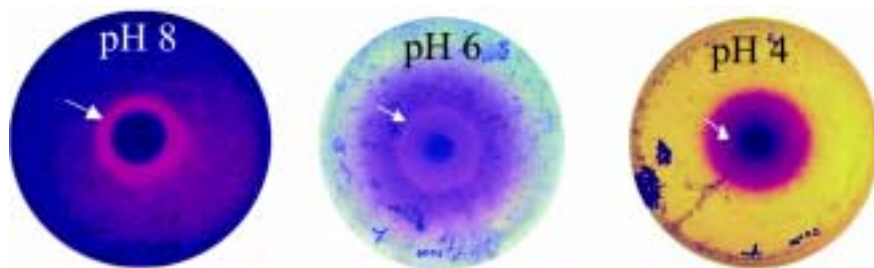
*pliae* em comparação com a linhagem selvagem.

JOSHI *et al.* (1997), investigando genes envolvidos no processo de infecção de fungos entomopatogênicos, descreveram uma nova protease também do tipo subtilisina (PR1B) a partir de genes especificamente expressados por *M. anisopliae* durante seu desenvolvimento na cutícula de baratas (*Blattella germanica*). A dedução da seqüência de aminoácidos mostrou 54% de similaridade com a subtilisina PR1A. No entanto, a PR1B possui várias substituições na seqüência altamente conservada compreendendo o sítio ativo das subtilisinas. Essas substituições são cataliticamente críticas podendo reduzir a eficiência catalítica da protease. A função da protease PR1B na infecção de hospedeiros ainda não foi determinada.

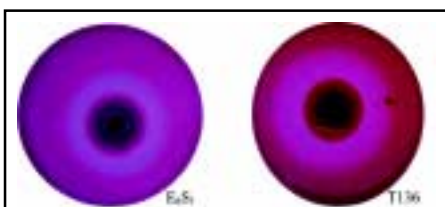
Atualmente se encontram disponíveis no GENBANK seqüências de mais oito genes de proteases da família das subtilisinas PR1 denominados de *pr1D* até *pr1K*, que foram isolados de *M. anisopliae* pelo grupo norte-americano liderado por St. Leger. Sua função ainda não foi estudada.

### Quitina e Quitinasas

A quitina, depois da celulose, é um dos polímeros mais abundantes na natureza (FLACH *et al.*, 1992). É encontrada como constituinte do exoesqueleto de insetos e de crustáceos, em conchas de moluscos e é o maior componente da parede celular de fungos (CABIB, 1987). As quitinasas são enzimas hidrolíticas com a propriedade de hidrolisar a quitina em oligôme-



**Figura 5:** Alcalinização de meio contendo substrato para proteases pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. O meio utilizado apresenta como fonte de carbono apenas azocaseína. Para demonstrar em que faixa de pH o fungo cresce quando proteases são requeridas o meio foi complementado com o corante Vermelho de Bromocresol. Esse corante apresenta coloração variando do amarelo até o violeta quando o pH varia do ácido até o alcalino. O pH ótimo para proteases secretadas por *M. anisopliae* fica na faixa alcalina igual a 8. As setas indicam halo de degradação de azocaseína

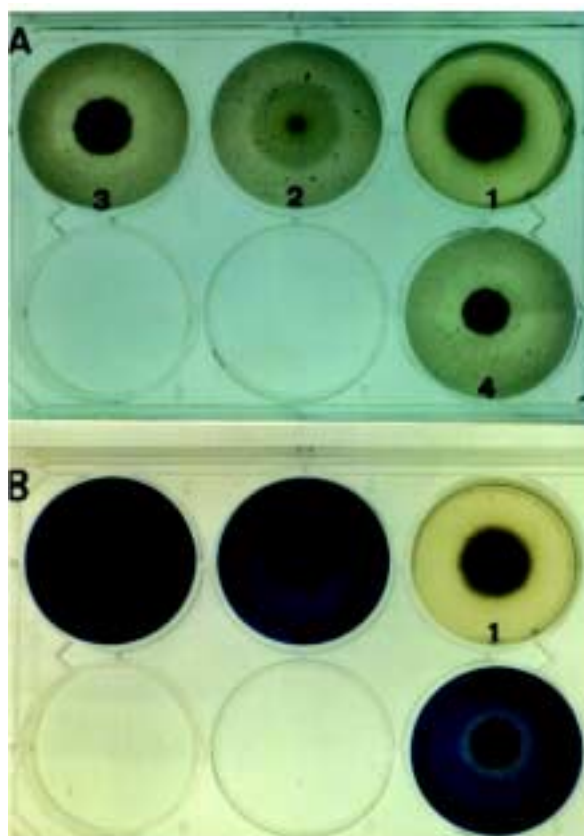


**Figura 6:** Halo de degradação em meio com substrato para proteases de linhagens de *Metarbizium anisopliae*. A faixa mais clara em cada placa demonstra a degradação de azocaseína em meio que contém apenas azocaseína como fonte de carbono, em pH ótimo para proteases igual a 8. A linhagem E<sub>6</sub>S<sub>1</sub> é selvagem de *M. anisopliae*, enquanto a linhagem T136 é uma linhagem E<sub>6</sub>S<sub>1</sub> selvagens que foi transformada para que superexpressasse a protease PR1A. A linhagem apresentou halo de degradação 4 vezes maior que a linhagem selvagem. Esses dados são estatisticamente significantes (teste de Tukey para  $\alpha = 0,05$ )

ros de N-acetilglicosamina (NAG), que assim podem ser absorvidos e metabolizados (GOODAY, 1990; GOODAY *et al.*, 1992). Muitos organismos produzem quitinases, entre eles, bactérias, fungos, crustáceos, insetos e plantas superiores.

Em fungos, cuja parede celular é composta basicamente por polissacarídeos como quitina e glicanas (GOODAY *et al.*, 1992), as enzimas quitinolíticas estão basicamente envolvidas nos processos de crescimento e diferenciação. Os fungos filamentosos também possuem quitinases que atuam em diferentes processos fisiológicos, como dispersão de esporos, autólise e nutrição (DE LA CRUZ *et al.*, 1992; STIRLING *et al.* 1979).

As enzimas quitinolíticas provavelmente desempenham um papel importante na penetração de fungos filamentosos através da cutícula dos hospedeiros. Essas enzimas se encontram sob forte regulação no fungo *M. anisopliae*, onde o sistema quitinolítico é regulado por um mecanismo de indução-repressão, tendo a quitina como



**Figura 7:** Análise da produção de enzimas quitinolíticas por linhagens de *Metarbizium anisopliae*. As linhagens foram crescidas em meio com substrato para quitinases ligado (B) ou não (A) ao corante Azul de Remazol. A faixa mais clara nas placas representa a degradação do substrato pelo fungo. 1) E9; 2) RJc; 3) MT; e, 4) E6S1. A linhagem E6S1 demonstrou ser a mais promissora para estudos de produção de quitinases

indutor tanto da síntese como da secreção de quitinases, e a glicose como repressor da sua síntese. A concentração do monômero NAG também regula a síntese e a secreção das quitinases, sendo que, em baixas concentrações, age como indutor, enquanto em altas concentrações, apresenta papel de repressor (BARRETO, 1996; MOREIRA, 1998; Figura 7).

Foi demonstrado em géis de atividade contendo glicol-quitina como substrato que uma linhagem de *M. anisopliae* altamente secretora produzia uma mistura complexa de enzimas quitinolíticas quando o fungo era cultivado em condições de indução. A presença de, aproximadamente, 10 isoenzimas foi sugerida (ST. LEGER *et al.*, 1993). Inibidores catabólitos reduzem a produção de todas as isoenzi-

mas com apenas uma exceção. Essa atividade remanescente foi sugerido ser controlada separadamente das demais (ST. LEGER *et al.*, 1993). Estudos demonstraram mais de um gene codificando quitinase em *M. anisopliae* (Tabela 1).

Até o momento, não foi confirmada a participação das quitinases na entomopatogenicidade de *M. anisopliae*. Apesar dos estudos bioquímicos e do conhecimento acumulado, pouco se sabe quanto aos tipos, a regulação, a localização, as seqüências envolvidas em sua glicosilação, a secreção e a participação das quitinases nos processos fisiológicos.

#### Agradecimentos

Agradecemos ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima, do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da USP, pelo auxílio e colaboração na obtenção das fotos por MET.

Órgãos financiadores: CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

#### Referências Bibliográficas

- ALVES, S.B. (1998) Fungos entomopatogênicos em controle microbiano de insetos. Editora Manole Ltda, Fealq, Piracicaba – SP, p.1163.
- BARRETO, C.C. (1996) Quitinases do fungo entomopatogênico *Metarbizium anisopliae*. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular/UFRGS, RS.
- BOGO, M. R., VAINSTEIN, M. H., ARA-GÃO, F. J. L., RECH, E., SCHRANK, A. (1996a) High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarbizium anisopliae*. **FEMS Microbiol. Let.** 142:123-127.

- BOGO, M.R., QUEIROZ, M.V., SILVA, D.M., GIMÉNEZ, M.P., AZEVEDO, J.L., SCHRANK, A. (1996b) Double-stranded RNA and isometric virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycol. Res.** 100(12):1468-72.
- BOGO, M.R., ROTA, C.A., PINTO, Jr.H., CAMPOS, M., CORREA, C.T., VAINSTEIN, M.H., SCHRANK, A. (1998) A chitinase encoding gene (*Chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full length cDNA. **Cur. Microbiol.** 37:1-6.
- CABIB, E. (1987) The synthesis and degradation of chitin. **Adv. Enzymol.** 59:59-101.
- CLARKSON, J.M. & CHARNLEY, A.K. (1996) New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends Microbiol.** 4(5):197-203, 1996.
- DE LA CRUZ, J., HIDALGO-GALLEGO, A., M.LORA, J., BENITEZ, T., PINTOR-TORO, J.A., LLOBEL, A. (1992) Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma barzianum*. **Europ. J. Biochem.** 206:859-867.
- FLACH, J., PILET, P.E., JOLLES, P. (1992) What's new in chitinase research? **Exper.** 48:90-96.
- FRAZZON, A.P.G., DA SILVA VAZ Jr., I., MASUDA, A., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2000) *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vet. Parasitol.** 93:117-25.
- GENBANK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- GOODAY, G. (1990) The ecology of chitin degradation. **Microb. Ecol.** 10:387-431.
- GOODAY, G.H., ZHU, W.Y., DONNELL, R.W. (1992) What are the roles of chitinases in the growing fungus? **Fems: Microbiol. Let.** 100:387-392.
- JOSHI, L., ST. LEGER, R.J., ROBERTS, D.W. (1997) Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (Pr1B) from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential display-RT-PCR. **Gene** 197:1-8.
- KAAYA, G.P., MWANGI, E.N. and OUNA, E.A. (1996) Prospects for biological control of livestock tick *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous for *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* J. **Invert. Pathol** 67:15-20.
- LAVERLAM S.A. Cali – Colombia. Fevereiro, 1999. [http://cali.cetcol.net.co / ~ laverlam / e \\_ index.html](http://cali.cetcol.net.co/~laverlam/e_index.html)
- MOREIRA, C. A. (1998) **Regulação da secreção de proteínas do entomopatogênico *Metarhizium anisopliae***. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasília, D.F.
- PATERSON, I.C., CHARNLEY, K., COOPER, R.M., CLARKSON, J.M. (1994) Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiol.** 140:185-189.0
- PINTO, A.S., BARRETO, C.C., SCHRANK, A., ULHOA, C.J.U., VAINSTEIN, M.H. (1996) Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Can. J. Microbiol.** 43:322-327.
- SCHRANK, A.; BASSANESI, M. C.; PINTO JR, H.; COSTA, S. V.; BOGO, M. R.; SILVA, M. S. N. (1993) Superoxide dismutases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Ciência e Cultura** 45:200-205.
- ST. LEGER, R.J., COOPER, R.M., CHARNLEY, A.K. (1986a) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. **J. Gen. Microbiol.** 132:1509-17.
- ST. LEGER, R.J., CHARNLEY, A.K., COOPER, R.M. (1986b) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. **J. Invert. Pathol.** 48:85-95.
- ST. LEGER, R.J., CHARNLEY, A.K., COOPER, R.M. (1987) Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Arch. Biochem. Biophys.** 253:221-232.
- ST. LEGER, R. J.; DURRANDS, P. K.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. (1988a) Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. **J. Invert. Pathol.** 52:285-293
- ST. LEGER, R.J., DURRANDAS, P.K., COOPER, R.M., CHARNLEY, A.K. (1988b) Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Arch. Microbiol.** 41501: 413-416.
- ST. LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. (1990) Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Gen. Microbiol.** 136:1779-1789.
- ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. (1991a) Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Invert. Pathol.** 58:415-426.
- ST. LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. (1991b) A model to explain differentiation of appressoria by germings of *Metarhizium anisopliae*. **J. Invert. Pathol.** 57:299-310.
- ST. LEGER, R., FRANK, D.C., ROBERTS, D.W., STAPLES, R.C. (1992) Molecular cloning and regulatory analysis the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Biochem.** 204:991-1001.
- ST. LEGER, R.J., FRANK, D.C., ROBERTS, D.W., STAPLES, R.C. (1993) Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Eur. J. Biochem.** 204:991-1001.
- ST. LEGER, R.J., JOSHI, L., BIDOCHKA, M.J., ROBERTS, D.W. (1996) Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 50:183-212.
- ST. LEGER, R.J., NELSON, J.O., SCREEN, S.E. (1999) The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. **Microbiol.** 145:2691-99.
- STIRLING, J., COOK, G., POPE, A. (1979) Chitin and its degradation. In: Fungal wall and hyphal growth. **British Mycological Society** p. 169-188.
- ZHIOA, E., BROWING, M., JONHSON, P.W., GINSEBERG, H.S., LEBRUM, R.A. (1997) Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularum* (Acari:ixodidae). **J. Parasitol.** 83 (5): 815-818. 