**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Diversidade filogenética e expressão de genes de virulência de
Metarhizium com ênfase em isolados brasileiros associados a
cultura da cana-de-açúcar**

Janayne Maria Rezende

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2014**

**Janayne Maria Rezende
Engenheira Agrônoma**

**Diversidade filogenética e expressão de genes de virulência de *Metarhizium*
com ênfase em isolados brasileiros associados a cultura da cana-de-açúcar**

Orientador:
Prof. Dr. ITALO DELALIBERA JÚNIOR

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Rezende, Janayne Maria

Diversidade filogenética e expressão de genes de virulência de *Metarhizium* com ênfase em isolados brasileiros associados a cultura da cana-de-açúcar / Janayne Maria Rezende. - - Piracicaba, 2014.
138 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Controle biológico 2. Entomopatógeno 3. Diversidade genética 4. Filogenia
5. Virulência 6. Patogenicidade I. Título

CDD 633.61
R467c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"

*Ao Marcos pela espera amorosa e por me mostrar o quão gratificante é
voltar para casa...*

*À Valdecina pela dedicação de mãe prestimosa, pelas inúmeras preces nos
momentos difíceis, pelo incentivo e por confiar em mim sempre...*

Dedico.

*A Giovanna a luz que se acendeu no meu momento de escuridão e a minha melhor
companhia na fase final deste trabalho...*

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais esta oportunidade de aprendizado e por sua infalível providência.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade oferecida.

Ao Prof. Dr. Italo Delalibera Júnior pela orientação, atenção e confiança.

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia, pelos conhecimentos compartilhados.

À Verônica Martins, técnica do Systematic Mycology and Microbiology Laboratory e meu “anjo da guarda” pela atenção, paciência e proteção.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Entomologia, em especial a toda a equipe do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, pelo apoio técnico e psicológico.

À Dra. Ane Hackbart de Medeiros pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa referente à expressão dos genes relacionados à virulência.

Ao Dr. Stephen A. Rehner pelo auxílio e orientação durante a realização do Doutorado Sanduíche no Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville Agricultural Research Center, USA.

Às colegas Mariana e Ana Carolina, bolsistas de iniciação científica, pela valorosa colaboração nos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado no país e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche pelo Programa Ciência sem Fronteiras.

*“Tudo tem seu apogeu e seu declínio...
É natural que seja assim, todavia,
quando tudo parece convergir para o que supomos o nada,
eis que a vida ressurge, triunfante e bela!
Novas folhas, novas flores, na infinita benção do recomeço...”*

Francisco C. Xavier

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 O complexo <i>Metarhizium anisopliae</i>	19
2.2 Exemplo clássico de controle microbiano no Brasil: <i>Metarhizium</i> versus <i>Mahanarva</i> spp. na cultura da cana-de-açúcar	21
2.3 Como os insetos se defendem do ataque pelo fungo entomopatogênico <i>Metarhizium</i> ?	24
2.4 Genes relacionados a virulência de <i>Metarhizium</i>	26
2.5 Expressão diferencial de genes relacionados à virulência de <i>Metarhizium</i>	28
Referências	30
3 FILOGENIA DE ISOLADOS BRASILEIROS DO GÊNERO <i>Metarhizium</i>	35
Resumo	35
Abstract	35
3.1 Introdução	36
3.2 Material e Métodos	38
3.2.1 Origem dos isolados.....	38
3.2.2 Avaliações morfológicas.....	47
3.2.3 Análise molecular	48
3.2.3.1 Extração de DNA.....	48
3.2.3.2 PCR e sequenciamento.....	49
3.2.3.3 Alinhamento múltiplo de sequências e análises filogenéticas	51
3.3 Resultados	52
3.3.1 Caracterização morfológica.....	52
3.3.2 Diversidade, designação taxonômica e filogenia dos isolados brasileiros de <i>Metarhizium</i>	60
3.3.3 Associação de <i>Metarhizium</i> com habitats e hospedeiros no Brasil	66
3.4 Discussão.....	68
Referências	73
4 ESPÉCIES DE <i>Metarhizium</i> spp. PRESENTES EM ÁREA DE CANAVIAL COM E SEM APLICAÇÃO DO FUNGO PARA CONTROLE DE <i>Mahanarva fimbriolata</i>	77

Resumo	77
Abstract.....	77
4.1 Introdução.....	78
4.2 Material e Métodos	79
4.2.1 Coleta de solo e rizosfera em plantios de cana-de-açúcar	79
4.2.2 Isolamento de <i>Metarhizium</i> do solo e da rizosfera.....	83
4.2.3 Extração de DNA	84
4.2.4 PCR, sequenciamento, alinhamento e análise filogenética	85
4.3 Resultados.....	86
4.4 Discussão	91
Referências.....	94
5 EXPRESSÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE <i>Metarhizium</i> spp. E DESCRIÇÃO DE METODOLOGIA PARA BIOENSAIO DE PATOGENICIDADE DE FUNGOS SOBRE <i>Mahanarva fimbriolata</i>	99
Resumo	99
Abstract.....	99
5.1 Introdução.....	100
5.2 Material e Métodos	102
5.2.1 Criação de <i>Mahanarva fimbriolata</i>	102
5.2.2 Metodologia de bioensaios para avaliação de <i>Metarhizium</i> spp. sobre <i>Mahanarva fimbriolata</i> em laboratório.....	102
5.2.3 Patogenicidade sobre <i>Tenebrio molitor</i> , <i>Diatraea saccharalis</i> e <i>Mahanarva fimbriolata</i>	105
5.2.4 Avaliação da expressão de genes relacionados a virulência de <i>Metarhizium anisopliae</i>	106
5.2.4.1 Preparo da cutícula dos insetos.....	106
5.2.4.2 Cultivo do micélio fúngico	107
5.2.4.3 Extração de RNA	108
5.2.4.4 Reação de PCR quantitativa.....	109
5.2.4.5 Construção da curva padrão, verificação da eficiência dos primers e análise da expressão relativa dos genes	112
5.3 Resultados.....	112

5.3.1 Metodologia de bioensaios para avaliação de <i>Metarhizium</i> spp. sobre <i>Mahanarva fimbriolata</i> em laboratório e patogenicidade sobre <i>Tenebrio molitor</i> , <i>Diatraea saccharalis</i> e <i>M. fimbriolata</i>	112
5.3.2 Avaliação da expressão de genes de relacionados a virulência de <i>Metarhizium anisopliae</i>	117
5.4 Discussão	129
Referências	133
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	137

RESUMO

Diversidade filogenética e expressão de genes de virulência de *Metarhizium* com ênfase em isolados brasileiros associados a cultura da cana-de-açúcar

O controle biológico de cigarrinha com *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) na cana-de-açúcar é um exemplo de sucesso da aplicação do manejo sustentável de pragas no Brasil. No entanto, pouco se sabe sobre a riqueza, distribuição e ecologia das espécies de *Metarhizium* nos agroecossistemas e ambientes naturais no Brasil. Neste trabalho, avaliou-se a diversidade genotípica e realizou-se a identificação específica de 96 isolados depositados na Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP pelo sequenciamento da região 5’ do fator de alongamento da tradução 1 alfa (5’-TEF) e das regiões espaçadoras intergênicas do DNA nuclear MzIGS3 e MzFG543igs. Observou-se a existência de 10, 11 e 17 haplótipos pelas sequências destes genes, respectivamente. Foram ainda obtidos 41 isolados de dois talhões de canavial em Araras-SP que consistiram em 9 haplótipos pela região MzIGS3. Foi observada a existência de cinco espécies de *Metarhizium*, duas atualmente reconhecidas, *M. anisopliae* s.l. e *M. robertsii* s.l., sendo estes os dois clados mais abundantes e três novas linhagens não caracterizadas taxonomicamente, referidas aqui como *Metarhizium* sp. indet. 1, *Metarhizium* sp. indet. 2 e *Metarhizium* sp. indet. 3. Com exceção de um único isolado todos os outros provenientes de insetos, incluindo os isolados de cigarrinha, pertencem a um único clado de *M. anisopliae* s.l. *M. robertsii* foi obtido exclusivamente a partir de amostras de solo ou rizosfera. Apesar de proporcionar um maior grau de resolução genética entre os isolados a região MzIGS3 se mostrou incapaz de reconstruir a filogenia consenso para o clado PARB, dificultando a sua utilização como sequência diagnóstica na identificação ou análise filogenética de espécies de *Metarhizium*. Além disso, foi desenvolvida uma técnica de bioensaio em laboratório para avaliação de patogenicidade de *Metarhizium* spp. sobre *M. fimbriolata* com mortalidade da testemunha inferior a 12%, após 28 dias de avaliação. A caracterização da expressão dos genes *pr1A*, *mad1* e *mpl* relacionados à virulência de três isolados de *M. anisopliae* (ESALQ 1037, ESALQ 1641 e ESALQ 1204) cultivados em meio mínimo e meio mínimo com cutícula de *M. fimbriolata*, *D. saccharalis* e *T. molitor* não revelou uma associação entre a expressão relativa desses genes e a virulência dos fungos *in vivo*. As informações contidas neste trabalho poderão contribuir em estudos de identificação e caracterização de *Metarhizium* em habitats naturais e agrícolas de no Brasil e países vizinhos na América do Sul, assim como auxiliar no contínuo desenvolvimento e acompanhamento do programa de controle biológico de *M. fimbriolata* com *Metarhizium* na cultura da cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Controle biológico; Entomopatógeno; Diversidade genética; Filogenia; Virulência; Patogenicidade

ABSTRACT

Phylogenetic diversity and expression of virulence genes of *Metarhizium* focusing on Brazilian strains associated to sugarcane crops

Biological control of spittlebug with *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) in sugarcane is an example of the successful application of sustainable pest management in Brazil. However little is known about the richness, distribution and ecology of *Metarhizium* species in agroecosystems and natural environments of Brazil. In this study, the genotypic diversity was accessed and species designation was assigned for 96 *Metarhizium* strains deposited in the Collection of Entomopathogens “Prof. Sérgio Batista Alves” from ESALQ-USP using the sequence variation at 5'-TEF and the nuclear intergenic loci MzFG543igs and MzIGS3. Sequence diversity at these loci included 10, 11 and 17 sequence haplotypes, according to these loci, respectively. 41 strains were recovered from two sugarcane fields and consisted of 9 haplotypes according to MzIGS3. Five species of *Metarhizium* were observed, being the two most abundant taxa, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium robertsii* and an additional three taxonomically unassigned lineages are referred to here as *Metarhizium* sp. indet. 1, *Metarhizium* sp. indet. 2 and *Metarhizium* sp. indet. 3. With a single exception, all strains isolated from insects belong to single clade of *M. anisopliae*, including the isolates infecting spittlebugs in sugarcane agroecosystems. *M. robertsii* was only recovered from soil or rhizosphere samples. Despite providing a greater degree of genetic resolution among strains, MzIGS3 revealed the inability to recapitulate the consensus phylogeny for the PARB clade and complicates its use as a stand-alone tool for species identification or phylogenetic analysis of *Metarhizium*. In addition, a laboratory bioassay technique was developed for pathogenicity screening of *Metarhizium* spp. on *M. fimbriolata* with low mortality on control group (8-12%) after 28 days of evaluation. The expression of genes *pr1A*, *Mad1* and *mpl* of three *M. anisopliae* strains (ESALQ 1037, ESALQ1204 and ESALQ 1641) grown in minimal medium and minimal medium with *M. fimbriolata*, *D. saccharalis* or *T. molitor* cuticle apparently was not related to virulence of the fungi in vivo. Together these data will serve as resources for identification, discovery and communicating about *Metarhizium* biodiversity for insect biological control applications in Brazil and adjacent countries in South America, as well as assist in the ongoing development and monitoring of the biological control program of *M. fimbriolata* with *Metarhizium* in sugarcane fields.

Keywords: Biological control; Entomopathogens; Genetic diversity; Phylogeny; Virulence; Pathogenicity

1 INTRODUÇÃO

Os bioinseticidas a base de agentes entomopatogênicos, constituem um método efetivo no controle de artrópodes-pragas. Dentre esses agentes, os fungos por serem de fácil produção *in vitro*, e por não agredirem o meio ambiente, os animais e o homem têm sido utilizados como alternativa aos inseticidas químicos convencionais.

O controle microbiano com fungos é uma realidade no manejo sustentável de inúmeras pragas. No Brasil o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* tem sido empregado de forma expressiva na cultura da cana-de-açúcar para o manejo de cigarrinhas que são pragas importantes neste cultivo. Embora este seja um exemplo clássico de controle microbiano no país, pouco se sabe sobre a diversidade, distribuição e ecologia das espécies de *Metarhizium* nos diversos ambientes naturais e agroecossistemas do Brasil. A maioria dos isolados de *Metarhizium* utilizados rotineiramente em programas de controle biológico foram identificados com base em critérios morfológicos, embora a identificação precisa das nove espécies atualmente reconhecidas no complexo *M. anisopliae* s.l. requeira o uso de análises moleculares.

Os fungos entomopatogênicos apresentam uma grande vantagem em comparação aos outros microorganismos que causam doenças em insetos, já que eles infectam seus hospedeiros através da cutícula e não necessitam ser ingeridos. A cutícula dos insetos é a primeira barreira contra a ação dos inseticidas biológicos ou químicos. Como a maioria dos fungos entomopatogênicos, as espécies do gênero *Metarhizium* utilizam uma combinação de força mecânica e enzimática para penetrar a cutícula do hospedeiro e ter acesso a hemolinfa rica em nutrientes. Tem sido observada uma correlação entre a expressão dos genes responsáveis pela codificação das enzimas que degradam a cutícula e a virulência de *M. anisopliae*, mutantes com maior expressão desses genes apresentam aumento significativo na virulência, assim como, os deficientes sofrem atenuação em sua virulência. A análise da expressão destes genes de virulência de *M. anisopliae* *in vitro* pode ser uma ferramenta na seleção de isolados para o controle de cigarrinhas.

Este trabalho teve como objetivos principais: analisar filogeneticamente com base em caracteres moleculares os isolados brasileiros pertencentes ao gênero *Metarhizium* depositados na Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP e isolados coletados recentemente em diferentes biomas

brasileiros; caracterizar a diversidade de *Metarhizium* em plantios de cana-de-açúcar com e sem emprego deste fungo para o controle de cigarrinha na cana-de-açúcar; e desenvolver uma técnica de bioensaio em laboratório para determinar a patogenicidade de *Metarhizium* spp. sobre *Mahanarva fimbriolata*, correlacionando a patogenicidade com a expressão de genes relacionados à virulência.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O complexo *Metarhizium anisopliae*

A filogenia e identificação de espécies do gênero *Metarhizium* vem passando por constantes modificações desde a primeira descrição, como *Entomophthora anisopliae*, pelo russo Ilya Mestchnikoff em 1879 (ALVES, 1998).

Com base em caracteres morfológicos Tulloch (1976) admitiu apenas duas espécies *M. flavoviride* e *M. anisopliae*, sendo a última dividida em var. *majus* ou var. *anisopliae*. Posteriormente, Driver et al. (2000) e Pantou et al. (2003) baseando-se em caracteres morfológicos e moleculares reconheceram três espécies para *Metarhizium*: *M. anisopliae*, variedades *anisopliae*, *majus*, *lepidiotum* e *acridum*; *M. flavoviride*, variedades *flavoviride*, *minus*, *novazealandicum*, *pemphigum* e Tipo E; e *M. album*. Segundo Dong et al. (2007) uma nova variedade para *M. anisopliae* foi descrita na China com a denominação *Dcjhium*. Nesses estudos a região sequenciada foi a ITS, a mesma não foi capaz de resolver a filogenia das espécies de *Metarhizium* deixando ainda muitas dúvidas.

Bischoff et al. (2009), embasados por análise filogenética multilocus fizeram significativas alterações na classificação do complexo *M. anisopliae*. Os autores elevaram ao nível de espécie *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. majus*, trouxeram de volta o nome *M. brunneum*, descreveram duas novas espécies *M. globosum* e *M. robertsii* e mostraram que *M. taii* é sinônimo posterior a *M. guizhouense*. A variedade proposta por Dong et al. (2007) foi dada como *nomen nudum*, devido a não designação de um holótipo.

Ainda segundo Bischoff et al. (2009) para algumas espécies do complexo *M. anisopliae* é difícil fazer a separação com base apenas em caracteres morfológicos, por exemplo, *M. anisopliae* apresenta morfologia idêntica a *M. robertsii*. Os autores sugerem que a maneira mais confiável para diferenciar as espécies dentro deste complexo é a utilização de ferramentas e análises moleculares. Com base nos resultados dos estudos de Bischoff et al. (2009) foi determinado que a região 5' do gene para o fator de alongamento da tradução (TEF-1 α) é a região mais informativa para o uso rotineiro na identificação de espécies dentro do gênero. Esta região exige apenas dois primers e é facilmente amplificada.

Tigano-Milani et al. (1995) foram uns dos primeiros a empregar métodos

moleculares para caracterizar isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *M. acridum* e *M. majus*. A técnica utilizada foi a de primers arbitrários PCR (AP-PCR/RAPD) para avaliar a diversidade genética entre os isolados obtidos a partir de insetos e solos, no entanto a atribuição taxonômica destes isolados foi baseada em critérios morfológicos, que conhecidamente não são suficientes para uma identificação específica. Após a revisão taxonômica de Bischoff et al. (2009) indicando que a região 5' do gene para o fator de alongamento da tradução (TEF-1 α) isoladamente é o locus mais útil para a identificação molecular desta espécie, cinco espécies de *Metarhizium* foram identificadas no Brasil, incluindo *M. anisopliae* ss., *M. flavoviride* var. *pemphigum*, *M. lepidiotae*, *M. pingshaense* e *M. robertsii* (LOPES et al., 2013a, 2013b, ROCHA et al., 2012). Rocha et al. (2012) relataram uma predominância da espécie *M. anisopliae* s.l (BISCHOFF et al., 2009) isolada a partir de amostras de solo da região do Central do Brasil (Cerrado). Entretanto a maioria dos haplótipos caracterizado por Rocha et al. (2012) aparentam ser uma linhagem irmã de *M. anisopliae* s.l.

Recentemente Kepler e Rehner (2013) apoiados pela caracterização genômica de *M. anisopliae* e *M. robertsii* (GAO et al., 2011) buscaram identificar novas regiões nucleares que fossem mais informativas para o complexo *Metarhizium*. Primers desenvolvidos para sete novas regiões foram avaliados (MzFG543igs, MzFG546igs, MzBTigs, MzIGS2, MzIGS3, MzIGS5 e MzIGS7) e os autores observaram que a análise filogenética combinada destes segmentos proporcionou uma genealogia satisfatória para o grupo. Além disso, devido a variabilidade apresentada pela região MzIGS3, esta foi indicada como sendo mais robusta para acessar a diversidade genética de isolados do complexo *Metarhizium anisopliae*.

Até o momento a diversidade dos isolados brasileiros não foi caracterizada utilizando as regiões indicadas por Kepler e Rehner (2013). Além disso, nos estudos brasileiros já realizados predomina a caracterização de populações de *Metarhizium* em localidades restritas. Porém, os isolados mais antigos tradicionalmente utilizados em pesquisas e/ou comercializados como bioinseticidas não foram alvo de uma identificação específica. Diante da importância deste entomopatógeno no controle microbiano de pragas, principalmente de cigarrinhas na cana-de-açúcar, é importante que se identifiquem as principais espécies brasileiras deste fungo.

2.2 Exemplo clássico de controle microbiano no Brasil: *Metarhizium* versus *Mahanarva* spp. na cultura da cana-de-açúcar

O Brasil é atualmente o maior produtor de cana-de-açúcar. A área de cana disponível para colheita na safra de 2013/14 foi estimada em 8,10 milhões de hectares (ha) (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2013). Atualmente a região Centro-Sul é responsável por 91,27% da produção de etanol e 71,69% da produção de açúcar. São Paulo é o maior produtor de cana com uma área de 4,55 milhões de hectares disponíveis para colheita, representando 51,66% de toda área de cana do país.

O Produto Interno Bruto (PIB) do segmento sucroalcooleiro atingiu na última safra (2013/14) US\$ 43,3 bilhões, com vendas de açúcar, álcool, aguardente e subprodutos da cana. A produção de álcool combustível se consolidou como alternativa renovável e pouco poluente ao petróleo e a produção de açúcar tem se destacado nos últimos anos. Esse segmento cresceu expressivos 44,2% nas últimas cinco safras, porém a elevação dos custos de produção ofuscou essa robustez (JORNAL VALOR ECONÔMICO, 2013). O aumento dos custos de produção agrícola, que subiram 33,5% no período se deve em grande parte aos gastos com manejo de pragas e doenças. A ocorrência de pragas é um dos fatores limitantes na produtividade da cana-de-açúcar, ocasionando prejuízos ao cultivo e ao aproveitamento industrial da cana. Por constituir um mercado de expressão na economia brasileira, preocupações com a qualidade e a produtividade devem ser constantes no setor.

No Brasil, as principais pragas da cana-de-açúcar são principalmente a broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae), e as cigarrinhas *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) e *Mahanarva posticata* (Hemiptera: Cercopidae). Outras pragas de importância são *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae), *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae) e a broca gigante *Telchin licus licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae) (GALLO et al., 2002). A cigarrinha *M. posticata* é a principal praga na região nordeste e *M. fimbriolata* tem grande importância na região sudeste do Brasil. A redução na produtividade causada por *M. fimbriolata* a diferentes genótipos de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo pode alcançar 50% segundo Almeida et al. (2003).

Canaviais infestados com cigarrinha sofrem reduções drásticas de produção e qualidade. Os danos mais significativos são causados pelas ninfas de cigarrinha, que se alimentam das raízes removendo água e nutrientes, resultando em estresse hídrico que predispõem as plantas hospedeiras à ocorrência de rachaduras e deterioração fisiológica, além de, aumentar a vulnerabilidade à invasão por patógenos e pragas secundárias. as cigarrinhas adultas apesar de em menor gravidade também causam danos foliares enfraquecendo ainda mais as plantas (GARCIA et al., 2006).

A cigarrinha das raízes, *M. fimbriolata*, tem ganhado mais importância na região sudeste principalmente após a redução das queimadas feitas antes do corte da cana, prática que está sendo substituída pela colheita mecanizada de cana “crua”. Somente na safra 2012/2013, o percentual de matéria-prima colhida de forma mecanizada alcançou 72,6% no estado de São Paulo, número que representa 3,38 milhões de hectares. A legislação estadual, Decreto-Lei Estadual no 42.056/9, determina que até 2021 a queimada da cana deva ser banida, porém em junho de 2007 o Protocolo Agroambiental firmado entre o setor canavieiro e as Secretarias de Estado da Agricultura e Abastecimento (SAA) e do Meio Ambiente (SMA), firmou que entre outros aspectos, a antecipação voluntária dos prazos legais para o fim da queima da palha da cana nos canaviais paulistas, sendo a safra 2014/15 o prazo final para a eliminação do uso do fogo nas áreas planas (REVISTA FAPESP, 2013) Acredita-se que o fogo seja um eficiente redutor dos insetos que permanecem na superfície do solo ou palha (DINARDO-MIRANDA et al., 2000; ALMEIDA et al., 2003). Desta forma com a redução gradativa da queimada da cana as reduções anuais em populações de pragas associadas a esta prática não ocorrem mais e as populações de cigarrinhas têm aumentado nos locais onde a colheita mecânica tem sido adotada (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011), criando um novo desafio técnico e econômico a ser solucionado.

O uso de pesticidas químicos para controlar as populações de cigarrinhas em campos colhidos mecanicamente é difícil de ser implementado devido ao crescimento aéreo densa da cultura. Além disso, as preocupações sobre os efeitos colaterais dos pesticidas na saúde humana, animal e ambiental têm motivado a busca de estratégias mais compatíveis com o ambiente para o controle desses insetos. Muitas usinas têm optado pela aplicação do fungo *Metarhizium* visando o controle de *M. fimbriolata* e *M. posticata*.

O controle de *M. posticata* com o fungo *Metarhizium* sp. iniciou-se em 1969 (MARQUES et al., 1981). Durante o período de 1970 e 1998, mais de 40 toneladas de conídios foi produzida no Estado de Pernambuco e este produto foi aplicado em aproximadamente 500.000 hectares de cana-de-açúcar. Em Alagoas, aproximadamente 670.000 hectares foram pulverizadas com *Metarhizium* sp. entre 1977 e 1991.

Atualmente este fungo entomopatógeno é produzido no Brasil e no mundo, quase que exclusivamente, utilizando-se arroz autoclavado como substrato e aplicado de diversas maneiras. Alguns produtores lavam os grãos de arroz esporulados em água e aplicam a calda resultante, enquanto outros distribuem diretamente os grãos de arroz nos locais infestados, práticas estas que podem ser feitas até por avião (DINARDO-MIRANDA et al., 2004). Testes de campo comprovaram a eficiência de alguns isolados na redução populacional da cigarrinha (BATISTA FILHO et al., 2003), atingindo valores de controle próximos aos 80% (LOPES et al., 2002; ALVES et al., 2007).

Devido ao manejo satisfatório que o fungo *M. anisopliae* tem proporcionado para as cigarrinhas da cana-de-açúcar, informações extra oficiais sugeriram que em 2012 o micoinseticida foi pulverizado em aproximadamente 2 milhões de hectares. De forma visionária levando em consideração a área cultivada com cana-de-açúcar no Brasil e que ainda não utiliza micopesticidas podemos imaginar o potencial de aumento na aplicação deste micoinseticida em nosso país.

De qualquer forma, a prova do sucesso do controle com este fungo é a existência de produtos comerciais à base de *M. anisopliae* registrados para controle da cigarrinha da raiz, além de várias usinas de cana-de-açúcar que o produzem em seus laboratórios para consumo próprio.

Apesar do emprego de *Metarhizium* para o controle das cigarrinhas em cana-de-açúcar ser um exemplo clássico de controle microbiano no Brasil, sendo rotineiramente alvo de estudos. Ainda é incipiente o conhecimento sobre a diversidade, distribuição e ecologia das espécies *Metarhizium* nos diversos ambientes agrícolas e naturais do Brasil. Poucos estudos tiveram como objetivo discriminar as espécies e a variabilidade genética dos isolados aplicados aos programas de manejo.

2.3 Como os insetos se defendem do ataque pelo fungo entomopatogênico

Metarhizium?

O sistema de defesa dos insetos é representado por mecanismos que incluem barreiras mecânicas e fisiológicas. A primeira é constituída principalmente pelo tegumento (GULLAN; CRANSTON, 1994; CHAPMAN, 1998), que além de proteção mecânica evita que haja perda excessiva de água e também forma uma barreira efetiva contra a entrada de patógenos. A segunda envolve uma grande variedade de respostas celulares e humorais, que são desencadeadas caso haja a entrada de microorganismos e/ou partículas estranhas na hemolinfa. As respostas fisiológicas dependem da imunidade inata, a qual inclui basicamente dois mecanismos: a) mecanismos celulares (resposta imune celular), os quais envolvem mudanças na população dos hemócitos, esta resposta pode ser dividida em três mecanismos distintos: fagocitose, encapsulamento e formação de nódulos (SALT, 1970; RATCLIFFE, 1993); b) mecanismos humorais (resposta imune humoral) que se caracteriza pela indução de moléculas antimicrobianas na hemolinfa, uma vez que esta tenha sido invadida (COCIANCICH et al., 1994). O tipo de mecanismo desencadeado varia consideravelmente com o tipo do invasor.

A cutícula dos insetos é a primeira barreira contra inseticidas biológicos ou químicos. As células da epiderme, a membrana basal, e a cutícula compõe o tegumento, já as camadas que estão presentes na cutícula, de fora para dentro, são a epicutícula, exocutícula e endocutícula. A epicutícula é formada externamente por uma camada de cimento, depois por uma camada de cera e por uma camada de cuticulina e em seqüência pela epicutícula interna. Em muitos insetos as camadas superiores de cera e cimento estão separadas, mas em alguns insetos é possível observar que esta camada de cimento não é contínua e na verdade constitui um mosaico de cimento e lipídeos (NATION, 2002). A camada de cimento é formada por mucopolissacarídeos, que são produzidos pelas glândulas dermais tipo 3 e alguns insetos como as abelhas não a produzem. A camada de cera é composta por vários componentes como: hidrocarbonetos (21 a 25 átomos de carbono), álcoois, ésteres, ácido graxos e outros. A composição varia muito entre os insetos, porém os hidrocarbonetos normalmente são os predominantes e sua relação com a patogenicidade e a virulência de fungos e tem sido muito estudada (PEDRINI et al., 2007). A camada de cera é sintetizada pelos oenócitos. A epicutícula externa ou

cuticulina, a terceira região de cutícula (de fora para dentro) e a primeira camada sintetizada na muda, é uma membrana trilaminar muito fina, que tem um importante papel na permeabilidade cuticular. Durante a formação desta camada há presença de substâncias fenólicas e fenoloxidase, sendo que a fenoloxidase persiste na cutícula madura, estando envolvida no reparo caso ocorra danos.

A procutícula é normalmente dividida em exocutícula e endocutícula, mas dependendo do inseto pode ocorrer a mesocutícula. Inicialmente a procutícula é indiferenciada e seus principais constituintes são proteínas e quitina. É secretada pelas células epidérmicas. A primeira camada a se formar é a exocutícula, que contém quitina e proteínas, é altamente esclerotizada e torna-se escurecida, rígida e insolúvel, sendo a quitina e as proteínas que conferem a estrutura e rigidez ao exoesqueleto. Os pigmentos cuticulares, como por exemplo, a melanina, são depositados na exocutícula e conferem a cor de vários insetos. Porém, a composição desta camada também varia muito de inseto para inseto, e normalmente é mais esclerotizada em adultos do que em larvas, muitas larvas apresentam uma cutícula flexível com fina camada de exocutícula ou mesmo sem exocutícula, mas o inverso também pode ocorrer. O conteúdo de quitina não controla o escurecimento do tegumento, mas sim a esclerotização, e devido a esclerotização pequena ou nenhuma fração da exocutícula é digerida durante a muda. A mesocutícula também contém quitina e proteínas, mas é menos esclerotizada. A endocutícula é macia, contém quitina e proteínas, mas é pouco esclerotizada sendo bem flexível (NATION, 2002; PEDRINI et al., 2007)

Desta forma, a cutícula é composta majoritariamente por proteínas, lipídios e quitina. As proteínas e quitina interagem tendo uma função mecânica no exoesqueleto, conferindo resistência e endurecimento. Já os lipídios estão nas camadas mais externas, conferem proteção contra dessecação, são relacionados ao comportamento, a ecologia e tem importante papel na taxonomia. Em cutículas de vários insetos as proteínas estão presentes em maior quantidade que a própria quitina, são sintetizadas nas células epidérmicas e algumas são específicas de espécies ou mesmo de estágios já outras são comuns na maioria dos insetos.

O conhecimento do mecanismo de invasão dos fungos entomopatogênicos nos seus hospedeiros, assim como do sistema de defesa dos insetos aos patógenos é fundamental. Tem sido observada uma alta correlação entre a expressão dos genes responsáveis pela codificação das enzimas que degradam a cutícula,

principalmente proteases, e a virulência de espécies do complexo *M. anisopliae* (FREIMOSER et al., 2005; SHAH et al., 2005; SMALL; BIDOCHKA, 2005; MOHANTY et al., 2008), mutantes com maior expressão desses genes apresentam aumento significativo na virulência, assim como, os deficientes sofrem atenuação em sua virulência (WANG et al., 2002). Isto demonstra a importância de estudos sobre a seleção de isolados de *M. anisopliae* por meio da análise da expressão de genes relacionados a sua virulência.

2.4 Genes relacionados a virulência de *Metarhizium*

A grande vantagem dos fungos em relação aos demais microrganismos entomopatogênicos é que estes são capazes de causar doenças em insetos penetrando pela cutícula e dispensando a ingestão, a forma pela qual a maioria dos entomopatógenos atua. O processo de infecção de *Metarhizium* ocorre em fases sucessivas de germinação, diferenciação, penetração, colonização, reprodução e disseminação (ALVES, 1998). No hospedeiro, a infecção é iniciada pelos conídios, produzidos assexuadamente, que em contato com a cutícula do hospedeiro suscetível se fixam por interação hidrofóbica intermediada pelas hidrofobinas presentes na parede celular do fungo. A camada mais externa da superfície do hospedeiro sofre modificações superficiais devido a ação de enzimas como proteases, esterases, lipases e N-acetilglicosidases (St. LEGER, 1995). Após a adesão ocorre a germinação dos conídios na superfície do artrópode, nesta fase o conídio forma um tubo germinativo que posteriormente se diferencia em apressório que é uma estrutura especializada para a penetração (SMALL; BIDOCHKA, 2005). Depois da formação do apressório, desenvolvem-se os grampos de penetração. Na penetração estão envolvidos os fatores físicos (pressão da hifa que rompe áreas membranosas ou esclerosadas) e químicos, resultantes da liberação, pelo fungo, de enzimas (esterases, proteases, lipases e quitinases) que facilitam a penetração mecânica. As enzimas produzidas pelo fungo têm importante papel no processo de infecção de insetos, pois estão envolvidas na hidrólise dos componentes cuticulares, dos quais predomina as proteínas, o que possibilita a penetração da hifa através da cutícula dos insetos (St. LEGER et al., 1989). Vencida a barreira do tegumento, em contato com a hemolinfa, rica em carboidratos, proteínas e aminoácidos, as hifas se diferenciam em estruturas denominadas blastosporos que propagam-se pelo

hospedeiro (SMALL; BIDOCHKA, 2005). Após 3 a 5 dias da infecção ocorre a morte do hospedeiro que se torna rígido e coberto por uma camada pulverulenta uniforme de conídios de coloração verde sobre o cadáver, por isso, a doença é conhecida como muscardine verde (SHAH; PELL, 2003).

Na dinâmica do processo de infecção, na seqüência de produção e atividade das enzimas tem-se a atividade de esterases e enzimas do complexo proteolítico (proteases, aminopeptidases e carboxipeptidases) que aparecem primeiro (24 h), e incrementam rapidamente depois de 48 h. Já as quitinases são produzidas a partir de 3 a 5 dias, tendo depois sua atividade aumentada rapidamente. A produção de quitinases é mais tardia, pois a mesma só irá atuar depois que as proteases liberarem a quitina da matrix protéica na qual estão inseridas compondo a cutícula dos insetos (St. LEGER; CHARNLEY; COOPER, 1986).

Em *M. anisopliae* as enzimas proteolíticas, além de estarem envolvidas nos processos de formação e germinação dos conídios, têm funções nutricionais importantes, sendo capazes de hidrolisar as cadeias polipeptídicas em cadeias menores, que são absorvidas pelas células. A produção de proteinases pelo fungo tem sido estudada principalmente correlacionando-a com os processos de especificidade, patogenicidade e virulência do entomopatógeno. Dentre as proteases identificadas para este fungo podemos destacar a enzima do tipo subtilisina, denominada Pr1, que é a principal enzima produzida por *M. anisopliae* durante a infecção para degradar o tegumento do inseto, e outra com atividade tipo tripsina designada Pr2 pertencente ao grupo das serinoproteinases (St. LEGER et al., 1986). Além das enzimas já citadas, *M. anisopliae* produz uma metaloproteinase (St. LEGER et al., 1994), duas aminopeptidases extracelulares (St. LEGER, 1995), uma cisteína proteinase designada Pr4 (COLE et al., 1993) e uma aspartilprotease (St. LEGER et al., 1998). Contudo diversos estudos salientam que entre as enzimas secretadas a protease extracelular, Pr1 é um dos principais fatores de virulência de *M. anisopliae* (St. LEGER et al., 1992; FREIMOSER et al., 2005; SHAH et al., 2005; MOHANTY et al., 2008). Várias isoformas de Pr1 foram identificadas e Bagga et al. (2004), que por meio de análises baseadas em similaridades de seqüência e na estrutura dos exons e introns, agrupou as subtilisinas de *M. anisopliae* em quatro grupos, sugerindo que esta subdivisão de subtilisinas está relacionada a especiação das principais linhagens de fungos e que no entanto, a diversificação continuou durante a evolução do gênero *Metarhizium*. Há evidências da ocorrência de eventos de duplicação

gênica e posterior divergência de *M. anisopliae* e *M. acridum*, levando a especulação de que cada parálogo de *Pr1* contribui para a adaptação do patógeno, fato apoiado devido às diferenças entre as especificidades de substrato para as isoformas de *Pr1*. Assim, teoricamente, depois de duplicação gênica, uma cópia do gene manteve a sua função original, enquanto a outra cópia ficou livre para acumular mudanças em seus aminoácidos em direção a divergência funcional. Consequentemente, a duplicação de genes e a divergência desempenham um papel importante na geração de diversificação funcional necessárias para a adaptação. Presumivelmente, esse processo produziu uma série complexa de armamento químico que permite que os fungos ascomicetos se adaptem a uma ampla gama de habitat, e sejam, por exemplos, saprófitos e patogênicos. Essa diversidade também pode estar associada à patogenicidade e a virulência das espécies de *Metarhizium* a hospedeiros específicos.

2.5 Expressão diferencial de genes relacionados à virulência de *Metarhizium*

A patogenicidade e virulência de fungos entomopatogênicos em relação aos insetos pode variar em função de vários fatores, e muitos desses fatores estão relacionados a expressão diferencial dos genes de virulência. A expressão desses genes, assim como, a virulência propriamente dita são influenciadas por características intrínsecas do hospedeiro e do isolado, pelo meio de cultivo do fungo, por sucessivas repicagens entre outros fatores.

O meio de cultura e as condições nutricionais durante o cultivo exercem forte influencia sobre a virulência de conídios de *M. anisopliae*. Shah et al. (2005) observaram que conídios mais virulentos foram obtidos quando o fungo foi cultivado no inseto hospedeiro, *Tenebrio molitor* L. 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae), em meio de estresse osmótico (5,5% de ágar, 8% de glucose, 2% de peptona e 5,5% de cloreto de potássio), em meio com baixa relação carbono nitrogênio de 1:10 (0,6% de glucose, 1% de peptona e 2% de ágar) e em meios pobres em nutrientes (2% de ágar e 1% de extrato de levedura ou 2% de peptona), sendo a maior virulência apresentada por conídios cultivados em meio pobre com 1% de extrato de levedura. Adicionalmente, observou-se que a virulência estava relacionada a maior expressão dos genes *pr1A*, *chy1* e *ste1*.

A atenuação da virulência pode estar relacionada, por exemplo, a repetidas subculturas em meio de cultura, como mostrado por Shah et al. (2007). Esse estudo mostra que a subcultura repetida pode causar atenuação da virulência, pois altera diversos fatores responsáveis pela patogenicidade de *M. anisopliae*, mais especificamente as características da superfície dos conídios e a atividade de Pr1. Wang et al. (2002) detectaram e caracterizaram um mutante espontâneo de *M. anisopliae* que perdeu parte de seu genoma contendo genes de virulência como o *pr1A* e *pr1B*. Os isolados mutantes também apresentaram baixa atividade de elastase, porém a atividades da protease Pr2 e proteases não específicas foi mantida. O mutante deficiente no gene mais importante relacionado a virulência, *pr1*, embora tenha sido capaz de infectar seu hospedeiro, teve a virulência reduzida drasticamente para *Tenebrio molitor*. Para explicar a mutação os autores alegam que esse fato não é incomum em fungos filamentosos e sugerem que a perda de genes ou cromossomos ocorre quando não são utilizados, ou seja, não é incomum *M. anisopliae* perder seus genes de virulência durante a manutenção em meio artificial.

O hospedeiro também pode levar a alteração na expressão dos genes de virulência do fungo, este fato é exemplificado no trabalho de Mohanty et al. (2008), no qual *M. anisopliae* foi cultivado em meio de cultura contendo cutícula de uma das três espécies de mosquitos, *Aedes aegypti* L., *Culex quinquefasciatus* L., 1763 ou *Anopheles stephensi* Liston, 1901 (Diptera: Culicidae). Foi observado que a CL₅₀ de conídios para larvas de terceiro ínstar foi menor para *C. quinquefasciatus*, em relação a *A. aegypti* e a *A. stephensi*, enquanto que a atividade de Pr1 foi maior para *C. quinquefasciatus*, ocorrendo uma alta correlação entre a virulência do fungo, dada pela CL₅₀, e a atividade de Pr1.

De forma semelhante, Freimoser et al. (2005) observaram variações nos padrões de expressão dos genes relacionados à virulência de *M. anisopliae* em respostas a cutículas de diferentes hospedeiros e meios de cultura. Neste estudo o fungo foi transferido para meio mínimo (MM), ou meio mínimo mais cutícula de diferentes insetos após um período de crescimento em um meio rico em nutrientes. Foram testados, meio mínimo (MM), MM mais cutícula de *Manduca sexta* (L., 1763) (Lepidoptera: Sphingidae), MM mais cutícula de barata *Blaberus giganteus* (L., 1758) (Blattodea: Blaberidae), MM mais cutícula de besouro *Popilia japonica* Newman, 1838 (Coleoptera: Scarabaeidae), MM mais cutícula da lagarta de *Lymantria díspar*

(L., 1758) (Lepidoptera: Lymantriidae) e apenas hemolinfa de *M. sexta*. Como resultados observaram rápidas mudanças na expressão de alguns genes em resposta aos meios e em geral, essas mudanças aumentaram em magnitude com o tempo. A magnitude da expressão da maioria dos genes regulados positivamente pela privação de nutrientes em MM, incluindo a maioria das proteases, foi drasticamente aumentada pela presença das cutículas no meio e de forma geral os genes mostraram respostas específicas para as diferentes cutículas. Sabe-se que a atividade de subtilisina total é produzida em resposta à privação de nutrientes, mas que a produção é melhorada pela adição de cutícula no meio. Coerente com isso, a expressão das subtilisinas *pr1A* e *pr1B* foram reguladas positivamente em MM, e em maior medida no meio contendo cutículas de insetos. O incremento na indução pela cutícula comparado ao meio nutricionalmente fraco sozinho, sugere que a produção de subtilisinas é controlada por múltiplos sistema regulatórios acionados sob diferentes condições ambientais. Além disso, a expressão das isoformas de *pr1* foi influenciada pelo tipo de cutícula incorporada ao meio de cultivo.

A demonstração da regulação diferencial de genes que codificam enzimas de degradação da cutícula sugere que *M. anisopliae* pode ter a capacidade de direcionar a produção dessas proteínas em diferentes hospedeiros. A técnica molecular de PCR quantitativo em tempo real tem sido empregada em diversos estudos deste tipo e tem se mostrado um método sensível e confiável, apresentando vantagens sobre outros métodos, como a redução de tempo de mão de obra, facilidade da técnica e baixo custo de reagentes.

Referências

ALMEIDA, J.E.M; BATISTA FILHO, A; SANTOS, A.S. Avaliação do controle biológico de *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) com o fungo *Metharhizium anisopliae* em variedades de cana-de-açúcar e diferentes épocas de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p.101-103, jan./mar. 2003.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 11, p. 289-382.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; PAULI, G.; MASCARIN, G.M.; VIEIRA, S.A. Efeito de diferentes formulações de *Metarhizium anisopliae* na proteção à radiação e eficiência no controle de *Mahanarva fimbriolata*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 10., 2007, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 2007. 1 CD-ROM.

BAGGA, S.; HU, G.; SCREEN, S.E.; St. LEGER, R.J. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, Amsterdam, v. 324, p. 159-169, Jan. 2004.

BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; SANTOS, A.S.; MACHADO, L.A.; ALVES, S.B. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: Cercopidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 309-314, jul./set. 2003.

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, Lawrence, v. 101, n. 4, p. 512-530, July/Aug. 2009.

CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 770 p.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, H.M.C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J.C.; BURNQUIST, W.L.; CRESTE, S.; CIERO, L.; FERRO, J.A.; FIGUEIRA, A.V.O.; FILGUEIRAS, T.S.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; GUZZO, E.C.; HOFFMANN, H.P.; LANDELL, M.G.A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F.C.; ROMANO, E.; SILVA, W.J.; SILVA FILHO, M.C.; ULIAN, E.C. Sugarcane (*Saccharum x officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, Viçosa, v. 4, n. 1, p. 62–89, Mar. 2011.

COCIANCICH, S.; BULET, P.; HETRU, C.; HOFFMANN, J. The inducible antibacterial peptides of insect. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 10, n. 4, p. 132-139, Apr. 1994.

COLE, S.C.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Purification and partial characterization of a novel trypsin-like cysteine protease from *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p.189-196, Oct.1993.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar**, terceiro levantamento, dezembro/2013. Brasília, 2013. Disponível em:<<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 12 jun. 2014.

DINARDO-MIRANDA L.L.; FERREIRA, J.M.G.; CARVALHO, P.A.M. Influência das cigarrinhas das raízes, *Mahanarva fimbriolata*, sobre a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar. **STAB - Açúcar e Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 19, n. 2, p. 34-35, 2000.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; FERREIRA, J.M.G.; GARCIA JR., C.A.; COELHO, A.L.; GIL, M.A. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) no Controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 91-98, nov./dez. 2004.

DONG, C.; ZHANG, J.; HUANG, H.; CHEN, W.; HU, Y. Characterization of a newly discovered China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) for virulence to termites, isoenzyme, and phylogenetic analysis. **Microbiological Research**, Cambridge, v. 162, n. 1, p. 53-61, Sept. 2007.

DRIVER, F.; MILNER, R.J.; TRUEMAN, J.W.H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of r DNA sequence data. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 134-150, Dec. 2000.

FREIMOSER, F.M.; HU, G.; ST. LEGER, R.J. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. **Microbiology**, Reading, v. 151, p. 361-371, Feb. 2005.

GALLO, D.; NAKANO, O.; WIENDEL, F.M.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.de; BERTI FILHO, E.; PARA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D. **Manual de entomologia agrícola**. 10. ed. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GAO, Q.; JIN, K.; YING, S.H.; ZHANG, Y.; XIAO, G.; SHANG, Y.; DUAN, Z.; HU, X.; XIE, X.Q.; ZHOU, G.; PENG, G.; LUO, Z.; HUANG, W.; WANG, B.; FANG, W.; WANG, S.; ZHONG, Y.; MA, L.J.; ST. LEGER, R.J.; ZHAO, G.; PEI, Y.; FENG, M.; XIA, Y.; WANG, C. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. **Plos Genetics**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. 1-18, Jan. 2011.

GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P. Biology and fertility life table of *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.63, n. 4, p. 317-320, July/Aug. 2006.

GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. External anatomy. In: _____. (Ed.). **The insect an outline of entomology**. 2nd ed. London: Chapman & Hall, 1994, p. 21-50.

JORNAL VALOR ECONÔMICO. **Commodities agrícolas**. 2013. Disponível em: <<http://www.valor.com.br>>. Acesso em: 13 abr. 2013.

KEPLER, R.M.; REHNER, S.A. Genome-assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 210–217, Mar. 2013.

LOPES, R.B.; TAMAI, M.A.; ALVES, S.B. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* no controle de *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 19., 2002, Manaus. **Anais...** Manaus: INPA, 2002. p. 54.

LOPES, R.B.; MARTINS, I.; SOUZA, D.A.; FARIA, M. Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 112, n. 3, p. 236-242, Mar. 2013a.

LOPES, R.B.; SOUZA, D.A.; OLIVEIRA, C.M.; FARIA, M. Genetic diversity and pathogenicity of *Metarhizium* spp. associated with the white grub *Phyllophaga capillata* (Blanchard) (Coleoptera: Melolonthidae) in a soybean field. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 42, n. 4, p. 436-438, Aug. 2013b.

MARQUES, E.J.; VILLAS BOAS, A.M.; PEREIRA, C.E.F. Orientações técnicas para a produção de fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em laboratórios setoriais. **Boletim Técnico PLANALSUCAR**, Piracicaba, n. 3, p. 5-23, 1981.

MOHANTY, S.S.; RAGHAVENDRA, K.; DASH, A.P. Induction of chymoelastase (Pr1) of *Metarhizium anisopliae* and its role in causing mortality to mosquito larvae. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 10, p. 2283-2288, Oct. 2008.

NATION, J.L. **Insect physiology and biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2002. 469 p.

PANTOU, M.P.; MAVRIDOU, A.; TYPAS, M.A. 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**, San Diego, v. 38, n. 2, p. 159-174, Mar. 2003.

PEDRINI, N.; CRESPO, R.; JUÁREZ, M.P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 146, n. 1/2, p. 124-137, July/Aug. 2007.

RATCLIFFE, N.A. Cellular defence responses of insects: unresolved problems. In: BECKAGE, N.E.; THOMPSON, S.N.; FEDERICI, B.A. (Ed.). **Parasites and pathogens of insects**. San Diego: Academic Press, 1993. v. 1, p. 269-304.

REVISTA FAPESP. **Mecanização da colheita de cana diminui emissão de gases de efeito estufa na atmosfera**. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2013/03/25/mecanizacao-da-colheita-de-cana-diminui-emissao>>. Acesso em: 05 jul. 2014.

ROCHA, L.F.N.; INGLIS, P.W.; HUMBER, R.A.; KIPNIS, A.; LUZ, C. Occurrence of *Metarhizium* spp. in Central Brazilian soils. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 53, n. 3, p. 251-259, Mar. 2012.

SALT, G. **The cellular defense reactions of insects**. London: Cambridge University Press, 1970. 118 p.

SHAH, F.A.; WANG, C.S.; BUTT, T.M. Nutrition influences growth and virulence of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 251, n. 2, p. 259-266, Oct. 2005.

SHAH, F.A.; CHRIS, N.A.; WRIGHT, J.; BUTT, T.M. Repeated in vitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 276, n. 1, p. 60-66, Nov. 2007.

SHAH, P.A.; PELL, J.K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 61, n. 5/6, p. 413-423, June 2003.

SMALL, C.L.N.; BIDOCHKA, M.J. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 3, p. 307-313, Mar. 2005.

St. LEGER, R.J. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, n. 1, p. 1119-1125, 1995.

St. LEGER, R.J.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 313, n. 1, p. 1-7, Aug. 1994.

St. LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 48, n. 1, p. 85-95, July 1986.

St. LEGER, R.J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 2, p. 709-713, Feb. 1998.

St. LEGER, R.J.; BUTT, T.M.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, Orlando, v. 13, n. 3, p. 253-262, Sept. 1989.

St. LEGER, R.J.; ALLEE, L.L.; MAY, B.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, n. 12, p. 1007-1015, Dec. 1992.

TIGANO-MILANI, M.S.; GOMES, A.C.M.M.; SOBRAL, B.W.S. Genetic variability among Brazilian isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 65, n. 2, p. 206-210, Mar. 1995.

TULLOCH, H. The genus *Metarhizium anisopliae*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 66, n. 3, p. 407-411, June 1976.

WANG, C.; TYPAS, M.A.; BUTT, T.M. Detection and characterisation of Pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 213, n. 2, p. 251-255, Aug. 2002.

3 FILOGENIA DE ISOLADOS BRASILEIROS DO GÊNERO *Metarhizium*

Resumo

O controle biológico de cigarrinha com *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) na cana-de-açúcar é um exemplo de sucesso da aplicação do manejo de pragas sustentável no Brasil. No entanto, pouco se sabe sobre a riqueza, distribuição e ecologia das espécies *Metarhizium* nos agroecossistemas e ambientes naturais no Brasil. No presente estudo realizou-se uma análise filogenética baseada em caracteres moleculares de 96 amostras de *Metarhizium* provenientes do Brasil. Os fungos foram isolados de diferentes espécies de insetos, com predominância de cigarrinha das raízes, e solos provenientes de cana, outras culturas agrícolas e de habitats naturais, além de produtos comerciais utilizados no controle biológico. Para avaliar a diversidade genotípica e realizar a identificação específica dos isolados efetuou-se o sequenciamento da região 5' contida no fator de alongamento da tradução 1 alfa (5'-TEF) e das regiões espaçadoras intergênicas do DNA nuclear MzFG543igs e MzIGS3, que resultaram na observação de 10, 11 e 17 haplótipos, respectivamente. A análise filogenética combinada dessas três regiões resultou na confirmação da delimitação específica dos dois táxons mais abundantes deste trabalho, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii*, com evidência para subdivisões filogenéticas dentro dessas espécies, bem como na resolução de duas novas linhagens distintas entre si e distintas das espécies atualmente reconhecidas neste complexo. Com uma única exceção, todos os isolados provenientes de insetos se agruparam em apenas um subclado de *M. anisopliae*, incluindo os isolados coletados a partir de cigarrinha na cultura da cana-de-açúcar. Os dados gerados neste trabalho poderão contribuir com os estudos de identificação e caracterização de *Metarhizium* em habitats naturais e agrícolas de todo o Brasil e países vizinhos na América do Sul.

Palavras-chave: Controle biológico; Entomopatógeno; Caracterização molecular; Hypocreales

Abstract

Biological control of spittlebug with *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) in sugarcane is an example of the successful application of sustainable pest management in Brazil. However little is known about the richness, distribution and ecology of *Metarhizium* species in the agroecosystems and natural environments of Brazil. We investigated *Metarhizium* species in Brazil within a collection of 96 strains isolated from different insect species and soils with a predominance of strains from mycosed spittlebug pests, soil isolates from sugarcane and other agricultural crops, commercial and non-commercial products used for spittlebug biological control as well as soil isolates from pristine habitats. Sequence variation at 5'-TEF and the nuclear intergenic loci MzFG543igs and MzIGS3 were used to assess genotypic diversity and to assign isolates to species and operational taxonomic units. Sequence diversity at these loci included 10, 11 and 17 sequence haplotypes, respectively. Results of a combined phylogenetic analysis of these sequence data yielded robust support for current species limits of the two most abundant taxa, *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium robertsii*, with evidence for phylogenetic subdivisions within these species, and the resolution of two novel

lineages outside of currently recognized species limits in this complex. With a single exception, all strains isolated from insects belong to a single subclade of *M. anisopliae*, including the isolates infecting spittlebugs in sugarcane agroecosystems. Together these data will serve as resources for identification, discovery and communicating about *Metarhizium* biodiversity for insect biological control applications in Brazil and adjacent countries in South America.

Keywords: Biological control; Entomopathogenic fungi; Molecular characterization; Hypocreales

3.1 Introdução

O Brasil é um dos países pioneiros no emprego do entomopatógeno *Metarhizium* sp. Atualmente micoinseticidas a base desse fungo têm sido utilizado majoritariamente para no controle de cigarrinhas incluindo *Mahanarva fimbriolata*, *M. posticata*, *Deois flavopicta* e *Notozulia entreriana*, em cana de açúcar e pastagem (ALVES, 1998). *Metarhizium anisopliae* tem proporcionado controle aceitável das cigarrinhas da cana-de-açúcar (BATISTA FILHO et al., 2003), sendo que no ano de 2012 informações extra oficiais sugeriam que o fungo havia sido pulverizado em aproximadamente 2 milhões de hectares de cana-de-açúcar. O potencial de aumento na aplicação do micoinseticida para o controle destas pragas no Brasil é igualmente vasto, devido a imensa área cultivada com cana de açúcar, cujas estimativas são de 8,8 milhões de hectares (CONAB, 2013).

Devido à crescente preocupação com o impacto ambiental, a saúde da população, a poluição com carbono atmosférico, a destruição da biota do solo e degradação térmica da estrutura do solo (SOUZA et al., 2012), a colheita da cana que tradicionalmente era precedida por queimadas está sendo substituída pela colheita mecanizada (GALDOS, 2013). No entanto, a evolução das práticas agrícolas mudou a dinâmica populacional de pragas no canavial. As reduções anuais de pragas associadas à queima não ocorrem mais e as populações de cigarrinhas têm aumentado nos locais onde a colheita mecânica tem sido adotada (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Canaviais infestados de cigarrinha sofrem reduções drásticas de produção e qualidade. Os danos mais significativos são causados pelas ninfas de cigarrinha, que se alimentam das raízes removendo água e nutrientes, resultando em estresse hídrico que predispõem as plantas hospedeiras à ocorrência de rachaduras e deterioração fisiológica, além de, aumentar a vulnerabilidade à invasão por

patógenos e pragas secundárias. Apesar de em menor gravidade as cigarrinhas adultas também causam danos foliares enfraquecendo ainda mais as plantas (GARCIA et al., 2006). O uso de pesticidas químicos para controle de cigarrinhas em campos colhidos mecanicamente é caro e difícil de implementar devido ao crescimento aéreo denso da cultura. Além disso, as preocupações sobre os efeitos colaterais dos pesticidas na saúde humana, animal e saúde ambiental têm motivado a busca de estratégias mais compatíveis com o ambiente para o controle desses insetos, neste sentido a utilização de isolados de *Metarhizium* tem sido amplamente investigada.

Apesar do emprego amplo de *Metarhizium* para o controle das cigarrinhas, o conhecimento sobre a diversidade, distribuição e ecologia das espécies de *Metarhizium* nos diversos ambientes agrícolas e naturais do Brasil é incipiente. A maioria dos isolados mais antigos do entomopatógeno utilizados tradicionalmente em pesquisas e/ou comercializados como bioinseticidas foram identificados apenas com base em critérios morfológicos, embora a identificação precisa das nove espécies atualmente reconhecidas do complexo *M. anisopliae* s.l. requer o uso de ferramentas moleculares (BISCHOFF et al., 2009). Até o momento, em poucos estudos com isolados brasileiros do gênero *Metarhizium*, obtidos a partir de insetos ou micoinseticidas comerciais foram feitas identificações utilizando métodos moleculares de acordo com a definição atual das espécies do complexo.

Tigano-Milani et al. (1995) foram uns dos primeiros a empregar métodos moleculares para caracterizar isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum*. A técnica utilizada foi a de primers arbitrários PCR (AP-PCR/RAPD) para avaliar a diversidade genética entre os isolados obtidos a partir de insetos e amostras de solo, no entanto a atribuição taxonômica destes isolados foi baseada em critérios morfológicos, que conhecidamente não são suficiente para uma identificação específica. A taxonomia do complexo *M. anisopliae* foi posteriormente revista com base em uma filogenia nuclear multilocus (BISCHOFF et al., 2009) e a região 5' do gene para o fator de alongamento da tradução (5'-TEF) demonstrou ser o melhor locus para a identificação molecular desta espécie. Usando essa abordagem, cinco espécies de *Metarhizium* foram identificadas no Brasil, incluindo *M. anisopliae* ss, *M. flavoviride* var. *pemphigum*, *M. lepidiotae*, *M. pingshaense* e *M. robertsii* (LOPES et al., 2013a, 2013b; ROCHA et al., 2012; HUMBER, 2013). Rocha et al. (2012) relataram uma predominância da espécie *M.*

anisopliae s.l (BISCHOFF et al., 2009) isolada a partir de amostras de solo da região do Central do Brasil (Cerrado). Entretanto a maioria dos haplótipos caracterizado por Rocha et al. (2012) aparentam ser uma linhagem irmã de *M. anisopliae* s.l. De qualquer forma ainda não se sabe se estes novos haplótipos representam uma nova espécie dentro do complexo e para tal conhecimento faz-se necessário uma investigação adicional. Além disso, ainda não é certo que a espécie *M. anisopliae* s.l também predomina em outros biomas e agroecossistemas brasileiros.

No presente estudo realizou-se uma análise filogenética baseada em caracteres moleculares de 96 isolados brasileiros de *Metarhizium* que incluem: fungos obtidos a partir de: 1) solo e cigarrinha isolados de canaviais, assim como isolados utilizados no controle biológico da cigarrinha, 2) isolados a partir de diferentes espécies de insetos e locais em todo o Brasil. Os principais objetivos deste estudo foram determinar quais espécies de *Metarhizium* estão associados a agricultura canavieira, particularmente aquelas que são patógenos de cigarrinhas, e avaliar a sua relação com a comunidade mais ampla de *Metarhizium* pelo Brasil. Os locos do DNA nuclear analisados incluíram a região 5' contida no fator de alongamento da tradução 1 alfa (5'-TEF) (BISCHOFF et al., 2009) e as regiões espaçadoras intergênicas do DNA nuclear MzIGS3 e MzFG543igs (KEPLER; REHNER, 2013). Estes últimos marcadores foram empregados para permitir uma delimitação mais robusta das espécies por análise multilocus e consequentemente a reconstrução filogenética do complexo *M. anisopliae*. Juntos, os dados provenientes do sequenciamento e análise das regiões 5'-TEF, MzIGS3 e MzFG543igs contribuirão para auxiliar nos estudos de identificação e caracterização de *Metarhizium* em habitats naturais e agrícolas de todo o Brasil e países vizinhos na América do Sul.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Origem dos isolados

A partir da Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” foram recuperados 53 isolados depositados com a denominação de *M. anisopliae* desde a década de 80. Outros 43 isolados foram obtidos de amostras de solos coletados em diferentes biomas

brasileiros, incluindo o Cerrado, Caatinga, Pampa e Amazônia, todos coletados em 2012 como atividade do Projeto SISBIOTA. Os fungos provenientes do banco estavam armazenados de três formas: cultura fúngica em óleo mineral mantida em geladeira a 10 °C; conídios puros mantidos em freezer a -20°C; cultura fúngica liofilizada mantida em freezer a -40 °C. Os fungos recentes obtidos a partir das amostras de solo foram isolados utilizando simultaneamente o meio semi-seletivo CTC1, desenvolvido por Fernandes et al. 2010, meio seletivo PDAY com dodine (RANGEL et al., 2010) e “insect bait” (*Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor*) adaptado de Zimmermann (1986) e Meyling (2007). Os acessos recuperados, assim como os fungos isolados de solo dentro do Projeto SISBIOTA encontram-se especificados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Descrição dos isolados de *Metarhizium* spp. utilizados neste estudo, atualmente depositados na Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil (continua)

Espécie	Código do isolado	Denominação tradicional	Data de coleta	Local de coleta	Origem
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 26	PL26	24-jun-01	desconhecido	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 43	PL43	5-ago-81	Fleixeiras del Estado-AL	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 49	PL49	5-ago-81	desconhecido	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 319		19-nov-84	Goânia-PE	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 333	IBCB-333	1-jun-99	Valparaíso-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 334	IBCB-334	1-jun-99	Novo Horizonte-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 353	IBCB-353	1-jun-99	Valparaíso-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 374	IBCB-374	1-jun-99	Sertãozinho-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 385	IBCB-385	1-jun-99	Sertãozinho-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 391	IBCB-391	1-ago-99	Tabapuã-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 412		22-out-85	Iguapé-SP	Blattaria: Blaberidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 425	IBCB-425	1-jan-00	Iporanga-SP	Solo
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 798		11-jun-88	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 816		1-set-88	Piracicaba-SP	Solo
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 818		1-set-88	Piracicaba-SP	Solo

Tabela 3.1 - Descrição dos isolados de *Metarhizium* spp. utilizados neste estudo, atualmente depositados na Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil (continuação)

Espécie	Código do isolado	Denominação tradicional	Data de coleta	Local de coleta	Origem
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 860		20-fev-89	Piracicaba-SP	Coleoptera: Scarabaeidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 865		14-mar-89	Goiânia-GO	Hemiptera
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 866		14-mar-89	Goiânia-GO	Hymenoptera: Formicidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 867		14-mar-89	Goiânia-GO	Hymenoptera: Formicidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 935		10-mai-90	Itabuna-BA	Lepidoptera: Crambidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 959		20-jun-90	Rio de Janeiro-RJ	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1022		5-set-91	Piracicaba-SP	Hymenoptera: Tiphidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1037		20-mar-92	Porto Alegre-RS	Hymenoptera: Formicidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1076		12-jun-92	Arapongas-PR	Solo
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1097		1-set-92	Lavras-MG	Solo
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1104		12-ago-92	São João do Piauí-PI	Solo
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1116		31-mar-93	Piracicaba -SP	Coleoptera: Scarabaeidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1175		10-out-95	Córrego Rico-SP	Solo
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1184		18-jun-96	Corumbá-MS	Solo
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1189		18-jun-96	Corumbá-MS	Solo

Tabela 3.1 - Descrição dos isolados de *Metarhizium* spp. utilizados neste estudo, atualmente depositados na Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil (continuação)

Espécie	Código do isolado	Denominação tradicional	Data de coleta	Local de coleta	Origem
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1204		15-set-96	Piracicaba-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1247		14-abr-99	Turvinia-SP	Solo
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1256		8-set-99	Concórdia-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1387		21-set-06	Jaú-SP	Hymenoptera: Formicidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1391		8-fev-07	Jaú-SP	Hymenoptera: Formicidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1405		5-dez-07	Palmas-TO	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1444		1-out-10	Nova Europa-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1449	CTC	6-jul-11	Araporã-MG	Coleoptera: Curculionidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1452		1-dez-80	Água Comprida-MG	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1463		18-abr-12	Coruripe-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1464		18-abr-12	Coruripe-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1473		17-fev-12	Piracicaba-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1592		1-jan-12	Belém-PA	Solo de floresta nativa
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1593		1-jan-12	Belém-PA	Solo de cultivo de açaí
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1594		1-jan-12	Belém-PA	Solo de cultivo de açaí

Tabela 3.1 - Descrição dos isolados de *Metarhizium* spp. utilizados neste estudo, atualmente depositados na Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil (continuação)

Espécie	Código do isolado	Denominação tradicional	Data de coleta	Local de coleta	Origem
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1595	F8	13-dez-99	Iracemópolis-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1596	F28	desconhecido	Pradópolis-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1597	F24	17-nov-00	Ourinhos-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1598	F20	9-out-00	Serrana-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1599	F18	7-jun-00	Jaboticabal-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1600	F15	13-abr-00	Motuca-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1601	F118	26-mar-08	Boa Vista-GO	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1602	F111	23-nov-06	Nova Europa-SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1603	F109	desconhecido	SP	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1604		desconhecido	*	Biotech G, Biotech® Controle Biológico
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1605		desconhecido	*	Metarriz Biocontrol®, Biocontrol
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1606		12-mar-12	Sinop-MT	Solo de floresta nativa
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1607		12-mar-12	Sinop-MT	Solo de floresta nativa
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1610		6-mar-12	Sinop-MT	Solo de bananal
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1611		6-mar-12	Sinop-MT	Solo de bananal

Tabela 3.1 - Descrição dos isolados de *Metarhizium* spp. utilizados neste estudo, atualmente depositados na Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil (continuação)

Espécie	Código do isolado	Denominação tradicional	Data de coleta	Local de coleta	Origem
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1612		6-mar-12	Sinop-MT	Solo de bananal
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1613		6-mar-12	Sinop-MT	Solo de bananal
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1614		12-mar-12	Sinop-MT	Solo de floresta nativa
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1615		12-mar-12	Sinop-MT	Solo de floresta nativa
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1616		20-mar-12	Sinop-MT	Solo de milharal
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1617		21-mar-12	Delmiro Gouveia-AL	Solo de floresta nativa
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1640	E6	1-abr-81	PE	Lepidoptera: Crambidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1641	E9	5-mai-81	Boca da Mata-AL	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1642	RJC	desconhecido	*	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1643	RJD	desconhecido	Variação morfológica do isolado ESALQ 1642	*
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 1644	LEA	desconhecido	Iturama-MG	Hemiptera: Cercopidae
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1426		1-dez-07	Londrina-PR	Solo de cultivo de soja
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1618		5-mar-12	Bagé-RS	Solo de floresta nativa
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1619		5-mar-12	Bagé-RS	Solo de floresta nativa
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1620		5-mar-12	Bagé-RS	Solo de floresta nativa

Tabela 3.1 - Descrição dos isolados de *Metarhizium* spp. utilizados neste estudo, atualmente depositados na Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil (continuação)

Espécie	Código do isolado	Denominação tradicional	Data de coleta	Local de coleta	Origem
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1621		20-mar-12	Sinop-MT	Solo de milharal
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1622		20-mar-12	Sinop-MT	Solo de milharal
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1623		27-mar-12	Rio Verde-GO	Solo de milharal
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1624		27-mar-12	Rio Verde-GO	Solo de milharal
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1625		27-mar-12	Rio Verde-GO	Solo de milharal
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1626		28-mar-12	Rio Verde-GO	Solo de canavial
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1627		28-mar-12	Rio Verde-GO	Solo de canavial
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1628		28-mar-12	Rio Verde-GO	Solo de canavial
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1629		20-mar-12	Sinop-MT	Solo de milharal
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1630		5-mar-12	Bagé-RS	Solo de floresta nativa
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1631		5-mar-12	Bagé-RS	Solo de floresta nativa
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1632		5-mar-12	Bagé-RS	Solo de floresta nativa
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1633		20-mar-12	Sinop-MT	Solo de milharal
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1634		21-mar-12	Delmiro Gouveia-AL	Solo de floresta nativa
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1635		21-mar-12	Delmiro Gouveia-AL	Solo de floresta nativa

Tabela 3.1 - Descrição dos isolados de *Metarhizium* spp. utilizados neste estudo, atualmente depositados na Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil (conclusão)

Espécie	Código do isolado	Denominação tradicional	Data de coleta	Local de coleta	Origem
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 1374		7-nov-05	GO	Hemiptera: Cydnidae
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 1608		27-mar-12	Rio Verde-GO	Solo de floresta nativa
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 1637		27-mar-12	Rio Verde-GO	Solo de floresta nativa
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 1638		27-mar-12	Rio Verde-GO	Solo de floresta nativa
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 1639		27-mar-12	Rio Verde-GO	Solo de floresta nativa
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 2	ESALQ 1636		12-mar-12	Sinop-MT	Solo de floresta nativa

3.2.2 Avaliações morfológicas

Os isolados da Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP foram caracterizados morfolologicamente. Aproximadamente 50 conídios de cada isolado do complexo *M. anisopliae* foram transferidos para placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar - BDA (Potato Dextrose Agar, Difco[™], USA). O inóculo foi espalhado com auxílio de uma alça de Drigalsky e as placas mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand), a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 14 horas de fotofase por 36 horas. Após a germinação dos conídios quando foi possível observar o crescimento hifal, cada conídio separadamente foi transferido para uma placa de Petri (6 cm) contendo 10 mL de meio de cultura Batata Dextrose Ágar - BDA (Potato Dextrose Agar, Difco[™], USA). As colônias monospóricas de cada isolado foram destinadas as avaliações morfológicas.

As avaliações referentes ao crescimento da colônia foram realizadas aos 3, 5, 7 e 10 dias após a inoculação dos conídios. As avaliações referentes à morfologia das colônias foram feitas a partir de colônias puras com 10 dias de idade e as avaliações referentes aos conidióforos e conídios foram feitas a partir de colônias puras com 5 dias de idade. Para definição da cor da colônia foi atribuído um código de cor de acordo com o catalogo Pantone[®] Formula Guide (PANTONE[®], 2009), além de ser registrada uma fotografia representativa da colônia monospórica de cada isolado. Os conídios provenientes das culturas foram suspensos em água destilada estéril mais espalhante adesivo Tween 80[®] a 0,05%, e posteriormente foram montadas lâminas e as medidas de 20 conídios foram determinadas usando um microscópio Carl Zeiss (modelo Axioskop 20) equipado com câmera digital científica "AxioCam ERc 5s", com a qual foi feita a captura das imagens. A medição das estruturas fúngicas foi realizada utilizando o software Axiovision Rel. 4.8 (Carl Zeiss).

3.2.3 Análise molecular

3.2.3.1 Extração de DNA

Os conídios dos fungos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar - BDA (Potato Dextrose Agar, DifcoTM, USA). As placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D. (Biological Oxygen Demand) por 7 dias, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase. Três círculos com um centímetro de diâmetro foram recortados de cada colônia e transferidos para erlenmeyers contendo caldo Sabouraud (SDY: $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona bacteriológica, 10 g.L^{-1} de dextrose, $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura), com a finalidade de se obter o micélio. Os erlenmeyers foram mantidos em uma mesa agitadora orbital (modelo: MA 140 CFT, Marconi) programada para 125 rotações por minuto, a 25°C . Após 7 dias de cultivo, o micélio foi removido do caldo e coletado por filtragem a vácuo, secado e armazenado em placas de Petri plásticas fechadas com papel filme e mantidos em freezer (-20°C) para posterior realização da extração de DNA.

Para a extração de DNA dos isolados empregou-se procedimento modificado de Sokolovsky et al. (1990), o micélio foi macerado em nitrogênio líquido até a obtenção de pó. Aproximadamente 200 mg de micélio macerado foram transferidos para micro tubos Eppendorf[®] com capacidade para 1,5 mL contendo 600 μL de tampão de lise (0,2 M Tris-HCL pH 8,0; 0,25 M NaCL; 0,025 M EDTA; 1% SDS). A suspensão foi agitada e logo em seguida adicionou-se 600 μL de fenol:clorofórmio (1:1 v/v), após nova agitação a suspensão foi centrifugada ($12000 \times g$ por 15 minutos) para separar a fase aquosa e as partículas. A partir da fase aquosa uma alíquota de 500 μL de solução contendo DNA foi transferida para um novo microtubo e posteriormente foi misturada com volume igual de clorofórmio e novamente centrifugada ($12000 \times g$ por 5 minutos). À fase aquosa foi adicionado 1 volume de isopropanol, sendo a solução agitada e posteriormente juntou-se 0,1 volume de acetato de potássio. A solução foi centrifugada ($12000 \times g$ por 5 minutos) e o sobrenadante descartado. O pellet contendo DNA foi lavado com 700 μL de etanol 70%, centrifugado ($12000 \times g$ por 8 minutos) e o sobrenadante descartado. Após secar, o DNA foi diluído em 25 μL de Tris-HCL 10 mM e armazenado em freezer a -80°C . A verificação da integridade e quantidade do DNA obtido na extração foi feita em eletroforese de gel de agarose 1%. A quantificação do material extraído foi feita

em comparação à intensidade das bandas do marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™).

3.2.3.2 PCR e sequenciamento

Os locos do DNA nuclear analisados incluem: região 5' contida no fator de alongamento da tradução 1 alfa (5'-TEF) (BISCHOFF et al., 2009) e as regiões espaçadoras intergênicas do DNA nuclear MzIGS3 e MzFG543igs (KEPLER; REHNER, 2013).

Os primers utilizados para a amplificação da região 5' TEF foram: EF1T (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e EF2T (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT) de acordo com Bischoff et al. (2009). A reação de amplificação foi realizada num volume de 50 µL, contendo 5 µL de PCR buffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 50 mM KCl, 1,5–2,0 mM MgCl₂), 1 µL de dNTP mix (1,25 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, e dTTP), 15 pmol de cada um dos primers de amplificação, 0,3 µL de Taq polimerase e aproximadamente 20 ng de DNA genômico. As amostras foram amplificadas em termociclador MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) nas seguintes condições: aquecimento inicial a 94 °C por 2 min; 36 ciclos de amplificação, cada um com 30s de desnaturação a 94 °C, anelamento a 56 °C por 30s, e extensão por 1 min a 72 °C; concluindo com refrigeração a 8 °C.

A reação de amplificação para as regiões MzFG543igs e MzIGS3 seguiram o procedimento descrito por Kepler e Rehner (2013) usando os seguintes pares de primers: MzIGS3_1F (5'-CGTGGCTCCTGACCATGGTTGC) × MzIGS3_4R (5'-GCGGGGGAGCCGACTTGGA) e MzFG543_2F (5'-TCTCTACAACCGTACCCGACA) × MzFG543_6R (5'-GATAGCTCGCCTTCTGCCTTG), respectivamente. Nos casos em que a combinação destes pares de primers não proporcionou amplificação, os primers MzIGS3_2F (5'-GTGGCTCCTGACCATGGTTGC) × MzIGS3_4R, MzFG543_1F (5'-ATTCATTCAGAACGCCTCCAA) × MzFG543_6R, MzFG543_1F × MzFG543_5R (5'-GTTGGTTGCGACTGAGAATCC) ou MzFG543_2F × MzFG543_5R foram usados.

A reação de PCR foi conduzida num volume de 12,5 µL, contendo 10X ExTaq PCR Buffer (TaKara), 0,25 mM de dNTP mix (TaKara), 1,0µM de cada um dos

primers, 1,25 unidades de TaKaRa Ex Taq™ DNA Polymerase (5U/μl) e aproximadamente 20 ng de DNA genômico.

As amostras foram amplificadas em termociclador Multi-Bay™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Para amplificação da região MzIGS3 empregou-se o protocolo de “touchdown” iniciando com a desnaturação a 95°C por 2 min, seguida de 10 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 62–52°C por 30 s decrescendo em 1°C por ciclo, extensão de 72°C por 1 min, seguido de 36 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 52°C por 30 s, extensão a 72°C por 1 min, finalizando com extensão a 72°C por 15 min. A reação de PCR para a região MzFG543igs foi conduzida sob condições de ciclagem padrão: incluindo a desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 68°C por 30 s, extensão a 72°C por 1 min e finalizando com extensão a 72°C por 15 min.

A qualidade e o tamanho do produto final da PCR foi analisado em gel de agarose 1% e preparado para sequenciamento sendo purificado com o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega) ou digestão enzimática com o Kit Illustra™ ExoStar (GE Healthcare, USA) de acordo com as instruções dos fabricantes.

O sequenciamento dos amplicons foi conduzido com Amplicon BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit conforme instruções do fabricante.

A região 5'TEF foi sequenciada usando os primers EF1T (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC) x EF2T (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT) enquanto no sequenciamento das regiões MzIGS3 e MzFG543igs foram utilizados os primers MzIGS3_3F (5'-TGGTRTAACCRGCGAGACA), MzIGS3_2F (5'-GTGGCTCCTGACCATGGTTGC), MzIGS3_5R (5'-CCGTCCSGCATAGCCYTCA), MzFG543_2F (5'-TCTCTACAACCGTACCC-GACA) e MzFG543_5R (5'-GTTGGTTGCGACTGAGAATCC).

As reações de sequenciamento foram precipitadas com etanol e resuspendidas em Hi-Di formamida e sequenciadas utilizando o ABI 3730 DNA Analyser com a tecnologia Applied Biosystems (Applied Biosystems).

3.2.3.3 Alinhamento múltiplo de sequências e análises filogenéticas

As sequências foram editadas e alinhadas utilizando os programas CodonCodeAligner 3.7.1 (CodonCode, Dedham, MA) ou Sequencher 5.0 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, Michigan). O alinhamento múltiplo das sequências foi construído utilizando o software MAFFT version 7 webserver (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) com a opção de alinhamento FFT-NS-i.

Foram construídas matrizes de dados das seguintes regiões nucleares para três análises filogenéticas: 1) 5'-TEF para avaliar a diversidade dos 96 isolados relatadas neste estudo e comparados a diversidade encontrada por Rocha et al. (2012) em uma recente pesquisa filogenética de *Metarhizium* isolados de solo no Cerrado brasileiro, 2) sequências parciais 3' MzIGS3 para avaliar a sensibilidade deste marcador contra 5'- TEF e 3) uma matriz combinada de sequências completas de MzIGS3 e MzFG543 representando cada ramo terminal detectado anteriormente nos levantamentos de diversidade das sequências de 5'- TEF e MzIGS3. Cada um dos conjuntos de dados incluiu nove sequências de isolados considerados “ex-type” ou de isolados de referência taxonomicamente autenticados para as sete espécies do complexo *M. anisopliae* atualmente reconhecidas (BISCHOFF et al., 2009), incluindo *M. anisopliae* , *M. brunneum* , *M. guizhouense* , *M. lepidiotae* , *M. majus*, *M. pingshaense* e *M. robertsii*. Todos os conjuntos de dados foram analisados sob máxima verossimilhança com RAxML (STAMATAKIS, 2006) com a implementação de parâmetros do modelo GTRGAMMA e mil repetições de bootstrap (STAMATAKIS et al., 2008).

A amplificação e sequenciamento das regiões espaçadoras intergênicas do DNA nuclear MzIGS3 e MzFG543igs, assim como as análises filogenéticas foram realizadas no Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville Agricultural Research Center sob supervisão do Dr. Stephen A. Rehner.

3.3 Resultados

3.3.1 Caracterização morfológica

A Figura 3.1 mostra a grande diversidade apresentada pelas colônias dos isolados de *Metarhizium* spp. Cada isolado do complexo *M. anisopliae* depositado na Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP até o ano de 2012 teve sua morfologia caracterizada, além de ser registrada uma fotografia representativa da colônia monospórica de cada isolado (Figura 3.1).

Como pode ser verificado na Figura 3.1 e Tabela 3.2 alguns isolados tiveram mais de uma colônia escolhida para serem caracterizadas. Isso foi feito, pois cada isolado derivou 10 colônias puras e não raro essas colônias apresentaram diferentes características para um mesmo isolado. Por exemplo, o isolado com denominação tradicional F28 apresentou colônias de coloração amarela (F28A) e colônias verdes (F28V) e o mesmo ocorreu para os isolados F109 e F118. Já o isolado F18 deu origem a colônias puros com a presença de setor (F18CS) e sem a presença de setor (F18SS) e o isolado ESALQ 798 apresentou colônias com (798CA) e sem (798SA) a presença de um halo branco de micélio.

De forma geral, as colônias apresentaram coloração em vários tons de verde, variando de verde acinzentado a verde escuro (oliva). O isolado PL26 e F118A apresentaram coloração amarelada, esta também foi observada no setor formado pelo isolado F18 e no halo central do fungo F111. O crescimento micelial denso e conidiógenese escassa foram observados nos isolados PL26, F28A, F18CS, F118, F109A. *M. robertsii*, isolado ESALQ-1426, apresentou grande crescimento micelial mesmo após a produção de conídios. As colônias, de forma geral, apresentaram forma circular, porém observou-se a formação de setores nos fungos ESALQ1204 e F18A. É possível observar que existe variação entre as colônias puras (oriundas de um único conídio) de um mesmo isolado, o que pode ser observado para os depósitos denominados F118, F18, F109, F8 e ESALQ-798. Os isolados com denominação tradicional (Tabela 3.1) iniciados com a letra F são provenientes da coleção do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) e para esses isolados utilizados rotineiramente nas usinas de cana-de-açúcar é comum a ocorrência de misturas de isolados, e provavelmente por isso estes apresentem esse tipo de variação.

O comprimento médio dos conídios variou de 5,44 μm para IBCB425 a 7,94 μm para E9, enquanto que a largura variou de 2,22 μm para ESALQ319 a 3,36 para E9 (Tabela 3.2). A relação entre o comprimento e a largura dos conídios foi de 1,98 para F28A, caracterizando conídios mais arredondados a 2,99 para ESALQ798 SH (sem halo), conídios estes mais alongados. A morfologia dos conídios e fiálides não permitiu a separação das espécies.

Figura 3.1 - Colônias monospóricas de isolados do gênero *Metarhizium* depositado na Coleção de Entomopatógenos "Prof. Sérgio Batista Alves". A Figura mostra a denominação tradicional dos isolados conforme especificado na Tabela 3.1 (continua)

Figura 3.1 - Colônias monospóricas de isolados do gênero *Metarhizium* depositado na Coleção de Entomopatógenos "Prof. Sérgio Batista Alves". A Figura mostra a denominação tradicional dos isolados conforme especificado na Tabela 3.1 (continuação)

Figura 3.1 - Colônias monospóricas de isolados do gênero *Metarhizium* depositado na Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves”. A Figura mostra a denominação tradicional dos isolados conforme especificado na Tabela 3.1 (conclusão)

Tabela 3.2 - Caracterização dos isolados do gênero *Metarhizium* depositados na Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” (continua)

Isolado	Cor da colônia	Crescimento das colônias ± EP (diâmetro em cm)				Dimensões dos conídios aos 5 dias ± EP (µm)			Dimensão das fiálides ± EP (µm)
		3 dias	5 dias	7 dias	10 dias	Comprimento	Largura	Relação C/L	
ESALQ 319	575U	0,93± 0,01	1,83± 0,01	2,79± 0,05	3,50± 0,03	6,31 ± 0,16	2,22 ± 0,08	2,87 ± 0,06	8,98 ± 0,47
ESALQ 412	5825U	1,16± 0,03	1,97± 0,02	3,03± 0,04	3,96± 0,04	5,49 ± 0,12	2,50 ± 0,07	2,23 ± 0,07	7,96 ± 0,49
ESALQ 798 SA	575U	0,95± 0,01	1,40± 0,03	3,14± 0,05	3,47± 0,23	7,35 ± 0,15	2,48 ± 0,07	2,99 ± 0,08	8,12 ± 0,50
ESALQ 798 CA	5773U	...	-	-	-	7,12 ± 0,20	2,49 ± 0,08	2,90 ± 0,10	8,04 ± 0,44
ESALQ 816	7749U	0,83± 0,01	1,68± 0,01	2,52± 0,01	3,65± 0,03	7,25 ± 0,14	2,64 ± 0,06	2,77 ± 0,06	8,75 ± 0,51
ESALQ 818	7749U	0,78± 0,03	1,54± 0,04	2,35± 0,06	3,64± 0,11	7,11 ± 0,11	2,70 ± 0,07	2,66 ± 0,07	7,57 ± 0,45
ESALQ 860	7750U	0,66± 0,02	1,55± 0,04	2,30± 0,06	3,52± 0,06	6,95 ± 0,10	2,59 ± 0,09	2,76 ± 0,13	9,56 ± 0,55
ESALQ 866	5753U	0,84± 0,02	1,85± 0,07	3,02± 0,03	3,69± 0,03	6,84 ± 0,14	2,48 ± 0,07	2,78 ± 0,07	8,42 ± 0,25
ESALQ 867	7749U	0,84± 0,01	1,75± 0,02	2,52± 0,04	3,91± 0,02	7,23 ± 0,14	2,81 ± 0,06	2,59 ± 0,08	7,15 ± 0,28
ESALQ 935	350U	1,44± 0,02	2,00± 0,00	2,58± 0,11	3,45± 0,08	6,00 ± 0,15	2,61 ± 0,06	2,31 ± 0,06	7,31 ± 0,33
ESALQ 959	618U/5852U	1,03± 0,02	1,93± 0,02	2,66± 0,04	3,65± 0,07	-	-	-	-
ESALQ 1022	7750U	0,80± 0,03	1,65± 0,04	2,52± 0,02	3,90± 0,02	7,04 ± 0,14	2,57 ± 0,05	2,76 ± 0,08	8,68 ± 0,30
ESALQ 1037	378U	1,03± 0,03	1,82± 0,05	2,83± 0,09	3,95± 0,07	5,49 ± 0,12	2,39 ± 0,09	2,35 ± 0,09	7,38 ± 0,36
ESALQ 1076	7768U	0,95± 0,02	1,80± 0,03	2,50± 0,05	3,38± 0,03	-	-	-	-
ESALQ 1097	5763U	0,72± 0,01	1,03± 0,01	2,75± 0,06	3,55± 0,03	-	-	-	-
ESALQ 1104	-	0,90± 0,07	1,82± 0,14	2,66± 0,12	3,76± 0,10	-	-	-	-
ESALQ 1116	378U	0,88± 0,02	1,47± 0,01	2,24± 0,03	3,18± 0,04	5,67 ± 0,14	2,57 ± 0,12	2,29 ± 0,11	6,94 ± 0,19

Tabela 3.2 - Caracterização dos isolados do gênero *Metarhizium* depositados na Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” (continuação)

Isolado	Cor	Crescimento das colônias $\pm$ EP (diâmetro em cm)				Dimensões dos conídios aos 5 dias $\pm$ EP (μ m)			Dimensão das fiálides $\pm$ EP (μ m)
		3 dias	5 dias	7 dias	10 dias	Comprimento	Largura	Relação C/L	
ESALQ 1175	5747U	1,10 $\pm$ 0,02	1,95 $\pm$ 0,06	3,10 $\pm$ 0,04	4,09 $\pm$ 0,05	5,74 $\pm$ 0,17	2,29 $\pm$ 0,06	2,52 $\pm$ 0,08	6,09 $\pm$ 0,20
ESALQ 1184	7749U	0,75 $\pm$ 0,03	1,38 $\pm$ 0,07	2,11 $\pm$ 0,10	2,99 $\pm$ 0,17	7,23 $\pm$ 0,14	2,58 $\pm$ 0,08	2,84 $\pm$ 0,08	8,66 $\pm$ 0,45
ESALQ 1189	7761U	1,07 $\pm$ 0,03	1,33 $\pm$ 0,03	1,86 $\pm$ 0,05	2,90 $\pm$ 0,10	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
ESALQ 1204	5743U	0,78 $\pm$ 0,04	1,53 $\pm$ 0,10	1,90 $\pm$ 0,10	2,61 $\pm$ 0,11	5,78 $\pm$ 0,12	2,65 $\pm$ 0,08	2,23 $\pm$ 0,09	7,67 $\pm$ 0,61
ESALQ 1247	7749U	1,10 $\pm$ 0,02	2,35 $\pm$ 0,02	2,68 $\pm$ 0,02	3,68 $\pm$ 0,02	-	-	-	-
ESALQ 1256		1,00 $\pm$ 0,02	1,86 $\pm$ 0,04	2,81 $\pm$ 0,03	3,88 $\pm$ 0,04	-	-	-	-
ESALQ 1374	5753U	1,34 $\pm$ 0,01	2,56 $\pm$ 0,01	3,43 $\pm$ 0,06	4,26 $\pm$ 0,04	-	-	-	-
ESALQ 1387	575U	0,80 $\pm$ 0,02	1,55 $\pm$ 0,06	2,40 $\pm$ 0,04	3,50 $\pm$ 0,04	6,29 $\pm$ 0,13	2,80 $\pm$ 0,07	2,28 $\pm$ 0,09	8,05 $\pm$ 0,37
ESALQ 1391	5763U	1,57 $\pm$ 0,02	1,95 $\pm$ 0,02	2,94 $\pm$ 0,02	4,10 $\pm$ 0,04	-	-	-	-
ESALQ 1405	7749U	1,10 $\pm$ 0,02	2,35 $\pm$ 0,01	2,62 $\pm$ 0,02	3,63 $\pm$ 0,03	-	-	-	-
ESALQ 1426	7749U	1,68 $\pm$ 0,03	2,77 $\pm$ 0,03	3,91 $\pm$ 0,04	4,92 $\pm$ 0,03	6,45 $\pm$ 0,14	3,01 $\pm$ 0,08	2,18 $\pm$ 0,08	7,33 $\pm$ 0,28
ESALQ 1444	7768U	1,01 $\pm$ 0,02	1,93 $\pm$ 0,03	2,67 $\pm$ 0,07	3,70 $\pm$ 0,04	-	-	-	-
CTC	7749U	0,77 $\pm$ 0,02	1,60 $\pm$ 0,01	2,47 $\pm$ 0,03	3,68 $\pm$ 0,08	7,23 $\pm$ 0,18	2,78 $\pm$ 0,10	2,66 $\pm$ 0,09	8,10 $\pm$ 0,39
IBCB 385	5753U	0,91 $\pm$ 0,02	1,27 $\pm$ 0,05	3,07 $\pm$ 0,10	3,80 $\pm$ 0,03	6,29 $\pm$ 0,19	2,68 $\pm$ 0,10	2,40 $\pm$ 0,09	8,22 $\pm$ 0,25
BIOCONTROL	7749U	0,67 $\pm$ 0,03	1,43 $\pm$ 0,03	2,22 $\pm$ 0,04	3,52 $\pm$ 0,04	6,77 $\pm$ 0,13	2,67 $\pm$ 0,09	2,58 $\pm$ 0,09	7,64 $\pm$ 0,30
BIOTECH	7747U	0,90 $\pm$ 0,01	1,69 $\pm$ 0,05	2,46 $\pm$ 0,08	3,55 $\pm$ 0,27	7,19 $\pm$ 0,15	3,09 $\pm$ 0,10	2,38 $\pm$ 0,10	7,85 $\pm$ 0,46
IBCB 333	-	1,47 $\pm$ 0,04	2,02 $\pm$ 0,02	2,70 $\pm$ 0,08	3,87 $\pm$ 0,01	-	-	-	-
IBCB 353	-	1,25 $\pm$ 0,01	1,67 $\pm$ 0,03	2,41 $\pm$ 0,05	3,28 $\pm$ 0,10	-	-	-	-
IBCB 374	-	1,50 $\pm$ 0,05	2,00 $\pm$ 0,07	2,63 $\pm$ 0,08	3,65 $\pm$ 0,12	-	-	-	-

Tabela 3.2 - Caracterização dos isolados do gênero *Metarhizium* depositados na Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” (conclusão)

Isolado	Cor	Crescimento das colônias $\pm$ EP (diâmetro em cm)				Dimensões dos conídios aos 5 dias $\pm$ EP (μ m)			Dimensão das fiálides $\pm$ EP (μ m)
		3 dias	5 dias	7 dias	10 dias	Comprimento	Largura	Relação C/L	
IBCB 391	371U	1,00 $\pm$ 0,00	1,53 $\pm$ 0,02	2,90 $\pm$ 0,03	3,41 $\pm$ 0,02	6,16 $\pm$ 0,10	2,62 $\pm$ 0,10	2,42 $\pm$ 0,10	7,93 $\pm$ 0,26
IBCB 425	5757U	1,39 $\pm$ 0,03	2,27 $\pm$ 0,04	3,39 $\pm$ 0,07	4,31 $\pm$ 0,07	5,44 $\pm$ 0,11	2,53 $\pm$ 0,09	2,20 $\pm$ 0,08	7,54 $\pm$ 0,62
E6	5763U	0,86 $\pm$ 0,0	1,21 $\pm$ 0,06	3,54 $\pm$ 0,12	4,28 $\pm$ 0,11	6,84 $\pm$ 0,12	2,55 $\pm$ 0,06	2,70 $\pm$ 0,06	7,93 $\pm$ 0,38
E9	5747U	1,27 $\pm$ 0,01	2,07 $\pm$ 0,01	3,19 $\pm$ 0,02	4,15 $\pm$ 0,04	7,94 $\pm$ 0,19	3,36 $\pm$ 0,18	2,47 $\pm$ 0,13	7,13 $\pm$ 0,35
PL43	5753U	1,13 $\pm$ 0,03	1,99 $\pm$ 0,02	3,06 $\pm$ 0,05	4,06 $\pm$ 0,07	5,80 $\pm$ 0,15	2,51 $\pm$ 0,11	2,36 $\pm$ 0,09	8,00 $\pm$ 0,67
PL49	7753U/ 7768U	1,00 $\pm$ 0,02	1,90 $\pm$ 0,03	2,69 $\pm$ 0,03	3,67 $\pm$ 0,03	-	-	-	-
RJC	-	1,16 $\pm$ 0,01	1,97 $\pm$ 0,01	2,84 $\pm$ 0,03	3,90 $\pm$ 0,02	-	-	-	-
RJD	-	1,06 $\pm$ 0,03	2,00 $\pm$ 0,04	2,90 $\pm$ 0,04	3,98 $\pm$ 0,01	-	-	-	-
F8	-	1,45 $\pm$ 0,03	2,30 $\pm$ 0,02	3,06 $\pm$ 0,04	3,58 $\pm$ 0,28	-	-	-	-
F15	-	1,17 $\pm$ 0,02	1,93 $\pm$ 0,02	2,64 $\pm$ 0,02	3,60 $\pm$ 0,03	-	-	-	-
F18	7768U	1,12 $\pm$ 0,04	2,31 $\pm$ 0,06	2,61 $\pm$ 0,05	3,51 $\pm$ 0,10	-	-	-	-
F20	575U	0,83 $\pm$ 0,02	1,65 $\pm$ 0,03	2,36 $\pm$ 0,04	3,16 $\pm$ 0,06	6,70 $\pm$ 0,10	2,46 $\pm$ 0,09	2,80 $\pm$ 0,11	8,13 $\pm$ 0,34
F24	-	1,14 $\pm$ 0,04	1,52 $\pm$ 0,04	2,10 $\pm$ 0,03	3,10 $\pm$ 0,03	-	-	-	-
F28 V	5763U	0,40 $\pm$ 0,03	0,91 $\pm$ 0,02	1,68 $\pm$ 0,09	2,11 $\pm$ 0,06	6,46 $\pm$ 0,12	3,29 $\pm$ 0,08	1,98 $\pm$ 0,05	8,12 $\pm$ 0,21
F109 V	-	1,26 $\pm$ 0,02	1,97 $\pm$ 0,04	2,53 $\pm$ 0,05	3,15 $\pm$ 0,06	-	-	-	-
F111	-	1,15 $\pm$ 0,03	1,81 $\pm$ 0,03	2,45 $\pm$ 0,05	3,28 $\pm$ 0,09	-	-	-	-
F118 V	7749U	0,76 $\pm$ 0,02	1,39 $\pm$ 0,03	2,03 $\pm$ 0,13	2,63 $\pm$ 0,12	6,56 $\pm$ 0,18	3,12 $\pm$ 0,24	2,23 $\pm$ 0,10	7,91 $\pm$ 0,29

3.3.2 Diversidade, designação taxonômica e filogenia dos isolados brasileiros de *Metarhizium*

As sequências geradas para a região 5'-TEF revelou uma diversidade total de 10 haplótipos dentre os 96 pesquisados neste estudo e a análise de máxima verossimilhança resultou em sete grupos terminais, sendo que os isolados brasileiros agruparam junto as espécies *M. anisopliae* e *M. robertsii* e deram origem a duas novas linhagens não caracterizadas taxonomicamente, referidas aqui como *Metarhizium* sp. indet. 1 and *Metarhizium* sp. indet. 2 (Figure 3.2). *Metarhizium anisopliae* s.l. (n=71) foi a linhagem predominante, sendo que os isolados formaram um grupo monofilético composto por sequências de três grupos de haplótipos. O primeiro grupo de haplótipo (Mani 2) apresenta sequência idêntica a do isolado referência ARSEF 6347 (n=65), o segundo grupo (Mani 1) corresponde a *M. anisopliae* s.s ARSEF 7487 (n=3) e o terceiro grupo (Mani 3) é formado por um novo haplótipo (n=2). Mani 1 apresenta um haplótipo adicional (ESALQ 1607) que difere da sequência de *M. anisopliae* s.s ARSEF 7487 por apenas 1 par de base (99,9% de similaridade). Somente o clado Mani 2 recebeu valor significativo de bootstrap conforme pode ser observado na Figura 3.2. A diversidade de *M. robertsii* é representada por quatro haplótipos, sendo que dois haplótipos se agrupam juntamente com os isolados referência ARSEF 727 (n=7) e ARSEF 7501 (n=6), e observa-se dois novos haplótipos. Esses grupos de haplótipos foram designados como Mrob 1, Mrob 2, Mrob 3 e Mrob 4, respectivamente. Somente Mrob 1, Mrob 2 e Mrob 3 foram suportados por bootstrap significativo.

Metarhizium sp. indet. 1, linhagem irmã de *M. anisopliae*, apresentou alto valor de bootstrap na formação do ramo e provavelmente representa uma nova espécie. *Metarhizium* sp. indet. 2, sequência única derivada do isolado ESALQ 1636, agrupou-se entre *M. majus* e *M. guizhouense*, representados aqui pela sequência dos seus respectivos holótipos. Porém, devido ao fato de ser uma sequência divergente tanto de *M. majus* quanto de *M. guizhouense*, muito provavelmente representa uma linhagem distinta neste clado.

O conjunto de dados avaliados para a região MzIGS3 incluiu as sequências dos 96 isolados brasileiros e nove sequências de isolados tidos como referência (KEPLER; REHNER, 2013), porém não incluiu dados referentes aos isolados do estudo de Rocha et al. (2012), presentes na análise com 5'-TEF, devido aos

mesmos estarem indisponíveis para estudo. A sequência parcial obtida pelo par de primer MzIGS3_3F e MzIGS3_5R gerou aproximadamente 750 pb e um total de quinze haplótipos foram observados. O segmento gerado na sequência parcial da região MzIGS3 mostra que este locus é realmente mais variável do que o locus do 5'-TEF, conforme indicado por Kepler e Rehner, 2013 e, portanto, potencialmente mais úteis para o diagnóstico de diversidade molecular do complexo de espécies *M. anisopliae*. Por outro lado a filogenia não é resolvida satisfatoriamente, a análise de máxima verossimilhança destes dados é mostrada na Figura 3.3, e ao mesmo tempo em que reforça alguns pontos difere em outros da filogenia 5'-TEF.

A análise de máxima verossimilhança inferida a partir do alinhamento combinado das sequências dos genes 5'-TEF, MzIGS3 e MzFG543igs. provenientes de 30 isolados coletados no Brasil (denominados como ESALQ – haplótipos representativos dos 96 estudados) e de nove isolados de referência taxonomicamente autenticados (denominados como ARSEF) (Figura 3.5) apresentou árvore consistente e com a topologia da árvore resultante da análise com 5'-TEF (Figura 3.2) e apresentou também a mesma topologia resultante da análise combinada de 4 genes realizada por Bischoff et al. (2009).

A análise combinada dos três genes (Figura 3.5) confirmou que tanto a *M. anisopliae* como de *M. robertsii* são grupos monofiléticos com alto suporte de bootstrap para cada nó, 97 e 100% respectivamente. Ambas as espécies incluem múltiplas divisões que correspondem aos haplótipos intra-específicos observados na filogenia baseada na região 5'-TEF (Figura 3.2).

Dentro de *M. anisopliae* os subgrupos Mani1, Mani2, Mani3 receberam significativo suporte de bootstrap na análise combinada, porém o mesmo não ocorre nas análises individuais de cada gene (Figuras 3.3 e 3.5), nas quais apenas Mani 2 é suportado. Além disso, Mani 2 foi subdividido em Mani 2.1 e 2.2, subpartição que foi suportada na análise combinada (Figura 3.5) e na análise com MzIGS3 (Figura 3.3), porém com o mesmo resultado não foi observado na análise com MzFG543igs (3.4). Todos os três locus mostraram Mani 2 como grupo monofilético, mas esse resultado só foi suportado pela análise com MzIGS3. Enquanto que Mani 3 foi resolvido como monofilético nas análises com 5'-TEF e MzIGS3, recebendo suporte para esta condição apenas na análise com MzIGS3.

Ambos os genes 5'-TEF e MzFG543igs apresentaram significativo valor de bootstrap na indicação de *M. robertsii* como grupo monofilético, todavia *M. robertsii*

não é monofilético na análises com MzIGS3. Aliás, MzIGS3 apresenta topologia conflitante, porém com baixo suporte, em relação as demais análises.

Figura 3.2 – Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida do alinhamento das sequências do gene 5'-TEF de 96 isolados coletados no Brasil (denominados como ESALQ), 17 isolados provenientes do estudo de Rocha et al . (2012) (denominados como IP) e nove isolados de referência taxonomicamente autenticados (denominados como ARSEF). Apenas os valores de *bootstrap* (1000 repetições) acima de 70% estão representados nos nós

Figura 3.3 – Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida do alinhamento das sequências do gene MzIGS3. As sequências são provenientes de 30 isolados coletados no Brasil (denominados como ESALQ) e de nove isolados de referência taxonomicamente autenticados (denominados como ARSEF). Apenas os valores de *bootstrap* (1000 repetições) acima de 70% estão representados nos nós

Figura 3.4 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida do alinhamento das sequências do gene MzFG543igs. As sequências são provenientes de 30 isolados coletados no Brasil (denominados como ESALQ) e de nove isolados de referência taxonomicamente autenticados (denominados como ARSEF). Apenas os valores de *bootstrap* (1000 repetições) acima de 70% estão representados nos nós

Figura 3.5 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida a partir do alinhamento combinado das sequências dos genes 5'-TEF, MzIGS3 e MzFG543igs. As sequências são provenientes de 30 isolados coletados no Brasil (denominados como ESALQ) e de nove isolados de referência taxonomicamente autenticados (denominados como ARSEF). Apenas os valores de *bootstrap* (1000 repetições) acima de 70% estão representados nos nós

3.3.3 Associação de *Metarhizium* com habitats e hospedeiros no Brasil

De acordo com as análises da região 5'-TEF dos 96 isolados brasileiros de *Metarhizium* atualmente depositados na Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves”, observou-se a ocorrência de 3 linhagens específicas que incluem *M. anisopliae* s.l., *M. robertsii* s.l. e *M. majus*/*M. guizhouense* (clado MGT segundo

BISCHOFF et al., 2009). A maioria dos isolados (n=71) é membro da linhagem *M. anisopliae*, composta pelas subdivisões Mani1, Mani2 e Mani3. Dentro deste grupo estão inclusos: os isolados provenientes de dois produtos comerciais registrados no Brasil para o controle de cigarrinha sendo um o produto Biotech G[®], produzido pela empresa Biotech Controle Biológico – referido aqui como ESALQ 1604 e Metarriz Biocontrol[®], produzido pela Biocontrol Sistema de Controle Biológico Ltda – referido como ESALQ 1605); outros 5 isolados usados comercialmente (ESALQ 1037, ESALQ 425, ESALQ 1640, ESALQ 1641 e ESALQ 43), porém neste caso os isolados sequenciados tiveram origem na coleção e não dos produtos comerciais; mais nove isolados (ESALQ 1595 a ESALQ 1603) que são rotineiramente produzidos e utilizados por usinas sucroalcooleiras, porém que não são comerciais. Com exceção de três isolados provenientes de amostras de solo coletadas em canaviais, todos os outros isolados (n=33) associados com o sistema de produção de cana-de-açúcar pertencem ao subclado Mani2 de *M. anisopliae*. Inclusive esse número engloba todos os isolados provenientes de Cercopidae.

De fato, com apenas uma exceção (ex., ESALQ 1374, *Metarhizium* sp. indet. 1), todos os isolados provenientes de insetos foram agrupados no subclado Mani 2 (n=46), de forma que os outros isolados pertencentes a *M. anisopliae* s.l., incluindo Mani 1 (n=4), Mani 2 (n=22), Mani 3 (n=2) e *Metarhizium* sp. indet. 1 (n=4) foram provenientes de amostras de solo.

Metarhizium robertsii s.l. foi o segundo grupo em abundância com 19 representantes. Ao considerarmos apenas os isolados provenientes de amostras de solo coletadas em 2012 dentro do Projeto SISBIOTA cerca de 50 % do total analisado foi identificado como *M. robertsii*. De forma intrigante, todos os isolados deste estudo identificados como sendo desta espécie tiveram como origem o solo.

Um isolado único ESALQ 1636, encontrado no solo de floresta nativa no bioma Amazônia foi agrupado no clado MGT foi designado como próximo a *M. majus* e *M. guizhouense*, porém não está associado claramente com nenhuma das duas espécies podendo ser uma nova espécie observada pela primeira vez no Brasil.

Exceto pelo clado Mani 2 amplamente distribuído pelo Brasil e isolado majoritariamente de insetos, os outros grupos tem como origem ecossistemas mais específicos. Mani 2 foi encontrado em todos os 14 estados brasileiros com representantes neste estudo. Enquanto que Mani 3 e Mrob 4 foram compostos apenas por isolados com origem em dois estados cada, ambos dentro do bioma

Amazônia, já Mani 1 tem como procedência dois estados nos biomas Amazônia e Caatinga, Mrob 1 veio de dois estados no Cerrado e Mrob 2 de dois estados na Caatinga e Pampa.

3.4 Discussão

A integração de ferramentas moleculares e análises filogenéticas robustas têm auxiliado a taxonomia e o processo de identificação de espécies acelerando e unificando os estudos de caracterização da diversidade e distribuição de fungos entomopatogênicos no controle biológico (STEINWENDER et al., 2011, NISHI et al., 2011, FISHER et al., 2011, CARRILLO-BENÍTEZ et al., 2013, ROCHA et al., 2012, LOPES et al., 2013).

Neste trabalho são apresentados resultados referentes a uma pesquisa com isolados brasileiros de *Metarhizium* provenientes de insetos e de solo coletados em habitats agrícolas e naturais. Os isolados de *Metarhizium* relacionados ao sistema de produção de cana-de-açúcar receberam atenção especial, devido à necessidade de compreender a ecologia e epidemiologia desse entomopatógeno para o controle da cigarrinha em canaviais brasileiros. O posicionamento filogenético e a identificação taxonômica dos isolados pesquisados foi realizado inicialmente com sequências da região 5'-TEF (BISCHOFF et al., 2009), permitindo assim uma comparação direta com outras pesquisas de caracterização de comunidades de *Metarhizium* já realizados no Brasil e em outras regiões geográficas. Além disso, investigou-se a empregabilidade de dois marcadores intergênicos nucleares, MzIGS3 e MzFG543igs, desenvolvidos especificamente para análise filogenética dentro do complexo *M. anisopliae* s.l. (KEPLER; REHNER, 2013), a fim de avaliar o potencial destes para complementar e ampliar o conhecimento evolutivo obtido com 5'-TEF.

As sequências obtidas com a região 5'-TEF situou os 96 isolados estudados de *Metarhizium* brasileiro entre três linhagens de espécies que incluem *M. anisopliae* s.l., *M. robertsii* s.l. e *M. majus*/*M. guizhouense* (ou seja, clado MGT, conforme classificação de BISCHOFF et al., 2009). A linhagem *M. anisopliae* compreendeu 79,2% de todos os isolados, sendo que 67,7% das sequências totais pertencem ao subclado Mani 2. A maioria dos exemplares que compõe Mani 2 foi isolada de insetos (73%) e a minoria teve como origem o solo (27%). Curiosamente, exceto por

ESALQ 1374, todos os outros isolados de *Metarhizium* provenientes de insetos pertencem ao subclado Mani 2. Considerando a abrangência geográfica, a variedade de habitats e a diversidade de hospedeiros e solos pesquisados os resultados aqui observados sugerem que *M. anisopliae* pode ser a linhagem predominante em insetos terrestres nos diversos biomas brasileiros. Além disso, esta mesma linhagem também foi isolada de solo, demonstrando que o entomopatógeno também está presente neste nicho. Desta forma, *M. anisopliae* com sua aparente predominância no Brasil parece ser um dos principais candidatos para investigações mais detalhadas a fim de elucidar seu papel na regulação de populações de insetos de forma natural ou em programas de controle biológico.

De forma generalizada *M. robertsii* foi exclusivamente isolado de amostras de solo, talvez isso possa indicar a ecologia fundamentalmente subterrânea desta espécie em comparação a *M. anisopliae*, que se originou majoritariamente de cadáveres de insetos terrestres.

Vários estudos demonstram a intrínseca relação entre *M. robertsii* e o ambiente edáfico. *M. robertsii* e espécies relacionadas são biologicamente ativas no solo, onde podem colonizar ativamente e associar-se de forma persistentemente com as raízes das plantas (BIDOCHKA et al., 2001; WYREBECK et al., 2011; SASAN et al., 2012). Além disso, tem sido demonstrado que a expressão gênica de *M. robertsii* responde à presença de exsudados de raízes das plantas, o que indica um padrão de conservação e a regulação positiva dos genes normalmente associados com os carboidratos das plantas, o que sugere interações específicas do fungo com as raízes das plantas (WANG et al., 2005).

Embora *M. robertsii* aparentemente mantenha uma relação trófica com a rizosfera já que também podem melhorar a aptidão da planta, esta espécie também foi isolada a partir de *Phyllophaga capillata* (LOPES et al., 2013b), *G. mellonella* e larvas *T. molitor* (STEINWENDER et al., 2011), usados como iscas para captura de fungos entomopatogênicos do solo, confirmando assim a sua competência ecológica e seu potencial patogênico a insetos. Além disso, já foi observado que *M. robertsii* é capaz de translocar nitrogênio a partir de cadáveres de insetos às plantas por meio da associação com a rizosfera (BEHIE et al., 2012), o que demonstra o seu potencial para modular ambas as capacidades simbióticas simultaneamente.

Os resultados do nosso trabalho indicam que os representantes brasileiros de *M. robertsii*, possivelmente, estão ecologicamente mais restritos ao solo, o que

poderia explicar a nossa incapacidade de isolar essa linhagem diretamente de insetos terrestre. Nenhum *M. robertsii* do Brasil, explorados em estudos de biodiversidade, foi isolado a partir de insetos naturalmente infectados, porém há relatos de que alguns isolados brasileiros provenientes de insetos foram depositados na coleção ARSEF. De qualquer forma, em uma avaliação preliminar da virulência de *M. robertsii* (ESALQ 1426) sobre ninfas de cigarrinha da cana-de-açúcar realizada em laboratório, resultou em 91% de mortalidade (dados não publicados). Enquanto o esforço para compreender a ecologia subterrânea de *Metarhizium* ainda está em seus estágios iniciais, o potencial de *M. robertsii* tanto para promover o crescimento vegetal quanto para fornecer proteção contra insetos pragas que habitam o solo, gera uma demanda de investigação mais aprofundada desta espécie ecologicamente versátil.

O isolado ESALQ 1636, agrupado no clado MGT, representa o primeiro registro desta linhagem na América do Sul. Inglis et al. (1999) relataram anteriormente a ocorrência de *M. majus* no Brasil, no entanto, a identificação teve como base apenas caracteres morfológicos e exige uma nova verificação para validação do dado. Todavia, nosso haplótipo agrupado no clado MGT foi representado por apenas um isolado sendo necessário adicionar mais indivíduos desta espécie em uma amostragem mais ampla dentro do taxon do clado MGT para então determinar a sua posição filogenética e sua designação taxonômica.

O subclado de *M. anisopliae* denominado como Mani 2 foi encontrado em todos os 14 estados brasileiros incluídos neste estudo, cobrindo uma área de 5,4 milhões de km², representando cerca de 63,7% do território do país. Exceto pela ocorrência generalizada de Mani 2, o qual apresenta isolados provenientes de uma grande área do país, a maioria dos outros subclados foram originados a partir de ecossistemas mais específicos. Embora os dados indiquem que estes subclados possuam uma amplitude ecológica mais restrita é provável que ao tomar uma amostra mais ampla seja possível revelar a real distribuição de alguns subtipos que podem abranger uma maior amplitude no país. Esta suposição é apoiada pelo fato de que alguns subclados, tais como Mani 1 e Mrob 2, terem sido encontrados em dois biomas distintos, e distantes um do outro.

Com a disponibilização de ferramentas moleculares auxiliando as análises filogenéticas e a identificação de espécies empregando a região 5'-TEF como marcador diagnóstico de espécies conforme proposto por Bischoff et al. (2009) foi

possível comparar diretamente os resultados de caracterização populacional de *Metarhizium* entre vários estudos recentes. A pesquisa de Rocha et al. (2012) gerou dados relevantes para o presente estudo, os autores usaram a técnica de “insect baiting” com *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) para avaliar a diversidade de *Metarhizium* em solos de habitats nativos do Cerrado brasileiro, no Estado de Goiás. Entre os 63 isolados, provenientes de solo, que tiveram a região 5'-TEF sequenciada, os autores observaram que *M. anisopliae* (n=53) e *M. robertsii* (n=8) foram as principais linhagens recuperadas.

No entanto, é possível observar que a linhagem *M. anisopliae* identificada por Rocha et al. (2012) corresponde a *Metarhizium* sp. indet. 1 que apresenta pouca abundância no presente estudo (Figura 3.2). De forma intrigante, em ambos os estudos, os representantes de *Metarhizium* sp. indet. 1 foram isolados majoritariamente do solo de regiões com plantas nativas no estado de Goiás (Cerrado), talvez indicando uma exigência ecológica deste táxon por ambientes não antropofizados. Além disso, Rocha et al. (2012) relataram um único isolado pertencente ao subclado Mani 1, que também foi de ocorrência secundária no presente estudo (n=4). Todos os representantes de Mani 1 do presente estudo foram coletados na Amazônia a partir de campos de milho e vegetação nativa. De forma contrastante, o subclado Mani 2 predominante neste estudo não foi observado no estudo de Rocha et al. (2012).

Esta diferença de resultados entre os dois estudos é compreensível já que no nosso estudo Mani 2 foi isolado a partir de diversos habitats nativos e/os agroecossistemas, incluindo o Cerrado brasileiro (n=7), o que indica que esta espécie é muito comum no Brasil e, evidentemente, com ampla amplitude ecológica. Em ambos os estudos, *M. robertsii* foi encontrado com menor frequência, no entanto, a diversidade genética apresentada por 5'-TEF foi semelhante em ambas as pesquisas, sendo Mrob 2 o único grupo de haplótipos ausente em Rocha et al. (2008), indicando que em geral as diferenças metodológicas de isolamento utilizadas nos dois estudos foram imparciais para este grupo taxonômico. Em um terceiro estudo realizado no Cerrado do Estado de Goiás por Lopes et al. (2013b), dentre os 13 isolados avaliados, foram relatados apenas um haplótipo de *M. robertsii* e três haplótipos de *M. anisopliae* (Mani 1, Mani 2, Mani 3), estes foram isolados a partir de amostras de solo por “insect baiting” com *Phyllophaga capillata* (Coleoptera: Melolanthidae). Empregando o mesmo tipo de método de isolamento, porém com

Phyllophaga polyphilla (Coleoptera: Melolanthidae) Carrillo-Benítez et al. (2013) isolaram *M. anisopliae* (n=1), *M. robertsii* (n=1) e *M. pingshaense* (n=4) a partir de solos em Guanajuato no México. Embora poucos isolados tenham sido caracterizados no estudo de Carrillo-Benítez et al. (2013) a descoberta de ambos *M. anisopliae* e *M. robertsii* é mais uma prova da ocorrência e predominância dessas duas linhagens na América do Sul e até possivelmente se estendendo para o sul da América do Norte.

Investigações mais detalhadas da ocorrência de *Metarhizium* spp. em maiores áreas com habitats mais diversos e abrangentes poderão em um futuro próximo elucidar a composição de espécies e a variação na estrutura e ecologia das populações em cada região. Além disso, a melhoria no conhecimento da ecologia deste fungo como um entomopatógeno beneficiará a seleção, o manejo e monitoramento desses agentes de controle biológico de insetos.

Estudos de caracterização de *Metarhizium* foram realizados na América do Norte, Europa e Japão revelando diferenças na diversidade de espécies e contraste entre as espécies prevalentes nestas regiões em comparação ao aparente domínio de *M. anisopliae* s.l. na América do Sul. Na América do Norte, um levantamento focado em exemplares de *Metarhizium* associado à rizosfera de diferentes comunidades de plantas em Ontário, no Canadá identificou majoritariamente *M. robertsii* (n = 81), seguido em abundância por *M. brunneum* (n=15) e *M. guizhouense* (n=11) (WYREBEK et al., 2011). Em estudo semelhante Fisher et al. (2011) relataram uma composição similar de espécies incluindo *M. brunneum* (n=48), *M. guizhouense* (n=29), *M. robertsii* (n=17) e *M. flavoviride* var. *pemphigum* (n=3) em Oregon. Na Europa, Steinwender et al. (2011) relataram a ocorrência de *M. brunneum* (n=99), *M. robertsii* (n=13) e *M. majus* (n=4), isolado a partir de solo de campos experimentais na Dinamarca. Nishi et al. (2011) averiguaram amostras de solo provenientes de diversos locais no Japão e relataram a ocorrência do maior número de espécie em um único estudo até o momento, foram identificadas oito espécies, que incluem *M. pingshaense* (n=81), *M. flavoviride* var. *pemphigum* (n=16), *M. robertsii* (n=15), *M. brunneum* (n=14), *M. lepidiotae* (n=8), *M. guizhouense* (n=5), *M. anisopliae* (n=3) e *M. majus* (n=3). Apesar das diferenças nas escalas das áreas amostradas, dos habitats alvos e do método de isolamento entre os estudos, quando analisados conjuntamente eles demonstram que *Metarhizium* ocorre normalmente comunidades multiespecíficas. Apesar da ocorrência de um conjunto comum de

espécies principais, as diferenças na composição taxonômica e abundância das espécies em diferentes locais sugere que é necessária uma amostragem adicional em escala regional para avaliar rigorosamente a estrutura da comunidade de *Metarhizium*.

Assim sendo o principal desafio para o futuro é entender os fatores responsáveis por essa variação e quais as consequências práticas disso em benefício aos programas de controle biológico de insetos.

Referências

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 11, p. 289-382.

BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; SANTOS, A.S.; MACHADO, L.A.; ALVES, S.B. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: Cercopidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 309-314, jul./set. 2003.

BEHIE, S.W.; ZELISKO, P.M.; BIDOCHKA, M.J. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. **Science**, New York, v. 22, n. 6088, p. 1576-1577, June 2012.

BIDOCHKA M.J.; KAMP, A.M.; LAVENDER, T.M.; DEKONING, J.; DE CROOS, J.N.A. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 3, p. 1335-1342, Mar. 2001.

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, Lawrence, v. 101, n. 4, p. 512-530, July/Aug. 2009.

CARRILLO-BENÍTEZ, M.G.; GUZMÁN-FRANCO, A.W.; ALATORRE-ROSAS, R.; ENRÍQUEZ-VARA, J.N. Diversity and genetic population structure of fungal pathogens infecting white grub larvae in agricultural soils. **Microbial Ecology**, New York, v. 65, n. 2, p. 437-449, Feb. 2013.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, H.M.C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J.C.; BURNQUIST, W.L.; CRESTE, S.; CIERO, L.; FERRO, J.A.; FIGUEIRA, A.V.O.; FILGUEIRAS, T.S.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; GUZZO, E.C.; HOFFMANN, H.P.; LANDELL, M.G.A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F.C.; ROMANO, E.; SILVA, W.J.; SILVA FILHO, M.C.; ULIAN, E.C. Sugarcane (*Saccharum x officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, Viçosa, v. 4, n. 1, p. 62-89, Mar. 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2013.** Brasília, 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 12 jun. 2014.

FISHER, J.J.; REHNER, S.A.; BRUCK, D.J. Diversity of rhizosphere associated entomopathogenic fungi of perennial herbs, shrubs and coniferous trees. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 106, n. 2, p. 289-295, Feb. 2011.

GALDOS, M., CAVALETT, O., SEABRA, J.E.A., NOGUEIRA, L.A.H., BONOMI, A. Trends in global warming and human health impacts related to Brazilian sugarcane ethanol production considering black carbon emissions. **Applied Energy**, Lodon, v. 104, p. 576-82, Apr. 2013.

GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P. Biology and fertility life table of *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 4, p. 317-320, July/Aug. 2006.

HUMBER, R.A. **ARS collection of entomopathogenic fungal cultures-ARSEF: *Metarhizium* and allied genera in Clavicipitaceae.** 2013. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/19070510/Metarhizium%2022Feb13.pdf>> ARSEF>. Acesso em: 06 abr. 2014.

INGLIS, P.W.; MAGALHÃES, B.P.; VALADARES-INGLIS, M.C. Genetic variability in *Metarhizium flavoviride* revealed by telomeric fingerprinting. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 179, n. 1, p. 49-52, Oct. 1999.

KEPLER, R.M.; REHNER, S.A. Genome-assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 210–217, Mar. 2013.

LOPES, R.B.; MARTINS, I.; SOUZA, D.A.; FARIA, M. Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 112, n. 3, p. 236-242, Mar. 2013a.

LOPES, R.B.; SOUZA, D.A.; OLIVEIRA, C.M.; FARIA, M. Genetic diversity and pathogenicity of *Metarhizium* spp. associated with the white grub *Phyllophaga capillata* (Blanchard) (Coleoptera: Melolonthidae) in a soybean field. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 42, n. 4, p. 436-438, Aug. 2013b.

MEYLING, N.V.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. **Biological Control**, Orlando, v. 43, n. 2, p. 145–155, Nov. 2007.

NISHI, O.; HASEGAWA, K.; IYAMA, K.; YASUNAGA-AOKI, C.; SHIMIZU, S.. Phylogenetic analysis of *Metarhizium* spp. isolated from soil in Japan. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 46, n. 3, p. 301-309, Aug. 2011.

PANTONE®. **Pantone® formula guide: coated/uncoated - GP1201.** 2009.

RANGEL, D.E.N.; DETTENMAIER, S.J.; FERNANDES, É.K.K.; ROBERTS, D.W. Susceptibility of *Metarhizium* spp. and other entomopathogenic fungi to dodine-based selective media. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 375-389. Feb. 2010.

ROCHA, L.F.N.; INGLIS, P.W.; HUMBER, R.A.; KIPNIS, A.; LUZ, C. Occurrence of *Metarhizium* spp. in Central Brazilian soils. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 53, n. 3, p. 251–259, Mar. 2012.

SASAN, R.K.; BIDOCHKA, M.J. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 99, n. 1, p. 101-107, Jan. 2012.

SOKOLOVSKY, V.; KALDENHOFER, Y.; RICCI, M.; RUSSO, V.E.A. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics Newsletters**, College Station, v. 37, p. 39-40, 1990.

SOUZA, R.A.; TELLES, T.S.; MACHADO, W.; HUNGRIA, M.; FILHO, J.T. Effects of sugarcane harvesting with burning on the chemical and microbiological properties of the soil. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 155, n. 15, p. 1–6, July 2012.

STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 22, n. 21, p. 2688–2690, Aug. 2006.

STAMATAKIS, A.; HOOVER, P.; ROUGEMONT, J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web-servers. **Systematic Biology**, Washington, v. 57, n. 5, p. 758–771, Oct. 2008.

STEINWENDER, B.M.; ENKERLI, J.; WIDMER, F.; EILENBERG, J.; MEYLING, N.V. Molecular diversity of the *Metarhizium anisopliae* lineage in an agricultural field. **International Organisation for Biological Control Bulletin**, Waedenswil, v. 66, p. 113-115, Aug. 2011.

TIGANO-MILANI, M.S.; GOMES, A.C.M.M.; SOBRAL, B.W.S. Genetic variability among Brazilian isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 65, n.2, p. 206-210, Mar. 1995.

WANG, C.; HU, G.; St. LEGER, R. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudates and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanism of physiological adaptation. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, n. 8, p. 704-718, Aug. 2005.

WYREBECK M.; HUBER D.; SASAN, R.K.; BIDOCHKA, M.J. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. **Microbiology**, Reading, v. 157, n. 10, p. 2904-2911, Oct. 2011

ZIMMERMANN, G. Galleria bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 102, n. 1/5, p. 213-215, Jan. 1986.

4 ESPÉCIES DE *Metarhizium* spp. PRESENTES EM ÁREA DE CANAVIAL COM E SEM APLICAÇÃO DO FUNGO PARA CONTROLE DE *Mahanarva fimbriolata*

Resumo

O Brasil é atualmente o maior produtor de cana-de-açúcar e o setor sucroenergético tem crescido consideravelmente nos últimos anos. A cigarrinha das raízes, *Mahanarva fimbriolata*, é uma das principais pragas da cultura e os canaviais infestados sofrem reduções drásticas de produção e qualidade. O emprego de *Metarhizium anisopliae* na cultura da cana-de-açúcar para o manejo de cigarrinhas é um dos maiores exemplos de controle microbiano no país, porém pouco se conhece sobre a composição de espécies e variabilidade genética de *Metarhizium* associado a cana-de-açúcar. Foi realizado o sequenciamento da região MzIGS3 do DNA proveniente de colônias de *Metarhizium* isoladas a partir de amostras da rizosfera de cana e de solo coletados em área de canavial com e sem aplicação do entomopatógeno no manejo da cigarrinha da raiz. Foram obtidas 41 colônias fúngicas morfologicamente distintas do gênero *Metarhizium* e revelou uma diversidade total de 9 haplótipos. A análise de máxima verossimilhança agrupou os isolados com as espécies de *M. anisopliae*, *M. robertsii*, a linhagem predominante, e uma nova linhagem não caracterizada taxonomicamente. Os dados gerados neste trabalho contribuem para o desenvolvimento de outras pesquisas visando o conhecimento da ecologia e dinâmica das populações de *Metarhizium* spp. em plantios de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Controle biológico; Entomopatógeno; Cana-de-açúcar; Cigarrinha das raízes

Abstract

Brazil is the largest producer of sugarcane and this sector has grown significantly over the time. Sugarcane fields infested with spittlebugs frequently suffer drastic reductions in production yield and quality. Biological control of spittlebug with *Metarhizium* in sugarcane is an example of the successful application of sustainable pest management in Brazil. However little is known about the richness, distribution and ecology of *Metarhizium* species with this crop system. Forty-one *Metarhizium* strains were recovered from rhizosphere and soil collected in sugarcane fields with and without application of that entomopathogen. The MzIGS3 sequence survey revealed 9 sequence haplotypes among the 41 strains introduced here. A maximum likelihood phylogenetic analysis of these sequence strains clustered them within the currently recognized *M. anisopliae* s.l. and *M. robertsii* s.l. species lineages and an additional taxonomically unassigned lineage. The data generated in this study will provide the development of other research to understanding the ecology and dynamics of *Metarhizium* spp. populations in sugarcane fields.

Keywords: Biological control; Entomopathogen; Sugarcane; Spittlebugs

4.1 Introdução

O Brasil é atualmente o maior produtor de cana-de-açúcar, sendo a área na safra de 2013/14 estimada em 8,10 milhões de hectares (ha). Atualmente a principal região produtora é a Centro-Sul, responsável por 91,27% da produção de etanol e 71,69% da produção de açúcar. O Estado de São Paulo é o maior produtor de cana com uma área de 4,55 milhões de hectares, representando 51,66% de toda área de cana do país (CONAB, 2013). O setor sucroenergético tem crescido consideravelmente nos últimos anos, porém os altos custos de produção acabam ofuscando esse crescimento. Grande parte dos custos para produzir os derivados de cana-de-açúcar é despendida com insumos agrícolas, por exemplo, defensivos para o controle de pragas e doenças.

As principais pragas da cana-de-açúcar no Brasil são a broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae), e as cigarrinhas *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) e *Mahanarva posticata* (Hemiptera: Cercopidae). A cigarrinha *M. posticata* é a principal praga na região nordeste e *M. fimbriolata* é de importância na região sudeste do Brasil.

A redução na produtividade causada por *M. fimbriolata* a diferentes genótipos de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo pode alcançar 50% segundo Almeida et al., (2003). Canaviais infestados com cigarrinha sofrem reduções drásticas de produção e qualidade. Os danos mais significativos são causados pelas ninfas de cigarrinha, que se alimentam das raízes removendo água e nutrientes, resultando em estresse hídrico que predispõem as plantas hospedeiras à ocorrência de rachaduras e deterioração fisiológica, além de, aumentar a vulnerabilidade à invasão por patógenos e pragas secundárias. As cigarrinhas adultas também causam danos foliares enfraquecendo ainda mais as plantas, porém estes danos são de menor gravidade (GARCIA et al., 2006).

A importância da cigarrinha das raízes, *M. fimbriolata*, tem aumentado nos últimos anos devido às mudanças na forma de colheita da cana-de-açúcar. Tradicionalmente, os canaviais eram submetidos à queima antes da colheita para remover o excesso de folhas e facilitar a colheita manual. Preocupados com o impacto desta prática cultural sobre o meio ambiente, à saúde da população, além da degradação do solo e do próprio material colhido, os produtores tem substituído colheita manual após a queimada pela colheita mecanizada sem queima (GALDOS,

2013). Como a queima também resultava na redução populacional de cigarrinhas, a mudança para colheita mecânica tem resultado em aumento nas populações de cigarrinhas (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

A preocupação com os efeitos colaterais dos pesticidas na saúde humana, animal e ambiental também têm motivado a busca de estratégias mais sustentáveis para o controle desse inseto. Desta forma, muitas usinas têm optado pela aplicação do fungo *Metarhizium* visando o controle de *M. fimbriolata* e *M. posticata*. O controle microbiano com fungos já é uma realidade no manejo sustentável de inúmeras pragas (ALVES et al., 2008).

Embora o emprego de *M. anisopliae* na cultura da cana-de-açúcar para o manejo de cigarrinhas seja um dos maiores exemplos de sucesso de controle microbiano no país, pouco se conhece sobre a composição de espécies e variabilidade genética de *Metarhizium* associados a cana-de-açúcar no país. Desta forma o trabalho teve por objetivo identificar as espécies de *Metarhizium* e caracterizar a variabilidade populacional deste fungo em áreas de canavial com e sem utilização de *M. anisopliae* no manejo da cigarrinha da raiz, *M. fimbriolata*.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Coleta de solo e rizosfera em plantios de cana-de-açúcar

Em um canavial, na Usina Iracema (Figura 4.1), localizado em Iracemápolis, São Paulo em uma área rotineiramente tratada com *Metarhizium* sp. e outra em área que nunca recebeu o fungo foram coletadas amostras de solo e amostras da rizosfera da cana-de-açúcar para a caracterização da variabilidade de isolados presentes na área. O desenho amostral da coleta foi realizado conforme descrito na Figura 4.2. A coleta foi realizada em 18 de dezembro de 2012. A área rotineiramente tratada com *Metarhizium* (b2), gleba 1031, recebeu a última aplicação do fungo em janeiro de 2011 e estava destinada a multiplicação de variedades no segundo corte e se caracterizava por Latossolo Vermelho Eutrófico. Na área não tratada com o fungo (b1), gleba 1035, o solo era do tipo Latossolo Vermelho Eutroférico e a variedade plantada era SP87-1115 no sétimo corte.

Conforme observado na Figura 4.2 a área útil amostrada foi de 3000 m² para cada campo. As coletas foram feitas a cada 5 metros em 4 linhas de 100 m de

comprimento, denominadas de A, B, C, D nas entrelinhas do canavial. Cada linha foi espaçada uma da outra por 10 m perfazendo 20 pontos de coleta de solo por linha e 80 pontos por área.

As coletas para isolamento do solo foram feitas, com o uso de um amostrador (espátula), na profundidade de 0-5 cm. Coletou-se aproximadamente 100 g de solo de cada ponto amostrado. As raízes foram retiradas de 10 plantas de cana escolhidas ao acaso.

As amostras foram acondicionadas individualmente em sacos plásticos de primeiro uso e mantidas em caixa térmica até serem transportadas para o laboratório. Entre o saco plástico contendo a amostra recolhida e outro saco plástico limpo foi colocado uma etiqueta contendo as informações do local (com e sem tratamento com o fungo) e a denominação do ponto amostral.

Figura 4.1 – Localização dos campos de produção de cana-de-açúcar na Usina Iracema, Iracemápolis - SP - Brasil, onde foi realizada a coleta de solo e raízes para isolamento de *Metarhizium*. Fotografia a) posicionamento da área em relação a cidade de Iracemápolis. Fotografia b) detalhe da área amostrada: b1) área de canavial sem aplicação de *Metarhizium* e b2) área de canavial com aplicação de *Metarhizium*

Figura 4.2 - Desenho amostral da coleta de solo e raízes para caracterização das populações de *Metarhizium* spp. em plantios de cana-de-açúcar: ○ Ponto de coleta de raízes; ● Ponto de coleta de solo

4.2.2 Isolamento de *Metarhizium* do solo e da rizosfera

O isolamento de *Metarhizium* a partir das amostras de solo foi realizado por dois métodos simultaneamente: meio seletivo e “insect bait”. O isolamento com meio seletivo foi feito seguindo o procedimento descrito por Goettel, Inglis (1997), porém utilizando o meio seletivo PDAY com Dodine descrito por Rangel et al., (2010). De forma resumida, a partir de cada amostra foi separada uma alíquota de 10 g de solo que foi colocado em erlenmeyers contendo 90 mL de água destilada estéril mais 0,01% de espalhante adesivo (Tween[®] 80). Os erlenmeyers foram mantidos em uma mesa agitadora orbital (modelo: MA 140 CFT, Marconi) programada para 200 rotações por minutos por 20 minutos. A partir desta suspensão foram preparadas três diluições seriadas. Após a homogeneização das diluições uma alíquota de 100 µL foi retirada de cada diluição e plaqueada com auxílio de alça de Drigalski em meio seletivo. Foram plaqueadas duas placas para cada diluição. As placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand) por 7 dias, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 de fotofase. As colônias de *Metarhizium* foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Agar - BDA (Potato Dextrose Agar, Difco[™], USA) e espalhados com auxílio de uma alça de Drigalsky para obtenção de culturas puras. As placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand) por 7 dias, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 de fotofase.

O isolamento de *Metarhizium* do solo pela técnica de “insect bait” foi realizado com larvas de 3º ou 4º instar de *Tenebrio molitor* de acordo com técnicas adaptadas de Zimmermann (1986) e Meyling (2006). Em potes plásticos com tampa de 500 mL foram colocados 80 g de solos peneirados de cada amostra para onde foram transferidas 10 larvas de *T. molitor*. Os potes foram colocados em câmara climatizada do tipo B.O.D por 7 dias, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 de fotofase. Neste período, todos os dias o solo foi umedecido e os potes invertidos. Todas as larvas mortas foram separadas do solo e transferidas para câmara úmida e mantidas em BOD. Após 7 dias, as larvas mortas mantidas em câmara úmida foram avaliadas e aquelas que apresentaram o corpo coberto por crescimento fúngico foram colocadas em microtubos. Posteriormente uma pequena porção de crescimento fúngico nos insetos contendo conídios foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura BDA conforme descrito acima.

Para o isolamento de *Metarhizium* a partir da rizosfera foi empregada a metodologia descrita por Wyrebeek et al. (2011). Resumidamente, as raízes foram lavadas com água destilada estéril para retirar o excesso de solo. Em seguida as raízes maiores e as radículas foram cortadas em pequenos pedaços (0,5 cm). Os pequenos pedaços de raízes foram colocados em tubos tipo Falcon contendo 20 mL de água destilada estéril mais 0,01% de espalhante adesivo (Tween[®] 80). Os tubos foram agitados vigorosamente com as mãos e depois colocados em agitador orbital por aproximadamente 10 minutos. Desta fase em diante adotou-se o mesmo procedimento realizado para as amostras de solo.

O DNA das colônias de *Metarhizium* spp. isoladas a partir de cada amostra de solo ou de rizosfera foi extraído e a região MzIGS3 sequenciada no Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville Agricultural Research Center.

4.2.3 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada a partir de conídios. Conídios de cada colônia selecionada foram inoculados sobre o papel de filtro (Grade 2 - Whatman) em Placas de Petri pequenas (3 cm de diâmetro) contendo BDA. As placas foram colocadas em câmara climatizada do tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand) por 5 a 7 dias, a $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 de fotofase.

Após a conidiogênese o fungo que cresceu sobre o papel filtro foi raspado com auxílio de uma lâmina de bisturi e transferido para microtubos (2mL Screw Cap Micro Centrifuge Tube Sarstedt), próprios para utilização em aparelhos tipo FastPrep[®]. Dentro de cada microtubo juntamente com o material fúngico foi adicionado 350 μL de tampão de extração (2,1g de Sodium metasilicate, Sigma; 0,5g de ácido cítrico, Sigma; 2,64 mL de 2-butoxy-ethanol-akaethyleno-glycol-butyl-ether, Sigma; 13,5 mL de 1 M de Tris-HCL, pH 7,0 e 200 mL de água destilada estéril), além de terra diatomácea e “zirconia-glass beads” de 1mm e 2,3mm (BioSpec Products). Os tubos foram fechados e levados ao equipamento FastPrep[®] (MP Biomedicals, USA) por 20 s com velocidade de 5.5 m/s. Após o processo de homogeneização e lise celular as mesmas foram colocadas imediatamente em banho quente (100°C) por 10 min, em seguida foram centrifugadas por 10 min a $14000 \times g$. Após a centrifugação as amostras foram imediatamente colocadas em

rack resfriado e a partir de cada tubo foi retirado 175 µL de sobrenadante com cuidado, evitando a sujeira do fundo. O DNA foi transferido para um novo microtubo limpo e armazenado em freezer -20° C para posterior utilização.

4.2.4 PCR, sequenciamento, alinhamento e análise filogenética

A região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3 (Kepler; Rehner, 2013) foi escolhida devido a maior variabilidade apresentada. A reação de amplificação para a região MzIGS3 seguiu o procedimento descrito por Kepler e Rehner (2013) usando o seguinte par de primers: MzIGS3_1F (5'-CGTGGCTCCTGACCATGGTTGC) × MzIGS3_4R (5'-GCGGGGGAGCCGACTTGGGA). Nos casos em que a combinação deste par de primers não proporcionou amplificação, os primers MzIGS3_2F (5'-GTGGCTCCTGACCATGGTTGC) × MzIGS3_4R foram usados.

A reação de PCR foi conduzida num volume de 12,5 µL, contendo 10X ExTaq PCR Buffer, 0,25 mM de dNTP mix, 1,25 unidades de ExTaq™ DNA Polymerase (5U/µl) (TaKara), 1,0 µM de cada um dos primers e aproximadamente 20 ng de DNA genômico.

As amostras foram amplificadas em termociclador Multi-Bay™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Para amplificação da região MzIGS3 empregou-se o protocolo de “touchdown” iniciando com a desnaturação a 95°C por 2 min, seguida de 10 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 62–52°C por 30 s decrescendo em 1°C por ciclo, extensão de 72°C por 1 min, seguido de 36 ciclos de desnaturação a 95°C for 30 s, anelamento a 52°C por 30 s, extensão a 72°C por 1 min, finalizando com extensão a 72°C por 15 min.

A qualidade e o tamanho do produto final da PCR foi analisado em gel de agarose 1%, sendo o produto posteriormente purificado por digestão enzimática com o Kit Illustra™ ExoStar (GE Healthcare, USA) de acordo com as instruções dos fabricantes e preparado para sequenciamento.

O sequenciamento dos amplicons foi conduzido com Amplicon BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit conforme instruções do fabricante.

A região MzIGS3 foi sequenciada utilizando os primers internos MzIGS3_3F (5'-TGGTRTAACCRGCGAGACA) e MzIGS3_2F (5'-GTGGCTCCTGACCATGGTTGC). As reações de sequenciamento foram

precipitadas com etanol e resuspendidas em Hi-Di formamida e sequenciadas utilizando o ABI 3730 DNA Analyser com a tecnologia Applied Biosystems (Applied Biosystems, USA).

As sequências foram editadas e alinhadas utilizando o programa Sequencher 5.0 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, Michigan). O alinhamento múltiplo das sequências foi construído utilizando o software MAFFT version 7 webserver (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) com a opção de alinhamento FFT-NS-i. O conjunto de dado contendo 41 sequências provenientes dos isolados da área de canavial e oito sequências de isolados de referência, taxonomicamente autenticados foi analisado sob máxima verossimilhança com a implementação do modelo Jukes-Cantor e mil repetições de bootstrap.

4.3 Resultados

Foram obtidas 41 colônias fúngicas morfologicamente distintas do gênero *Metarhizium* nos isolamentos de solo e da rizosfera da área de canavial (Tabela 4.1). De um total de 40 amostras de rizosfera coletadas nas duas áreas (b1 e b2 – Figura 4.1) foi possível isolar o entomopatógeno a partir de 5 plantas, sendo que todas essas estavam dentro da área que não recebeu aplicações de fungo (área b1). As demais colônias (n=36) foram isoladas a partir de amostras de solo (n=160), com a seguinte distribuição: da área com emprego de *Metarhizium* foram obtidas 7 colônias e da área sem aplicação do fungo originou 29 colônias.

O método de isolamento por “insect baiting” com *T. molitor* resultou na obtenção de 29 colônias, enquanto que o isolamento por meio seletivo PDAY/Dodine recuperou 12 colônias. Considerando todas as amostras foi possível isolar um maior número de colônias de *Metarhizium* na área sem aplicação de fungo do que na área com aplicação, 34 e 7 respectivamente.

Tabela 4.1 – Relação dos isolados de *Metarhizium* spp. coletados em amostras de solo e rizosfera proveniente de duas áreas de canalial que recebem ou não a aplicação de *Metarhizium* para o controle de *Mahanarva fimbriolata*

(continua)

Código do isolado	Identificação	Área de coleta	Material de origem	Local (linha/ponto/colônia)	Método de isolamento
ESALQ 1645	<i>M. robertsii</i>	b2	solo	A2.I	meio seletivo
ESALQ 1646	<i>M. robertsii</i>	b2	solo	A2.II	meio seletivo
ESALQ 1647	<i>M. robertsii</i>	b2	solo	A2.III	meio seletivo
ESALQ 1648	<i>M. robertsii</i>	b2	solo	A2.IV	meio seletivo
ESALQ 1651	<i>M. anisopliae</i>	b2	solo	C20	meio seletivo
ESALQ 1652	<i>M. robertsii</i>	b1	solo	C3	meio seletivo
ESALQ 1653	<i>M. robertsii</i>	b1	solo	C17	meio seletivo
ESALQ 1654	<i>M. anisopliae</i>	b1	solo	D18.I	meio seletivo
ESALQ 1655	<i>Metarhizium</i> sp. indet. 3	b1	solo	D18.II	meio seletivo
ESALQ 1656	<i>Metarhizium</i> sp. indet. 3	b1	solo	D18.III	meio seletivo
ESALQ 1657	<i>M. anisopliae</i>	b2	solo	A2	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1658	<i>M. robertsii</i>	b2	solo	D3	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1659	<i>M. anisopliae</i>	b1	solo	A3	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1660	<i>Metarhizium</i> sp. indet. 3	b1	solo	A7	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1661	<i>M. robertsii</i>	b1	solo	A14.I	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1662	<i>M. robertsii</i>	b1	solo	A14.II	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1663	<i>M. robertsii</i>	b1	solo	A14.III	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1664	<i>M. robertsii</i>	b1	solo	B1	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1665	<i>M. anisopliae</i>	b1	solo	B2	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1666	<i>M. robertsii</i>	b1	solo	C10	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1667	<i>M. anisopliae</i>	b1	solo	C13.I	<i>Tenebrio molitor</i>

Tabela 4.1 – Relação dos isolados de *Metarhizium* spp. coletados em amostras de solo e rizosfera proveniente de duas áreas de canavial que recebem ou não a aplicação de *Metarhizium* para o controle de *Mahanarva fimbriolata*

(conclusão)

Código do isolado	Identificação	Área de coleta	Material de origem	Local (linha/ponto/colônia)	Método de isolamento
ESALQ 1668	<i>M. anisopliae</i>	b1	solo	C13.II	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1669	<i>M. anisopliae</i>	b1	solo	C13.III	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1670	<i>M. anisopliae</i>	b1	solo	C13.IV	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1671	<i>M. anisopliae</i>	b1	solo	C19	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1672	<i>M. robertsii</i>	b1	solo	D4	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1673	<i>M. robertsii</i>	b1	solo	D7.I	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1674	<i>M. robertsii</i>	b1	solo	D7.II	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1675	<i>M. robertsii</i>	b1	solo	D9	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1676	<i>M. robertsii</i>	b1	solo	D10	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1677	<i>M. robertsii</i>	b1	solo	D12	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1678	<i>M. robertsii</i>	b1	solo	D19.I	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1679	<i>M. robertsii</i>	b1	solo	D19.II	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1680	<i>M. robertsii</i>	b1	solo	D20.I	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1681	<i>M. robertsii</i>	b1	solo	D20.II	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1682	<i>M. robertsii</i>	b1	solo	D20.III	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1683	<i>M. robertsii</i>	b1	rizosfera	C8	meio seletivo PDAY/Dodine
ESALQ 1684	<i>Metarhizium</i> sp. indet. 3	b1	rizosfera	D3	meio seletivo PDAY/Dodine
ESALQ 1685	<i>M. robertsii</i>	b1	rizosfera	C6	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1686	<i>Metarhizium</i> sp. indet. 3	b1	rizosfera	D2	<i>Tenebrio molitor</i>
ESALQ 1687	<i>Metarhizium</i> sp. indet. 3	b1	rizosfera	D4	<i>Tenebrio molitor</i>

A sequência parcial obtida pelo par de primers MzIGS3_3F e MzIGS3_5R gerou aproximadamente 676 pb e revelou uma diversidade total de 9 haplótipos dentre os 41 isolados coletados neste estudo.

A análise de máxima verossimilhança agrupou os isolados provenientes da área de cana-de-açúcar junto as espécies de *M. anisopliae*, *M. robertsii* e uma nova linhagem não caracterizada taxonomicamente, referida aqui como *Metarhizium* sp. indet. 3 (Figure 4.2).

M. robertsii (n=25) foi a linhagem predominante, sendo que os isolados formaram um clado composto por sequências de três grupos de haplótipos. O primeiro grupo de haplótipo (n=20) apresentou sequência idêntica a do isolado referência ARSEF 727, os demais grupos foram composto por 1 e 4 isolados. A maioria de *M. robertsii* foi isolada a partir de solo da área que não recebeu fungo (n=20), pelo método “insect baiting” (n=16). Apenas *M. robertssi* foi recuperado em todas as situações, amostras de solo e rizosfera, em área com e sem aplicação de fungo e por meio seletivo ou “insect bait”.

A diversidade de *M. anisopliae* (n=10) foi representada por quatro haplótipos, sendo que um dos haplótipos foi agrupado juntamente com o isolado referência ARSEF 7487 (n=5) e dois haplótipos agruparam junto ao isolado referência ARSEF 6347 (n=2), observando-se ainda um novo haplótipo (n=2). Dos 10 isolados de *M. anisopliae* oito tiveram como origem amostra de solo da área que não recebe aplicações de fungo (b1) e dois tiveram origem em solo da área que recebe aplicações de fungo. *M. anisopliae* não foi isolado das amostras de rizosfera. Obteve-se oito isolados por meio do método de “insect bait”, enquanto que dois isolados foram recuperados por meio seletivo.

Metarhizium sp. indet. 3 (n=6) apresentou 2 haplótipos com 1 e 5 isolados. A formação deste ramo recebeu alto valor de bootstrap e provavelmente representa mais uma nova espécie para este gênero. Dentro deste grupo estão inclusos isolados provenientes tanto de rizosfera (n=3) quanto de solo (n=3) pelos dois métodos de isolamento, meio seletivo (n=3) e “insect baiting” (n=3). Porém, esta linhagem foi isolada apenas da área sem a aplicação do fungo.

Figura 4.2 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida do alinhamento das sequências do gene MzIGS3 de 41 isolados coletados em canavial (denominados como ESALQ) e oito isolados de referência, taxonomicamente autenticados (denominados como ARSEF). Apenas os valores de *bootstrap* (1000 repetições) acima de 70% estão representados nos nós

4.4 Discussão

Este trabalho mostrou a ocorrência de três espécies e 9 haplótipos de *Metarhizium* em apenas 41 isolados provenientes de amostras de solo e rizosfera de uma área de apenas 6000 m² em canavial no Estado de São Paulo. Esta é uma diversidade alta considerando que no capítulo 3, foi mostrado que dos 96 isolados de *Metarhizium* spp. originados de 14 estados brasileiros, abrangendo uma área de aproximadamente 5,4x10⁶ km², ou seja, quase 2/3 da área terrestre do Brasil resultou em uma diversidade de 17 haplótipos. Diversidade superior do que a encontrada por Bautista-Galvez et al. (2012) que amostraram 33 campos de produção de cana-de-açúcar no México, sendo 31 áreas que não recebiam o fungo e duas áreas nas quais o fungo havia sido empregado para o controle de *Aeneolamia posticata* Walker (Hemiptera: Cercopidae). Cada campo amostrado tinha em média 6 ha. Os autores conseguiram recuperar 10 colônias de *M. anisopliae* e usando a técnica de RAPD observaram a presença de dois genótipos.

Os resultados aqui encontrados mostraram que prevaleceu a espécie *M. robertsii*. No capítulo 3 desta tese observou-se que *M. anisopliae* e *M. robertsii* foram as espécies com ocorrência mais comum no Brasil, dados confirmados em outros trabalhos (LOPES et al., 2013a, 2013b). Levando em consideração apenas estudos de áreas agrícolas no Brasil, *M. robertsii* foi a espécie predominante deste gênero em amostras de solo provenientes de cultivo de soja (Lopes et al., 2013a), enquanto *M. anisopliae* predominou em amostras de solo originadas de cultivo de banana (LOPES et al., 2013b).

Considerando a utilização de ambos os métodos de isolamento detectou-se *Metarhizium* em 12,5% das amostras coletadas (40 e 160 amostras de rizosfera e solo, respectivamente). Tigano-Millani et al. (1993) em estudo com solo coletado por todo Brasil detectaram o entomopatógeno em 6% de 81 amostras analisadas. Martins et al. (2004) não encontrou *Metarhizium* sp. em lavoura de arroz irrigado. Lopes et al. (2013b) isolaram, apenas por “insect bait”, *Metarhizium* de 7% de 100 amostra de solo de bananal em uma área de 1,8 ha. Embora seja difícil fazer comparações diretas com outros estudos devido a variação nos métodos de isolamento, a maior porcentagem de detecção aqui encontrada em relação aos outros trabalhos pode ser devido a ocorrência enzoótica ou até mesmo epizootica de *Metarhizium* em Cercopídeos na cana-de-açúcar.

Segundo Dinardo-Miranda et al. (2004) até meados da década de 1990, a cigarrinha das raízes tinha pouca importância para a cana-de-açúcar no estado de São Paulo, pois a queima da palha antes da colheita mantinha suas populações baixas, principalmente pela destruição dos ovos em diapausa. Considerável incremento na população dessa praga foi desencadeado com o aumento da área colhida mecanicamente (MACEDO et al., 1997). Se por um lado o fim das queimadas favorece a praga devido ao aumento significativo da umidade e da matéria orgânica do solo, em função do depósito de palha sobre ele (ALMEIDA et al., 2003) por outro lado a mesma situação também favorece sobremaneira a ocorrência de fungos entomopatogênicos. A ocorrência natural do fungo *M. anisopliae* atacando cigarrinha-das-raízes em canaviais de todo o país é bastante comum, assim como o uso deste agente de controle biológico em áreas infestadas por essa praga. Desta forma, a predominância de *M. robertsii* na área estudada não era esperada. Guiados ainda, pelos resultados do capítulo 3 desta tese que mostrou que a grande maioria de *Metarhizium* relacionados ao sistema sucroalcooleiro atualmente pertence a linhagem *M. anisopliae*, esperava-se esta como predominante.

A predominância de *M. robertsii* pode ser explicada pelo fato de que os isolados do presente estudo foram provenientes apenas do ambiente edáfico, solo ou rizosfera. Os resultados do terceiro capítulo desta tese indicam que os representantes brasileiros de *M. robertsii*, possivelmente, estão ecologicamente mais restritos ao solo. Vários estudos demonstram a intrínseca relação entre *M. robertsii* e o ambiente edáfico. *M. robertsii* e espécies relacionadas são biologicamente ativas no solo, onde podem colonizar ativamente e associar-se de forma persistentemente com as raízes das plantas (BIDOCHKA et al., 2001; WYREBECK et al., 2011; SASAN et al., 2012). A mesma relação parece ser verdadeira para a possível nova espécie, tratada aqui como *Metarhizium* sp. indet. 3, já que a mesma foi isolada majoritariamente a partir de amostras de rizosfera. Apenas *M. anisopliae* não foi detectada na rizosfera.

O entendimento da relação tritrófica entre espécies de *Metarhizium*, a cultura da cana-de-açúcar e cigarrinhas é de suma importância devido ao fato de que *Metarhizium* sp. pode ter um estilo de vida bifuncional, como fungo endofítico e patógeno de insetos (LIAO et al., 2014). Recentemente foi demonstrado a habilidade de *M. robertsii* em translocar nitrogênio a partir de insetos infectados para gramínea

(BEHIE et al., 2012) e provavelmente em contrapartida a planta beneficie o fungo oferecendo carbono em troca do nitrogênio recebido (FANG; St. LEGER, 2010a, 2010b). Com a popularização das técnicas de engenharia genética e manipulação biotecnológica é possível trabalhar com ambas as espécies de *Metarhizium* a fim de promover simultaneamente a super-expressão de genes responsáveis pela patogenicidade a insetos, por exemplo, MAD1 e Pr1 genes responsáveis pela codificação de enzimas responsáveis pela adesão e degradação da cutícula do inseto (WANG; St. LEGER, 2007), assim como genes relacionados a associação simbiótica com as plantas, como *Mad2* responsável pela adesão a raiz.

Foi possível detectar *Metarhizium* em 21,15 e 25% das amostras de solo e rizosfera coletados na área do canavial onde nunca havia sido aplicado o fungo para controle de cigarrinhas contra apenas 3,75 e 0% de detecção na área onde o fungo vem sendo rotineiramente empregado no manejo da praga. A coleta das amostras foi realizada em dezembro de 2012, enquanto que a última pulverização de fungo na área foi realizada no início de 2011, o que indica que provavelmente o fungo aplicado não persistiu ou estava presente em quantidade pouco significativa. Vários estudos demonstraram que *M. anisopliae* pode sobreviver por dias, meses ou mesmo alguns anos no campo. O fungo persistiu por 60 dias após pulverização em vasos com cana-de-açúcar em casa de vegetação (TIAGO et al., 2012), seis meses quando aplicado em pomar de citrus na África do Sul (COOMBES et al., 2013) e por até três anos e meio após a pulverização de produto comercial a base de *M. lepidiotae* em cana-de-açúcar na Austrália (MILNER et al., 2003).

De qualquer forma, a persistência do fungo depende das condições ambientais da área na qual o entomopatógeno foi aplicado. Por exemplo, a detecção de um maior número de isolados a partir da área onde não havia sido aplicado o fungo pode ser devido a mesma ser uma área de baixada que apresenta mais umidade ou mesmo em decorrência da área não receber tratos culturais mecanizados já que apresenta certa declividade. O teor de umidade tem sido apontado como um dos principais fatores que afetam o crescimento e a sobrevivência de fungos entomopatogênicos no solo (LI; HOLDOM, 1993), sendo que solos com umidade reduzida podem contribuir para o decréscimo na abundância de fungos (KELLER; BIDOCHKA, 1998). A realização de tratos culturais com máquinas agrícolas pode contribuir com a compactação do solo, quanto a isso Lanza et al. (2004) observaram que a sobrevivência de *M. anisopliae* é influenciada

negativamente pelo grau de compactação do solo sendo maior em solo pouco compactado.

Contudo, questões relacionadas com a persistência a longo prazo e viabilidade do fungo depois de ter sido pulverizado em canaviais precisam ainda ser elucidadas. Desta forma, este trabalho servirá de base para estudos sobre a persistência de isolados naturais e dos potenciais biopesticidas. Para isso será necessário lançar mão de métodos moleculares. Por exemplo, a sequência parcial da região MzIGS3 do isolado ESALQ 1604, obtido a partir de um produto comercial (Biotech G, Biotech® Controle Biológico) registrado junto ao Ministério da Agricultura para controle de cigarrinha, mostrou-se única e diferente de todas as outras obtidas tanto nos isolados estudados no capítulo 3 quanto no presente capítulo. Esta característica torna mais fácil o desenvolvimento de marcadores para o monitoramento do fungo em campo.

Assim, com a seleção de marcadores adequados será possível realizar a quantificação e análise dos genótipos fúngicos no ambiente e monitorar esses fungos entomopatogênicos no campo. Além disso, os dados gerados neste trabalho contribuem para o desenvolvimento de outras pesquisas visando o conhecimento da dinâmica das populações de *Metarhizium* sp. em plantios de cana-de-açúcar, no sentido por exemplo, de identificar a porcentagem de mortalidade de cigarrinha causada por isolados comerciais em relação aos isolados encontrados naturalmente, assim como permitir o monitoramento da persistência dos isolados aplicados na área.

Referências

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A; SANTOS, A.S. Avaliação do controle biológico de *Mahanarva fimbriolata* (Hom., Cercopidae) com o fungo *Metarhizium anisopliae* em variedades de cana-de-açúcar e diferentes épocas de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 101-103, 2003.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. 414p.

BAUTISTA-GALVEZ, A.; BARRERA, J.F.; PAYRÓ DE LA CRUZ, E.; SALGADO-GARCÍA, S.; GÓMEZ-RUIZ, J.; GOMEZ-LEYVA, J.F. Genetic characterisation of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) sorokin isolates from sugarcane fields and their pathogenicity against *Aeneolamia postica* (Walker) (Hemiptera:Cercopidae). **Universidad y Ciencia**, Tabasco, v. 28, n. 3, p. 271-229, Dec. 2012.

BEHIE, S.W.; ZELISKO, P.M.; BIDOCHKA, M.J. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. **Science**, Washington, v. 22, p. 1576-1577, 2012.

BIDOCHKA, M.J.; KASPERSKI, J.E.; GEOFFREY, A.M.W. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate near-northern habitats. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 76, n. 7, p. 1198-1204, 1998.

BIDOCHKA, M.J.; KAMP, A.M.; LAVENDER, T.M.; DEKONING, J.; DE CROOS, J.N.A. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 3, p. 1335-1342, Mar. 2001

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, H.M.C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J.C.; BURNQUIST, W.L.; CRESTE, S.; CIERO, L.; FERRO, J.A.; FIGUEIRA, A.V.O.; FILGUEIRAS, T.S.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; GUZZO, E.C.; HOFFMANN, H.P.; LANDELL, M.G.A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F.C.; ROMANO, E.; SILVA, W.J.; SILVA FILHO, M.C.; ULIAN, E.C. Sugarcane (*Saccharum officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, Viçosa, v. 4, n. 1, p. 62-89, Mar. 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2013.** Brasília, 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 12 jun. 2014.

COOMBES, C.A.; HILL, M.P.; MOORE, S.D.; DAMES, J.F.; FULLARD, T. Persistence and virulence of promising entomopathogenic fungal isolates for use in citrus orchards in South Africa. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 23, n. 9, p. 1056-1066, Sept. 2013.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; FERREIRA, J.M.G.; GARCIA JR., C.A.; COELHO, A.L.; GIL, M.A. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 1, p. 91-98, 2004.

FANG, W.; St. LEGER, R.J. RNA binding proteins mediate the ability of a fungus to adapt to the cold. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 810-820, Mar. 2010a.

_____. Mrt, a gene unique to fungi, encodes an oligosaccharide transporter and facilitates rhizosphere competency in *Metarhizium robertsii*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 154, n. 3, p. 1549-1557, Nov. 2010b.

GALDOS, M.; CAVALETT, O.; SEABRA, J.E.A.; NOGUEIRA, L.A.H.; BONOMI, A. Trends in global warming and human health impacts related to Brazilian sugarcane ethanol production considering black carbon emissions. **Applied Energy**, London, v. 104, p. 576-82, Apr. 2013.

GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P. Biology and fertility life table of *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 4, p. 317-320, July/Aug. 2006.

GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D. Fungi: Hyphomycetes. In: LACEY L.A. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 213–249.

KELLER, L.; BIDOCHKA, M.J. Habitat and temporal differences among soil microfungus assemblages in Ontario. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 76, n. 10, p. 1798-1805, 1998.

KEPLER, R.M.; REHNER, S.A. Genome-assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 210–217, Mar. 2013.

LANZA, L.M.; MONTEIRO, A.C.; MALHEIROS, E.B. População de *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos e graus de compactação do solo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1757-1762, dez. 2004.

LI, D.P.; HOLDOM, D.G. Effect of soil matric potential on sporulation and conidial survival of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 62, n. 3, p. 273-277, Nov. 1993.

LIAO, X.; LU, H.L.; FANG, W.; St. LEGER, R.J. Overexpression of a *Metarhizium robertsii* HSP25 gene increases thermotolerance and survival in soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 98, n. 2, p. 777-783, Jan. 2014.

LOPES, R.B.; MARTINS, I.; SOUZA, D.A.; FARIA, M. Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 112, n. 3, p. 236-242, Mar. 2013a.

LOPES, R.B.; SOUZA, D.A.; OLIVEIRA, C.M.; FARIA, M. Genetic Diversity and Pathogenicity of *Metarhizium* spp. Associated with the White Grub *Phyllophaga capillata* (Blanchard) (Coleoptera: Melolonthidae) in a Soybean Field. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 42, n. 4, p. 436-438, Aug. 2013b.

MACEDO, N.; CAMPOS, M.B.S.; ARAÚJO, J.R. Insetos nas raízes e colo das plantas, perfilhamento e produtividade em canaviais colhidos com e sem queima. . **STAB - Açúcar e Alcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 15, n. 3, p. 18-21, 1997.

MARTINS, J.F.S.; BOTTON, M.; CARBONARI, J.J, QUINTELA, E.D. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* no controle do percevejo-do-colmo *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) em lavoura de arroz irrigado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1681-1688, nov./dez. 2004.

MEYLING, N.V.; EILENBERG, J. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 113, n. 1/4, p. 336–341, Apr. 2006.

MILNER, R. Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. **Biocontrol News and Information**, Wallingford, v. 21, n. 2, p. 47-50, June 2000.

RANGEL, D.E.N.; DETTENMAIER, S.J.; FERNANDES, É.K.K.; ROBERTS, D.W. Susceptibility of *Metarhizium* spp. and other entomopathogenic fungi to dodine-based selective media. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 375-389, Feb. 2010.

SASAN, R.K.; BIDOCHKA, M.J. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 99, n. 1, p. 101-107, Jan. 2012.

TIAGO, P.V.; CARNEIRO-LEÃO, M.P.; MALOSSO, E.; OLIVEIRA, N.T.; LIMA, E.A.L.A. Persistence and effect of *Metarhizium anisopliae* in the fungal community of sugarcane soil. **BioControl**, Dordrecht, v. 57, n. 5, p. 1-9, Oct. 2012.

WANG, C.; St. LEGER, R.J. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 6, n. 5, p. 808-816, May 2007.

WYREBECK M.; HUBER D.; SASAN, R.K.; BIDOCHKA, M.J. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. **Microbiology**, Reading, v. 157, n. 10, p. 2904-2911, Oct. 2011.

ZIMMERMANN, G. Galleria bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 102, n. 1/5, p. 213-215, Jan. 1986.

5 EXPRESSÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE *Metarhizium* spp. E DESCRIÇÃO DE METODOLOGIA PARA BIOENSAIO DE PATOGENICIDADE DE FUNGOS SOBRE *Mahanarva fimbriolata*

Resumo

No Brasil o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* tem sido empregado de forma expressiva na cultura da cana-de-açúcar para o manejo de cigarrinhas. Um dos pilares de um programa de controle biológico é a seleção de isolados virulentos. Os poucos bioensaios realizados em laboratório com aplicação de fungos entomopatogênicos sobre ninfas de *M. fimbriolata* resultaram em alta mortalidade da testemunha. Neste trabalho, é descrito uma metodologia para aplicação de *Metarhizium* sobre ninfas de *M. fimbriolata* que resultou em altas mortalidades dos insetos tratados com todos os isolados do fungo e mortalidades da testemunha onde não foi aplicado fungo inferiores a 12% mesmo após 28 dias. A expressão dos genes *pr1A*, *mad1* e *mpl* relacionados à virulência de *M. anisopliae* foi quantificada em três isolados (ESALQ 1037, ESALQ 1641 e ESALQ 1204) quando cultivados em meio mínimo na ausência e presença de cutícula de *M. fimbriolata*, *D. saccharalis* e *T. molitor*. O maior incremento na expressão relativa foi apresentada pelo gene *pr1A* que provocou incremento de quase 126 mil vezes após 48 horas de cultivo do fungo ESALQ 1037 em MM mais cutícula de *M. fimbriolata*. Em geral, a adição de cutícula de *D. saccharalis* ao MM não induziu ou causou discreta indução na expressão do gene *pr1A* para os três isolados estudados. Com exceção do isolado ESALQ 1204 após 48 horas de cultivo em MM contendo cutícula de *D. saccharalis*, *T. molitor* ou *M. fimbriolata*, não foi observado incrementos na expressão gênica relativa de *mad1*. Observou-se aumento na expressão relativa de *mpl* quando os isolados ESALQ 1204 e ESALQ 1641 foram cultivados em MM contendo cutícula de *D. saccharalis*. Aparentemente não foi observado correlação entre a expressão relativa dos genes estudados e a virulência dos fungos *in vivo*.

Palavras-chave: Controle biológico; Entomopatógeno; Expressão gênica; Virulência

Abstract

In Brazil the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* has been used expressively in sugarcane for the management of spittlebugs, important pests in this crop. The performance of fungus as a control agent is associated with various biotic and abiotic factors. One of the posts of a biological control program is the selection of virulent strains. The methods used for laboratory bioassay application of entomopathogenic fungi on *M. fimbriolata* resulted in high mortality of nymphs. In this study, improvements in a methodology used for screening isolates of *M. anisopliae* on immature of *Mahanarva fimbriolata* are described that resulted in high mortality levels for all isolates tested and mortalities of the control insect groups lower than 12% even after 28 days. Also the expression of virulence genes *pr1A*, *MAD1* and *mpl* of three strains (ESALQ 1037, ESALQ 1641 to 1204) was characterized using minimal medium (MM) and minimal medium with cuticle of *M. fimbriolata*, *Diatraea saccharalis* and *Tenebrio molitor*. The largest increase in relative expression was presented by *pr1A* after 48 hours of ESALQ 1037 on MM plus *M. fimbriolata*

cuticle, which reached almost 126 thousand times. In general, the addition of the cuticle of *D. saccharalis* did not induce the expression of the gene *pr1A* for the three strains studied. With the exception of strain ESALQ 1204 after 48 hours of cultivation in MM plus cuticle of *T. molitor* or *M. fimbriolata*, no increment was observed in the expression of *Mad1* gene. An increase in the expression of the *mpl* gene was observed over time when ESALQ 1204 and ESALQ 1641 isolates were grown in MM plus *D. saccharalis* cuticle. Apparently, no association between the relative expression of the studied genes and the virulence of the fungus in vivo was observed.

Keywords: Biological control; Entomopathogens; Gene expression; Virulence

5.1 Introdução

O controle microbiano com fungos é uma realidade no manejo sustentável de inúmeras pragas (ALVES et al., 2008). No Brasil o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* tem sido empregado de forma expressiva na cultura da cana-de-açúcar para o manejo de cigarrinhas, pragas importantes neste cultivo. Porém, a inconsistência na eficiência de controle da praga é um problema recorrente no manejo com micoinseticidas. O desempenho do fungo como agente de controle depende de vários fatores bióticos e abióticos, que vão desde a escolha do isolado ao comportamento do mesmo no ambiente após aplicação.

A adoção de um programa de controle de qualidade contribui para a credibilidade do produto e da idoneidade da empresa que produz e comercializa o microrganismo. O controle de qualidade dos micopesticidas deve ser realizado tanto pelas empresas produtoras quanto por instituições oficiais credenciadas. Todo lote de fungos deveria ser avaliado quanto a pureza, a viabilidade e a virulência.

Um dos pilares de um programa de controle biológico é a seleção de isolados virulentos. A seleção de isolados deve ser iniciada a partir de um grande número de isolados provenientes de infecções naturais em insetos ou do solo, além de produtos comerciais. Os bioensaios são realizados em laboratório na fase inicial de seleção pela facilidade de padronização e menor custo. Além disso, testes de virulência também são realizados, visando o acompanhamento dos lotes de produção e durante o período de armazenamento, para monitoramento da qualidade do produto. Embora o uso de *M. anisopliae* no manejo das cigarrinhas da cana-de-açúcar seja um exemplo clássico da aplicação de controle microbiano, poucos estudos comparando fungos no controle de *M. fimbriolata* foram publicados. Isto pode ser

justificado em parte pela dificuldade de criar e manter estes insetos em laboratório. As metodologias utilizadas em bioensaios em laboratório com aplicação de fungos entomopatogênicos sobre ninfas de *M. fimbriolata* resultaram em alta mortalidade da testemunha especialmente quando as ninfas foram colocadas para se alimentar de folhas, com valores de mortalidade na testemunha entre 78 e 96% (FREITAS et al. 2012) ou entre 50 e 90%, após seis dias (LOUREIRO et al., 2005), o que torna questionável as conclusões destes estudos. Algumas espécies de insetos são mais delicadas e não toleram manipulação e o stress durante o bioensaio acaba mascarando a ação do fungo, e comprometendo a qualidade do teste.

Os fungos entomopatogênicos penetram em seus hospedeiros através da cutícula e não necessitam ser ingeridos. Como a maioria dos fungos entomopatogênicos, as espécies do gênero *Metarhizium* utilizam uma combinação de força mecânica e enzimática para penetrar a cutícula do hospedeiro e ter acesso a hemolinfa rica em nutrientes. A infecção por *M. anisopliae* inicia-se pela adesão e germinação de conídios do fungo na superfície do artrópode, seguida de penetração da hifa através da cutícula. Na penetração estão envolvidos os fatores físicos (pressão da hifa que rompe áreas membranosas ou esclerosadas) e químicos, resultantes da liberação, pelo fungo, de enzimas (esterases, proteases, lipases e quitinases) que facilitam a penetração mecânica. Tem sido observada uma alta correlação entre a expressão dos genes responsáveis pela codificação das enzimas que degradam a cutícula, principalmente proteases, e a virulência de espécies do complexo *M. anisopliae* (FREIMOSER et al., 2005; SHAH et al., 2005; SMALL; BIDOCHKA, 2005; MOHANTY et al., 2008). Mutantes com maior expressão desses genes apresentam aumento significativo na virulência, assim como, os deficientes sofrem atenuação em sua virulência. Diante disto, estudos referentes à virulência de *M. anisopliae* por meio da análise da expressão desses genes tornam-se relevantes.

Devido a dificuldade em criar *M. fimbriolata* em laboratório e a constante demanda em selecionar isolados para o controle desta praga ou mesmo para monitoramento da virulência dos produtos que estão no mercado, uma opção seria a utilização de outra espécie a ser utilizada como padrão nos screenings iniciais para somente na fase final de seleção utilizar a cigarrinha. Outra opção seria a condução de estudos *in vitro* para seleção através da expressão de genes de virulência através do crescimento dos isolados em meio de cultura contendo cutícula de cigarrinha. Para testar a viabilidade destas opções era necessário primeiro

desenvolver um método de bioensaio que resultasse em altas mortalidades das cigarrinhas tratadas com o fungo mas com baixo mortalidade natural no controle. Assim, este trabalho teve por objetivo desenvolver uma técnica de bioensaio em laboratório para avaliação da patogenicidade de *Metarhizium* spp. sobre *M. fimbriolata* e posteriormente comparar a patogenicidade de isolados dos fungos sobre esta praga e sobre os insetos *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* correlacionando a patogenicidade com a expressão de genes relacionados à virulência dos isolados na presença da cutícula destes insetos.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Criação de *Mahanarva fimbriolata*

A criação de *M. fimbriolata* foi mantida no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos seguindo metodologia adaptada de Garcia et al. (2007). Adultos da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar foram coletados no Centro de Tecnologia Canavieira, localizado na Fazenda Santo Antônio, Bairro Santo Antônio, Piracicaba - SP. No laboratório, os insetos foram distribuídos em gaiolas, sendo colocados de 2 a 3 casais por recipiente. Após a oviposição, estes foram separados e colocados em placa de Petri plástica forrada com papel filtro umedecido com sulfato de cobre a 1%. As placas contendo os ovos eram armazenadas em B.O.D. a $27 \pm 1^{\circ} \text{C}$ e fotofase de 12 horas. Após a eclosão das ninfas, as mesmas eram transferidas para raízes de plantas de cana com aproximadamente 75 dias após o plantio. As plantas inoculadas com as ninfas de cigarrinha eram colocadas em caixas plásticas pretas onde permaneciam até a emergência dos adultos. Um grupo de insetos escolhidos aleatoriamente era destinado a realização dos bioensaios e o restante mantido na criação.

5.2.2 Metodologia de bioensaios para avaliação de *Metarhizium* spp. sobre *Mahanarva fimbriolata* em laboratório

Em copos plásticos pequenos, com capacidade para 200 mL, foram plantadas mudas de cana-de-açúcar e, dois meses após o plantio o copo foi recortado a partir de dois centímetros da boca sendo a parte de baixo do copo retirada, expondo as

raízes das mudas. Copos maiores, de 500 mL foram cobertos com papel alumínio e tiveram as tampas recortadas para o perfeito encaixe dos copos plásticos pequenos contendo as mudas com as raízes expostas (Figura 5.1). Os copos foram acondicionados em bandejas e permaneceram por alguns dias nesta condição, até observar-se o crescimento das raízes.

Figura 5.1 - Metodologia empregada para aplicação de fungos entomopatogênicos sobre ninfas de *M. fimbriolata*: A) Unidade experimental, copo grande coberto com papel alumínio contendo copo pequeno com a muda de cana-de-açúcar, com as raízes abrigando as ninfas; B) Detalhe dos copos e observação das raízes; C) Aplicação da suspensão fúngica; D) Ambiente para o desenvolvimento das ninfas visto pelo fundo do copo maior; E) Espuma sobre ninfas; F) Ninfa sem espuma ao centro

Cinco ninfas de cigarrinhas (entre o segundo e o terceiro ínstar), provenientes da criação mantida no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, foram distribuídas nas raízes de cada muda de cana. As ninfas permaneceram

nestas plantas por 24 horas, após esse período efetuou-se aplicação dos tratamentos.

Foi utilizado o isolado ESALQ 1037 de *M. anisopliae* da Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” armazenado em freezer (-20 °C) na forma de conídios puros. Para obter a suspensão inicial de inóculo os conídios de *M. anisopliae* foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar - BDA (Difco™, USA) e espalhados com auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D. (Biological Oxygen Demand) por 7 dias, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e doze horas de fotofase. Foi utilizada uma suspensão fúngica na concentração de 5×10^7 conídios.mL⁻¹ mais 0,05% de espalhante adesivo (Tween 80®). A viabilidade dos conídios utilizados foi superior a 98%, determinada como descrito por Oliveira (2010)

No desenvolvimento de uma metodologia para condução de bioensaios com a cigarrinha da raiz, foi realizado um experimento para avaliar se a presença da espuma sobre as ninfas afeta a suscetibilidade das ninfas ao fungo. Este bioensaio foi composto por quatro tratamentos em delineamento inteiramente aleatorizado: 1. Pulverização de água estéril mais 0,05% de espalhante adesivo Tween 80® sobre as ninfas com espuma; 2. Pulverização de água estéril com 0,05% Tween 80® diretamente sobre as ninfas sem espuma; 3. Pulverização de 5×10^7 conídios.mL⁻¹ de *M. anisopliae* sobre as ninfas com espuma; 4. Pulverização de 5×10^7 conídios.mL⁻¹ de *M. anisopliae* diretamente sobre as ninfas sem espuma. Os tratamentos foram aplicados na quantidade de 300 µL, utilizando uma pistola pulverizadora do tipo “Brush”, sobre as ninfas que por sua vez estavam sobre as raízes da muda de cana-de-açúcar. Cada tratamento contou com 10 repetições. Diariamente, as mudas foram molhadas com água destilada e mantidas em sala com fotofase de 12 horas a $25 \pm 3^\circ\text{C}$, durante o período de avaliação.

Foram feitas observações diárias para determinação da mortalidade e coleta dos adultos que emergiram. Os insetos mortos foram coletados, colocados em câmara úmida e mantidos à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12h de fotofase. O parâmetro mortalidade confirmada foi determinado pela análise visual da conidiogênese do fungo sobre o cadáver do inseto.

5.2.3 Patogenicidade sobre *Tenebrio molitor*, *Diatraea saccharalis* e *Mahanarva fimbriolata*

Foram realizados testes de patogenicidade com nove isolados de *M. anisopliae* e um isolado de *M. robertsii* sobre três insetos, sendo uma a praga alvo do estudo *M. fimbriolata* e duas espécies que vêm sendo usadas como modelos para bioensaios em nosso laboratório, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*. Dez isolados do gênero *Metarhizium* foram escolhidos aleatoriamente na coleção da ESALQ: ESALQ 1426, ESALQ 1204, ESALQ 1175, ESALQ 1116, ESALQ 1037, ESALQ 425, ESALQ 935, ESALQ 412, ESALQ 43, ESALQ 1641. Os conídios foram produzidos em meio de cultura B.D.A.

O delineamento experimental do bioensaio foi inteiramente aleatorizado. Para *D. saccharalis* e *T. molitor*, foram utilizadas larvas de terceiro ínstar sendo cada tratamento composto por seis repetições com 10 indivíduos cada.

Os insetos foram separados da dieta e com auxílio de uma peneira foram lavados rapidamente com água destilada. Após a lavagem, os insetos foram colocados em papel toalha a fim de retirar o excesso de água. Sessenta insetos por tratamento foram acondicionadas em placas de Petri (14 cm de diâmetro) e pulverizadas, com auxílio de pistola tipo “Brush”, com alíquotas de 2 mL de suspensão fúngica na concentração de 5×10^7 conídios.mL⁻¹ com 0,05% Tween 80®. A viabilidade dos conídios utilizados foi superior a 98% para todos os isolados, determinada pelo método descrito por Oliveira (2010). A testemunha recebeu 2 mL de água estéril mais 0,05% Tween 80®. Após a pulverização, os insetos foram mantidos por 15 minutos sobre a superfície pulverizada, a fim de aumentar o contato com os conídios do fungo. Posteriormente, grupos de 10 insetos foram acondicionados em placas de Petri (60 mm de diâmetro por 20 mm de altura), sendo as lagartas alimentadas diariamente com dieta artificial sem anti-contaminantes (formaldeído e nipagin) e as larvas com batata. Avaliações diárias foram realizadas por 13 dias para verificar a mortalidade. Os insetos mortos foram mantidos em câmara úmida para confirmar a infecção pelo patógeno.

Os bioensaios com *M. fimbriolata* seguiram a metodologia descrita no item 5.2.2 por ter se mostrado satisfatória, com valores de 8 a 12% de mortalidade para a testemunha após 28 dias da aplicação dos tratamentos. Resumidamente, o delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado contendo 11 tratamentos

(10 isolados e testemunha). Cada tratamento foi composto por 3 repetições com 10 ninfas de *M. fimbriolata*, entre 2º e 3º íntar. As ninfas da testemunha receberam apenas água destilada com 0,05% de Tween 80®.

Suspensões dos na quantidade de 1,5 mL foram aplicadas na concentração de 5×10^7 conídios.mL⁻¹ com 0,05% de Tween 80® utilizando uma pistola pulverizadora do tipo “Brush”, sobre as ninfas que por sua vez estavam sobre as raízes da muda de cana-de-açúcar. Diariamente, as mudas foram molhadas com água destilada e mantidas em sala com fotofase de 12 horas a $25 \pm 3^\circ\text{C}$, durante o período de avaliação. Foram feitas observações diárias por 13 dias para determinação da mortalidade. Os insetos mortos foram coletados, colocados em câmara úmida e mantidos à $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12h de fotofase. A mortalidade confirmada foi determinada pela análise visual da conidiogênese do fungo sobre o cadáver do inseto.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SAS® 9.1.3 (SAS, Institute Inc., 2003). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Para o cálculo da TL₅₀, os valores das mortalidades acumuladas foram submetidos à análise de Probit (FINNEY, 1971), com o auxílio do programa computacional Polo Plus.

5.2.4 Avaliação da expressão de genes relacionados a virulência de *Metarhizium anisopliae*

5.2.4.1 Preparo da cutícula dos insetos

A preparação da cutícula, para retirar o excesso de lipídeos e matéria orgânica foi realizada empregando o método descrito por Andersen (1980) modificado. Exemplos de *D. saccharalis*, *T. molitor* e *M. fimbriolata*, foram macerados, separadamente por espécie, em cadinho com 1% (p/v) de tetraborato de potássio. A mistura macerada foi centrifugada por cinco minutos a $5000 \times g$ em temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente a cutícula foi levada a estufa a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ para secagem. O pó da cutícula seca coletada foi lavado por duas vezes em 1% de tetraborato de potássio e água destilada, sendo as partículas flutuantes descartadas. Foi realizada novamente a secagem da cutícula em pó a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, a cutícula foi então armazenada a -20°C .

5.2.4.2 Cultivo do micélio fúngico

Com base nos resultados dos experimentos de patogenicidade foram selecionados três isolados para realização dos bioensaios de avaliação da expressão gênica, sendo eles ESALQ 1037, ESALQ 1641 e ESALQ 1204. ESALQ 1204 apresentou alta mortalidades, para *M. fimbriolata* e baixa mortalidade para *T. molitor* e *D. saccharalis*; ESALQ 1641 causou alta mortalidade a *T. molitor* e *D. saccharalis* e o isolado ESALQ 1037 utilizado comercialmente e usado como padrão para o controle de *M. fimbriolata* no laboratório de patologia da ESALQ, apresentou níveis variados de mortalidade entre as três espécies de insetos. . Os conídios dos isolados de *M. anisopliae*, foram produzidos em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Agar - BDA (Difco™, USA). As placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D. (Biological Oxygen Demand) por 7 dias, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 de fotofase.

Os conídios foram raspados com uma espátula de borracha, com cuidado para não liberar fragmentos do meio de cultura e a superfície do meio foi lavada com água destilada estéril para coletar os conídios. As suspensões foram filtradas assepticamente para remover os restos de hifas e centrifugadas a $2000 \times g$ por 2 min. sendo o sobrenadante descartado e os conídios novamente suspensos em água destilada estéril mais 0,01 % de Tween 80®. A contagem dos conídios foi feita em câmara de Neubauer a partir de diluições da suspensão original, para padronização da suspensão na concentração de 1×10^6 conídios.mL⁻¹.

Uma alíquota de 10 mL da suspensão de conídios de cada isolado foi inoculada em erlenmeyers (capacidade de 250 mL) contendo 50 mL de meio líquido Sabouraud enriquecido com extrato de levedura (SDY: 2,5 g.L⁻¹ de peptona bacteriológica, 10 g.L⁻¹ de dextrose, 2,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura). Os erlenmeyers foram mantidos em uma mesa agitadora orbital (modelo: MA 140 CFT, Marconi) programada para 125 rotações por minuto, a 26°C por 48 horas. As culturas foram lavadas com água destilada e 200 mg de peso fresco da biomassa fúngica foi transferida para um tubo Falcon (capacidade de 50 mL) contendo 20 mL de cada meio líquido: A) SDY; B) Meio mínimo (0,1% de KH₂PO₄, 0,05% de MgSO₄) sem cutícula; C) Meio mínimo acrescido de 0,1% de cutícula de *T. molitor*; D) Meio mínimo acrescido de 0,1% de cutícula de *D. saccharalis*; E) Meio mínimo

acrescido de 0,1% de cutícula de *M. fimbriolata*. O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado e cada tratamento foi composto por três repetições.

No momento da transferência do micélio produzido em meio SDY a ser usado como inóculo para os demais meios foram retiradas amostras de micélio de cada repetição de todos os tratamentos para análise de RNA. Amostras subsequentes foram retiradas 12, 24, 36 e 48 horas após a transferência do micélio para os novos meios acima descritos. Os tubos foram mantidos em uma mesa agitadora orbital (modelo: MA 140 CFT, Marconi) programada para 125 rotações por minuto, a 26 °C por até 48 horas.

As culturas provenientes de cada tratamento foram lavadas com água destilada e 200 mg de peso fresco da biomassa fúngica foi transferida imediatamente para nitrogênio líquido e posteriormente armazenada a -80 °C, onde o fungo permaneceu até a extração de RNA para analisar a expressão dos genes de virulência por PCR em tempo real.

5.2.4.3 Extração de RNA

Primeiramente as soluções, os equipamentos, as vidrarias foram tratados com água DEPC (dietilpirocarbonato) ativa, e posteriormente autoclavados, para evitar contaminação com RNases. Para a extração de RNA foi utilizado o produto comercial TRIZOL[®] (Invitrogen Life Technologies) que consiste numa solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato. As porções de 200 mg de micélio foram maceradas em nitrogênio líquido, tomando cuidado para não descongelar. O protocolo foi feito conforme sugerido pelo fabricante. De forma resumida, 1 mL do reagente TRIZOL[®] foi adicionado ao macerado em microtubos (1,5 mL) e vortexado. As amostras permaneceram a temperatura ambiente por 5 min e posteriormente foi centrifugada (12000 x g, 15 min a 4°C). À fase aquosa foi adicionado clorofórmio (200 µL) e a mesma foi submetida a agitação intensa por 15 segundos e posterior incubação a temperatura ambiente por 5 min, seguido de nova centrifugação (12000 x g, 15 min a 4°C). A mistura ficou separada em 3 fases: inferior orgânica (avermelhada contendo fenol), interfase e a superior aquosa, mais clara contendo o RNA. O RNA total foi precipitado com isopropanol (0,5 ml de isopropanol por 1 mL de TRIZOL usado). O pellet foi lavado com 1 mL de etanol 75% e após o descarte do etanol foi colocado para secar a temperatura ambiente por 10 min. O RNA total foi

ressuspendido em 30 µL de água livre de RNase e tratado com DEPC em banho maria por 10 min a 55°C para melhor homogenização. As amostras foram tratadas com DNase (Promega Corporation), o procedimento foi realizado conforme recomendação do fabricante. Logo após a ação da DNase mais 100 µL de água livre de RNase e tratada com DEPC foi adicionado às amostras que foram submetidas a mais uma extração com TRIZOL, exatamente conforme acima descrito. O RNA foi armazenado em freezer a -80°C.

O equipamento NanoDrop foi utilizado para verificar a pureza e concentração do RNA extraído. Todas as amostras apresentaram grau de pureza ente 1,9 e 2,1. Para síntese de cDNA a transcrição reversa foi realizada utilizando o Kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega), conforme recomendação do fabricante.

5.2.4.4 Reação de PCR quantitativa

Para a reação de PCR quantitativa, foi utilizado o Kit Thermo Fisher Maxima SYBR Green qPCR Master Mix. O protocolo foi realizado conforme recomendação do fabricante, porém com modificação da temperatura de anelamento. Resumidamente a reação consistiu de 25 µL contendo 12,5 µL de SyBR Green Master Mix (2X), 0,75 µM de cada primer, 5 µL cDNA (2 µg de RNA total por µL) e 6,6 µL de água ultra pura. As amostras foram submetidas a um ciclo de 50 °C por 2 min (pré-tratamento para UDG); um ciclo a 95°C por 10 min para desnaturação inicial; 40 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 15 s e anelamento com 56°C, 58°C ou 60°C por 30s e extensão a 72°C por 30s. A amplificação e a captura do sinal foram realizadas utilizando o 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems®).

Foram testados 14 pares de primers, sendo 9 genes relacionados a virulência e 4 genes de referência (Gdp, 18SRNA, Tryhk, Ubi) conforme pode ser observado na Tabela 5.1. Foram testadas para todos os primers as temperaturas de anelamento: 56, 58 e 60 °C. Na fase inicial de padronização, o produto das reações de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% para a visualização e a confirmação da amplificação de um único produto em tamanho compatível com o esperado. Com base nos resultados de amplificação foram selecionados para análise 3 iniciadores referentes aos genes relacionados a virulência (Pr1A, MPL e Mad1) e um gene de referência (Gpd).

Tabela 5.1 – Genes testados neste estudo

(continua)

Genes	Descrição do gene	Sequência dos Primres (5' - 3')	Referência
<i>pr1A</i>	Protease	CAC TCT TCT CCC AGC CGT TC TCG GCT TTG GAG GTA AGA GC	Shah et al. (2005)
<i>chy1</i>	Quimotripsina	AGA TCC TCC TTG GCC TTT TC GTT CGC TGG TGC TTG GAT TG	Shah et al. (2005)
<i>ste 1</i>	Esterase	TCT ACC ACG TTC TTC TCG CC GGC CCA GGT CCA AGG CTA CT	Shah et al. (2005)
<i>try 1a</i>	Tripsina	GCT GAC GAT GAA GGG GAA T GCT CTT TAT CTG CCC CTT TG	Shah et al. (2005)
<i>try 1b</i>	Tripsina	TCT TGT TGA ACG CCA ATA CG TTG CCA TGT GAT ATC CCA AA	Freimoser et al. (2005)
<i>try 2</i>	Tripsina	GAT TTC GGC TGA AGC TCA TT ATT GTC CAA GGC GAT GTT TT	Freimoser et al. (2005)
<i>Mad1</i>	Adesina	CCA CGG CGT CTG TTC CAG C CCA GCC CTG CGT TTC AAT TAA C	Wang e St. Leger (2007a)
<i>mpl</i>	Perilipina	GCG AGA AAG ATG AAA CCA GCC ACG AGG ACA ACA CTG TC	Wang e St. Leger (2007b)
<i>cag8</i>	Regulador da via de síntese de proteínas G	AAG CTG ATG GCT AGC GAT TC TTG CGG TTG GAA CGA CTT TG	Fang e Bidochka (2006)
<i>ssgA</i>	Hidrofobina	AAG CTG ATG GCT AGC GAT TC AGA CCA TTT TGC TGG ACA TTG	Fang e Bidochka (2006)

Tabela 5.1 – Genes testados neste estudo

(conclusão)

Genes	Descrição do gene	Sequência dos Primres (5' - 3')	Referência
<i>try</i>	Triptofano	TTG CAA TGC ATG TTT GAT GTC CAA AGA GTG GTA TCG AGT TAC	Fang e Bidochka (2006)
<i>ubi</i>	Ubiquitina	GAA CAA TTG GAG GGC AAG TC GTA GAT GGG AGT GGT GAA AG	Fang e Bidochka (2006)
<i>gpd</i>	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	GAC TGC CCG CAT TGA GAA G AGA TGG AGG AGT TGG TGT TG	Fang e Bidochka (2006)
<i>18sRNA</i>	RNA ribossômico	GGC ATC AGT ATT CAG TTG TC GTT AAG ACT ACG ACG GTA TC	Fang e Bidochka (2006)

5.2.4.5 Construção da curva padrão, verificação da eficiência dos primers e análise da expressão relativa dos genes

A partir de uma mistura de cDNA (padronizado para 2 µg de RNA total por µL) de amostras provenientes de todos os tratamentos dos experimentos foi realizado uma diluição seriada na ordem de 3X, nas seguintes concentrações: 1:4, 1:12, 1:36, 1:108, 1:324, 1:972, 1:2916. Para validar o método C_T comparativo de quantificação relativa, a eficiência de amplificação dos primers alvo ou de referência foi estimada utilizando a expressão $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$. O *slope* da curva de amplificação relativa e o R^2 foram determinados. Na construção dos gráficos de regressão linear foram utilizados 7 ou 5 pontos da diluição.

O software *Relative Expression Software Tool*- REST 2009 v2.013 (PFAFFL, 2001; PFAFFL et al., 2002) foi utilizado: para a análise dos dados que foi feita usando a correção para eficiência dos iniciadores, para normalização de cada uma das amostras analisadas, na qual calculou-se a variação quantitativa de expressão dos genes relacionados a virulência de forma relativa ao gene de referência *gpd* e para calcular a significância das alterações.

5.3 Resultados

5.3.1 Metodologia de bioensaios para avaliação de *Metarhizium* spp. sobre *Mahanarva fimbriolata* em laboratório e patogenicidade sobre *Tenebrio molitor*, *Diatraea saccharalis* e *M. fimbriolata*

A metodologia testada para aplicação de *M. anisopliae* sobre ninfas de *M. fimbriolata* mostrou-se satisfatória, pois mesmo após 28 dias a mortalidade das ninfas que não receberam fungo foi de $12,0 \pm 4,9$ % e $8,0 \pm 3,7$ para insetos que tiveram ou não a espuma retirada antes do bioensaio (Tabela 5.2.), respectivamente, valores aceitáveis para este tipo de bioensaio. A mortalidade pelo fungo das ninfas que tiveram a espuma retirada antes da pulverização foi semelhante àsquelas que tiveram a espuma preservada revelando que a espuma não interferiu na patogenicidade de *M. anisopliae* ou na susceptibilidade das ninfas.

Tabela 5.2 - Mortalidade total e confirmada de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* 28 dias após aplicação de *Metarhizium anisopliae* ESALQ 1037

Tratamentos		Mortalidade Total Média ± E.P ¹	Mortalidade Confirmada Média ± E.P ¹
<i>M. anisopliae</i>	Presença de espuma sobre as ninfas		
Não	Sim	8,0 ± 3,7 a	0 a
Não	Não	12,0 ± 4,9 a	0 a
Sim	Sim	42,0 ± 6,6 b	28,0 ± 8,6 b
Sim	Não	44,0 ± 11,7 b	32,0 ± 10 b

¹Médias ± erro padrão seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (P=0,05).

Todos os 10 isolados usados foram patogênicos a *M. fimbriolata* causando mortalidade total que variou de 64,4 ± 8,0% para o isolado ESALQ 412 a 91,8 ± 4,8% para o isolado ESALQ 1204 (Tabela 5.3). O tempo gasto pelo fungo para mortar 50% da população (TL₅₀) variou de 5,1 dias (IC: 4,7-5,5) para ESALQ 1426 a 9,9 dias (IC: 9,4-10,6) para ESALQ 425.

O único isolado de *M. robertsii* testado (ESALQ 1426) causou 91,3 ± 5,6% de mortalidade total e 70,7 ± 7,9% de mortalidade confirmada, apresentando a maior virulência medida pelo menor TL₅₀ de 5,1 dias (IC: 4,7-5,5), revelando o potencial desta espécie para o controle de *M. fimbriolata*.

Tabela 5.3 - Mortalidade total e confirmada de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* 13 dias após aplicação de *Metarhizium* spp. Tempos letais medianos (TL₅₀) em dias, intervalo de confiança (IC) (P>0,05)

Tratamento	Mortalidade Total (%)	Mortalidade Confirmada (%)	TL ₅₀ (dias)	IC a 95% (dias)
Testemunha	6,4 ± 3,1 b	-	-	-
ESALQ 412	64,4 ± 8,0 a	35,9 ± 10,6 b	7,5	7,0-8,0
ESALQ 1175	67,2 ± 12,7 a	29,0 ± 9,4 b	9,6	9,1-10,2
ESALQ 1037	76,9 ± 10,2 a	64,3 ± 7,8 ab	7,3	6,5-7,8
ESALQ 1116	77,6 ± 7,7 a	63,8 ± 9,7 b	8,1	7,4-8,9
ESALQ 425	77,8 ± 7,6 a	57,0 ± 10,3 ab	9,9	9,4-10,6
ESALQ 43	79,9 ± 5,6 a	59,5 ± 8,9 ab	7,8	7,3-8,2
ESALQ 1641	84,2 ± 5,8 a	66,0 ± 3,2 ab	6,8	6,3-7,2
ESALQ 935	88,3 ± 4,8 a	83,3 ± 4,9 a	6,6	5,9-7,1
ESALQ 1426	91,3 ± 5,6 a	70,7 ± 7,9 ab	5,1	4,7-5,5
ESALQ 1204	91,8 ± 4,8 a	83,6 ± 5,7 a	7,7	7,0-8,3
F	8,23	10,95		
p <	0,001	0,001		

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Duncan (P < 0,05).
Resultados referentes a média de dois experimentos

Os valores de mortalidade total observados na tabela 5.2 foram inferiores ao valores da tabela 5.3, ambos experimentos realizados com *M. fimbriolata*. Isto provavelmente deve estar associado ao menor volume de suspensão fúngica por unidade experimental utilizado no primeiro experimento (300 µL) comparado ao segundo (1,5 mL).

No bioensaio com *T. molitor* morreu no tratamento controle 1 inseto em apenas uma repetição, com média de 0,16% e no bioensaio com *D. saccharalis* não morreu nenhum inseto no tratamento controle. Os bioensaio de *D. saccharalis* e *T. molitor* foram avaliados até 20 dias após a pulverização, porém o último inseto morto contabilizado foi aos 11 e 12 dias, respectivamente. Para *M. fimbriolata* avaliou-se o o experimento de screening por 19 dias. Após essa data não havia mais ninfas, pois as que não morreram deram origem a adultos. Neste caso a última mortalidade observada foi após 13 dias. No experimento para testar a metodologia do bioensaio em *M. fimbriolata* as avaliações foram feitas até 28 dias com continuação da

avaliação mesmo após a emergência dos adultos, não tendo sido observado efeitos letais nos espécimens pulverizados com fungo e nem no controle após 13 dias .

Assim, como para *M. fimbriolata* todos os isolados foram patogênicos a *T. molitor* e *D. saccharalis*. Para *T. molitor* a mortalidade total média variou de 45% para os isolados ESALQ 935 e ESALQ 1204 a 85% para o isolado ESALQ 1175, com TL_{50} de 11, 11,9 e 7,1 dias respectivamente (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Mortalidade de lagartas de larvas de *Tenebrio molitor* 13 dias após a pulverização de *Metarhizium* spp. Tempos letais medianos (TL_{50}) em dias, intervalo de confiança (IC) ($P > 0,05$)

Isolado	Mortalidade Total (%)	Mortalidade Confirmada (%)	TL_{50} (dias)	IC a 95% (dias)
ESALQ 1641	73,3 $\pm$ 4,9 abc	73,3 $\pm$ 4,9 ab	8,3	7,1 - 10,4
ESALQ 43	55,0 $\pm$ 7,6 bc	53,3 $\pm$ 6,1 bc	10,6	8,7 - 16,9
ESALQ 412	63,3 $\pm$ 8,8 abc	61,6 $\pm$ 7,9 abc	10,6	8,8 - 16,8
ESALQ 935	50,0 $\pm$ 11,5 bc	45 $\pm$ 11,8 bc	11	9,1 - 18,3
ESALQ 425	76,7 $\pm$ 4,2 ab	76,7 $\pm$ 4,2 ab	8,4	7,4 - 10,1
ESALQ 1037	55,0 $\pm$ 9,9 bc	51,7 $\pm$ 9,5 bc	9,9	8,2 - 15,1
ESALQ 1116	78,3 $\pm$ 7,5 ab	78,3 $\pm$ 7,5 a	8,5	7,7 - 9,7
ESALQ 1175	85,0 $\pm$ 5,0 a	85,0 $\pm$ 5,0 a	7,1	6,2 - 8,1
ESALQ 1204	48,3 $\pm$ 7,9 c	45 $\pm$ 7,6 c	11,9	9,5 - 24,7
ESALQ 1426	68,3 $\pm$ 10,1 abc	66,7 $\pm$ 9,5 abc	9,5	8,2 - 12,7
F	2,26	2,96		
$p <$	0,03	0,006		

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Resultados referentes a média de dois experimentos

A mortalidade total média de *D. saccharalis* (Tabela 5.5) variou de 55,8% para os isolados ESALQ 425 e ESALQ 43 a 88% para o isolado ESALQ 1641. Os valores de TL_{50} variaram de 5,7 a 10,3 dias para os isolados ESALQ 1116 e ESALQ 43, respectivamente.

Tabela 5.5 - Mortalidade de lagartas de *Diatraea saccharalis* 13 dias após a pulverização de *Metarhizium* spp. Tempos letais medianos (TL₅₀) em dias, intervalo de confiança (IC) (P>0,05)

Isolado	Mortalidade Total (%)	Mortalidade Confirmada (%)	TL ₅₀ (dias)	IC a 95% (dias)
ESALQ 1641	88,7 ± 4,2 a	88,7 ± 4,2 a	5,6	4,7 - 6,6
ESALQ 43	55,8 ± 11,3 c	55,8 ± 11,3 c	10,3	7,9 - 18
ESALQ 412	87,5±4,8 ab	87,5 ± 4,8 ab	6,6	5,7 - 7,7
ESALQ 935	72,5 ± 4,2 abc	72,5 ± 4,2 abc	7,4	6,4 - 8,72
ESALQ 425	55,8 ± 12,3 c	55,8 ± 12,3 c	8,8	7,2 - 12,5
ESALQ 1037	58,6 ± 14,7 c	58,6 ± 14,7 c	9,2	7,7 - 13
ESALQ 1116	82,5 ± 7,5 abc	82,5 ± 7,5 abc	5,7	4,6 - 6,8
ESALQ 1175	82,5 ± 7,5 abc	82,5 ± 7,5 abc	7,1	6,1 - 8,3
ESALQ 1204	62,5 ± 7,8 bc	62,5 ± 7,8 bc	9,5	8,3 - 12,2
ESALQ 1426	77,5 ± 7,5 abc	77,5 ± 7,5 abc	7	6 - 8,3
F	2,29	2,29		
p<	0,04	0,04		

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Duncan (P < 0,05). Resultados referentes a média de dois experimentos

Não se observou grandes diferenças entre os isolados quanto a mortalidade a *T. molitor* e *D. saccharalis* exceto pelos isolados ESALQ 935 e ESALQ 425. O primeiro isolado causou mortalidades semelhante aos melhores isolados para *D. saccharalis*, mas não foi semelhante aos melhores isolados para *T. molitor*, sendo o contrário observado para o segundo isolado. Já para *M. fimbriolata*, não foram detectadas diferenças significativas entre os isolados quanto a mortalidade total. Também foi possível observar diferença no TL₅₀, sendo os menores valores observados para o isolado 1426 em *M. fimbriolata*, isolados 1175, 1116, 425 e 1641 para *T. molitor*, e 1641, 412, 935, 1116, 1175, 1426 para *D. saccharalis*.

5.3.2 Avaliação da expressão de genes relacionados a virulência de *Metarhizium anisopliae*

A metodologia de extração de RNA total a partir das amostras de micélio fúngico proporcionou a obtenção de RNA com boa qualidade, apresentando valores da razão de absorbância entre as leituras a 260 nm e 280 nm (A260/A280) próximos a 1,9 e com rendimento de aproximadamente 2 µg/µL por amostra.

Dos 14 pares de primers testados, empregando uma mistura de cDNA (padronizado para 2 µg de RNA total por µL) de amostras provenientes de todos os tratamentos dos experimentos, obteve-se sucesso na amplificação de 10 pares de iniciadores. Sendo 6 genes relacionados a virulência (Pr1A, Try 1b, cag8, MPL, Mad1, Try 1) e 4 genes de referência (Gdp, 18SRNA, Tryhk, Ubi). A temperatura de anelamento dos primers que conferiu melhores resultados foi de 58 °C.

Com base nos resultados de amplificação, nos valores de Ct (threshold cycle) e a partir dos dados gerados pela análise da curva de amplificação foram selecionados para análise 3 iniciadores referentes aos genes relacionados a virulência (Pr1A, MPL e Mad1) e um gene de referência (Gpd).

As curvas de amplificação obtidas a partir da diluição seriada de cDNA (Figura 5.5 a Figura 5.8) para os iniciadores Pr1A, MPL e Mad1 e Gpd (Figura 5.5 a Figura 5.8) resultaram em valores aceitáveis de inclinação variando entre -3,321 e -3,402; eficiência entre 96,8% e 100,3% e $R^2 \geq 0,994$. Além disso, foi observado que a eficiência de amplificação dos genes alvo foi semelhante a eficiência de amplificação do gene de referência. Com esses resultados foi possível validar o emprego do método de $\Delta\Delta C_t$ para a quantificação relativa da expressão gênica.

Figura 5.5 – Curva padrão da expressão do gene de referencia *gpd* calculada a partir de 5 pontos de diluição seriada de cDNA

Figura 5.6 – Curva padrão da expressão do gene alvo *pr1A* calculada a partir de 5 pontos de diluição seriada de cDNA

Figura 5.7 – Curva padrão da expressão do gene alvo *Mad1* calculada a partir de 7 pontos de diluição seriada de cDNA

Figura 5.8 - Curva padrão da expressão do gene alvo *mpl* calculada a partir de 7 pontos de diluição seriada de cDNA

A curva de dissociação gerada ao final dos ciclos de amplificação demonstrou que todos os oligonucleotídeos amplificaram um único fragmento, com ausência de amplificação inespecífica e dímeros de primer. As curvas de dissociação para os genes *pr1A*, *mpl*, *mad1* e *Gpd* podem ser observadas na Figura 5.9.

Figura 5.9 – Curva de dissociação para os genes *Gpd* (a), *mpl* (b), *pr1A* (c) e *mad1* (d). A amplificação e a captura do sinal foram realizadas utilizando o 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems®)

A expressão dos genes *pr1A*, *mad1* e *mpl* foi investigada utilizando meio mínimo com ou sem cutícula de insetos como indutor. De forma geral, o maior incremento na expressão relativa foi apresentada pelo gene *pr1A* que provocou incremento de quase 126 mil vezes após 48 horas de cultivo do fungo ESALQ 1037

em MM mais cutícula de *M. fimbriolata* em comparação ao controle cultivado em meio SDY instantes antes da transferência para o meio indutor. Incrementos muito inferiores foram observados para os genes *mad1* e *mpl*, sendo os maiores incrementos observados para o isolado ESALQ 1204 após 48 horas de cultivo em MM mais cutícula de *M. fimbriolata*, (12,4 vezes) e para o isolado ESALQ 1037 após 24 horas de cultivo em MM mais cutícula de *T. molitor* (39,2 vezes), respectivamente (Tabela 5.6).

Para todos os isolados observou-se incremento na expressão do gene *pr1A* quando o fungo foi transferido do meio SDY (controle) para o meio indutor MM sem a presença de cutícula (Figura 5.10), com níveis de expressão gênica muito superiores àqueles do controle. Porém a indução da expressão gênica de *pr1A* foi variável durante o tempo de cultivo no meio indutor e apresentou diferenças entre os isolados. ESALQ 1204 apresentou pico de indução com 24 horas de cultivo em MM, enquanto que os isolados ESALQ 1037 e ESALQ 1641, apesar de não terem sido avaliados com 36 horas, apresentaram pico na expressão após 48 horas de cultivo em meio indutor. A maior expressão no meio indutor foi do isolado ESALQ 1037 com expressão relativa de 51197 ± 12969 .

A expressão de *pr1A* no meio indutor MM pelo isolado ESALQ 1204 foi mais rápida do que nos outros meios apresentando maiores valores que todos tratamentos após 12 horas. O pico de expressão em MM ocorreu após 24 h, o mesmo observado para MM com cutícula de *M. fimbriolata*. A expressão de *pr1A* deste isolado em MM com cutícula de *T. molitor* e *D. saccharalis* foi crescente tendo o pico de expressão ocorrido na última avaliação após 48h sendo os valores bem maiores no primeiro meio em relação ao segundo.

Para o isolado ESALQ1641 observou maiores valores de expressão relativa de *pr1A* quando o fungo foi colocado em MM e MM mais *M. fimbriolata*, seguidos por MM mais *T. molitor*, sendo pequenas as diferenças de expressão entre 24h e 48h nestes meios.

A expressão relativa de *pr1A* do isolado ESALQ 1037 cultivado em MM e MM mais *M. fimbriolata* aumentou durante todo o período experimental com as mais elevadas induções após 48h enquanto que no meio MM mais *T. molitor* observou-se redução de 12h até 48h.

De forma geral a adição de cutícula de *D. saccharalis* ao MM não induziu ou causou discreta indução na expressão do gene *pr1A* para os três isolados estudados.

Não foram observados incrementos na expressão gênica relativa de *mad1* em relação ao grupo controle (micélio fúngico em meio SDY no tempo 0 h) quando os três isolados ESALQ 1204, ESALQ 1641 e ESALQ 1037 foram cultivados em meio mínimo (MM) e em MM contendo cutícula de *D. saccharalis*, *T. molitor* e *M. fimbriolata* durante todo o período experimental, exceto para ESALQ 1204 após 48h, onde observou-se aumento da expressão gênica quando foram cultivados em MM contendo cutícula de *D. saccharalis*, *T. molitor* ou *M. fimbriolata*.

Diferentemente do observado para os outros genes, a expressão relativa de *mpl* foi crescente até 48h em MM contendo cutícula de *D. saccharalis* para os isolados ESALQ 1204 e ESALQ 1641, enquanto para ESALQ 1037 uma pequena indução foi observada nas duas primeiras avaliações. . Já o cultivo em MM contendo cutícula de *T. molitor* incrementou em mais de 5 vezes a expressão relativa de *mpl* para os 3 isolados após 48h.

Figura 5.10 – Expressão gênica relativa de *pr1A* em relação ao grupo controle (micélio fúngico em meio SDY no tempo 0 h) dos isolados ESALQ 1204 (a), ESALQ 1641 (b) e ESALQ 1037 (c) cultivados em meio mínimo (MM) e em MM contendo cutícula de *D. saccharalis*, *T. molitor* e *M. fimbriolata* após 12, 24, 36 (apenas para ESALQ 1204) e 48 horas de inoculação. Dados normalizados pela expressão do gene de referência *gpd*

Figura 5.11 – Expressão gênica relativa de *mad1* em relação ao grupo controle (micélio fúngico em meio SDY no tempo 0 h) dos isolados ESALQ 1204 (a), ESALQ 1641 (b) e ESALQ 1037 (c) cultivados em meio mínimo (MM) e em MM contendo cutícula de *D. saccharalis*, *T. molitor* e *M. fimbriolata* após 12, 24, 36 (apenas para ESALQ 1204) e 48 horas de inoculação. Dados normalizados pela expressão do gene de referência *gpd*

Figura 5.12 – Expressão gênica relativa de *mpl* em relação ao grupo controle (micélio fúngico em meio SDY no tempo 0 h) dos isolados ESALQ 1204 (a), ESALQ 1641 (b) e ESALQ 1037 (c) cultivados em meio mínimo (MM) e em MM contendo cutícula de *D. saccharalis*, *T. molitor* e *M. fimbriolata* após 12, 24, 36 (apenas para ESALQ 1204) e 48 horas de inoculação. Dados normalizados pela expressão do gene de referência *gpd*

Tabela 5.6 - Expressão gênica relativa de *pr1A*, *mad1* e *mpl* em relação ao grupo controle (micélio fúngico em meio SDY no tempo 0 h) dos isolados ESALQ 1204, ESALQ 1037 e ESALQ 1641 cultivados em meio mínimo (MM) e MM contendo cutícula de *D. saccharalis*, *T. molitor* e *M. fimbriolata* após 12, 24, 36 (apenas para ESALQ 1204) e 48 horas de inoculação. Dados normalizados pela expressão do gene de referência *gpd* (continua)

Iniciador	Tratamento	ESALQ 1204		ESALQ 1037		ESALQ 1641	
		Expressão Relativa Média ± EPM	valor de <i>p</i>	Expressão Relativa Média ± EPM	valor de <i>p</i>	Expressão Relativa Média ± EPM	valor de <i>p</i>
Pr1A	MM 12 h	2566,25 ± 689,34	0	3522,62 ± 893,87	0	517,28 ± 50,23	0
	MM 24 h	13763,75 ± 3697,91	0	11958,72 ± 3030,93	0	6383,26 ± 630,15	0
	MM 36 h	1681,61 ± 450,04	0	...	...	...	...
	MM 48h	4695,79 ± 1261,26	0	51197,86 ± 12969,08	0	9032,47 ± 103,13	0
	MM+ <i>T. molitor</i> 12 h	266,83 ± 71,68	0	1511,35 ± 383,25	0	44,81 ± 1,63	0
	MM+ <i>T. molitor</i> 24 h	1576,07 ± 422,07	0	341,66 ± 86,69	0	1346,05 ± 38,14	0
	MM+ <i>T. molitor</i> 36 h	3031,79 ± 801,11	0	...	...	...	...
	MM+ <i>T. molitor</i> 48 h	21568,06 ± 5793,93	0	6,37 ± 1,61	0	1273,28 ± 43,16	0
	MM+ <i>D. saccharalis</i> 12 h	...	...	1,21 ± 0,3	0,841	0,34 ± 0,03	0,336
	MM+ <i>D. saccharalis</i> 24 h	...	...	1,5 ± 0,38	0,674	3,08 ± 0,08	0,347
	MM+ <i>D. saccharalis</i> 36 h	12,48 ± 3,35	0	...	...	...	...
	MM+ <i>D. saccharalis</i> 48 h	39,4 ± 10,58	0,179	0,6 ± 0,15	0,347	3,15 ± 0,44	0
	MM+ <i>M. fimbriolata</i> 12 h	198,61 ± 53,35	0	704,73 ± 178,83	0	1174,24 ± 73,95	0
	MM+ <i>M. fimbriolata</i> 24 h	20709 ± 5561,71	0	11210,79 ± 2833,28	0	7116,96 ± 419,72	0
	MM+ <i>M. fimbriolata</i> 36 h	15935,13 ± 4280,28	0	...	...	...	...
	MM+ <i>M. fimbriolata</i> 48 h	9705,77 ± 2605,03	0	125978,91 ± 31773,69	0	4012,53 ± 49,76	0

Tabela 5.6 - Expressão gênica relativa de *pr1A*, *mad1* e *mpl* em relação ao grupo controle (micélio fúngico em meio SDY no tempo 0 h) dos isolados ESALQ 1204, ESALQ 1037 e ESALQ 1641 cultivados em meio mínimo (MM) e MM contendo cutícula de *D. saccharalis*, *T. molitor* e *M. fimbriolata* após 12, 24, 36 (apenas para ESALQ 1204) e 48 horas de inoculação. Dados normalizados pela expressão do gene de referência *gpd* (continuação)

Iniciador	Tratamento	ESALQ 1204		ESALQ 1037		ESALQ 1641	
		Expressão Relativa Média ± EPM	valor de <i>p</i>	Expressão Relativa Média ± EPM	valor de <i>p</i>	Expressão Relativa Média ± EPM	valor de <i>p</i>
Mad1	MM 12 h	0,32 ± 0,01	0	1,57 ± 0,25	0,165	0,92 ± 0,03	0,171
	MM 24 h	0,12 ± 0,02	0	1,18 ± 0,13	0,497	0,56 ± 0,01	0,17
	MM 36 h	0,07 ± 0	0	...	...	...	...
	MM 48h	0,44 ± 0,06	0,176	0,78 ± 0,04	0	0,26 ± 0,02	0
	MM+ <i>T. molitor</i> 12 h	0,56 ± 0	0	0,86 ± 0,02	0	1,07 ± 0,12	0,827
	MM+ <i>T. molitor</i> 24 h	1,19 ± 0,07	0,177	0,77 ± 0,05	0	1,06 ± 0,02	0
	MM+ <i>T. molitor</i> 36 h	0,56 ± 0	0	...	...	...	...
	MM+ <i>T. molitor</i> 48 h	2,53 ± 0,18	0	0,95 ± 0,13	0,662	0,97 ± 0,02	0,318
	MM+ <i>D. saccharalis</i> 12 h	...	...	0,28 ± 0	0	0,51 ± 0,02	0,169
	MM+ <i>D. saccharalis</i> 24 h	0,9 ± 0,06	0,318	0,67 ± 0,01	0	0,63 ± 0,03	0
	MM+ <i>D. saccharalis</i> 36 h	0,72 ± 0,08	0,157	...	...	...	...
	MM+ <i>D. saccharalis</i> 48 h	4,24 ± 0,40	0	0,97 ± 0,02	0,506	1,10 ± 0,03	0
	MM+ <i>M. fimbriolata</i> 12 h	0,27 ± 0	0	0,16 ± 0	0	0,67 ± 0,04	0
	MM+ <i>M. fimbriolata</i> 24 h	0,07 ± 0,01	0	0,43 ± 0,08	0,318	1,17 ± 0,08	0
	MM+ <i>M. fimbriolata</i> 36 h	0,61 ± 0,03	0,176	...	...	...	...
	MM+ <i>M. fimbriolata</i> 48 h	12,4 ± 2,87	0	0,56 ± 0,02	0	0,28 ± 0,01	0

Tabela 5.6 - Expressão gênica relativa de *pr1A*, *mad1* e *mpl* em relação ao grupo controle (micélio fúngico em meio SDY no tempo 0 h) dos isolados ESALQ 1204, ESALQ 1037 e ESALQ 1641 cultivados em meio mínimo (MM) e MM contendo cutícula de *D. saccharalis*, *T. molitor* e *M. fimbriolata* após 12, 24, 36 (apenas para ESALQ 1204) e 48 horas de inoculação. Dados normalizados pela expressão do gene de referência *gpd* (conclusão)

Iniciador	Tratamento	ESALQ 1204		ESALQ 1037		ESALQ 1641	
		Expressão Relativa Média ± EPM	valor de <i>p</i>	Expressão Relativa Média ± EPM	valor de <i>p</i>	Expressão Relativa Média ± EPM	valor de <i>p</i>
MPL	MM 12 h	1,79 ± 0,09	0,178	0,01 ± 0	0	0,62 ± 0,06	0,164
	MM 24 h	4,2 ± 0,21	0	0,77 ± 0,02	0,185	1,10 ± 0,03	0
	MM 36 h	4,17 ± 0,15	0,159	...	...	...	...
	MM 48h	2,23 ± 0,11	0	34,74 ± 1,72	0	0,65 ± 0,02	0
	MM+ <i>T. molitor</i> 12 h	2,61 ± 0,07	0,321	7,81 ± 0,58	0	1,43 ± 0,08	0,167
	MM+ <i>T. molitor</i> 24 h	2,02 ± 0,31	0	39,22 ± 7,79	0	0,80 ± 0,1	0,503
	MM+ <i>T. molitor</i> 36 h	6,7 ± 0,17	0	...	...	...	...
	MM+ <i>T. molitor</i> 48 h	5,36 ± 0,14	0,169	9,95 ± 1,59	0	5,15 ± 0,13	0
	MM+ <i>D. saccharalis</i> 12 h	...	...	3,89 ± 0,05	0	1,05 ± 0,1	0,657
	MM+ <i>D. saccharalis</i> 24 h	3,85 ± 0,96	0	3,78 ± 0,09	0,168	2,46 ± 0,26	0
	MM+ <i>D. saccharalis</i> 36 h	15,83 ± 0,41	0	...	...	...	...
	MM+ <i>D. saccharalis</i> 48 h	21,66 ± 1,42	0	1,19 ± 0,1	0,151	12,95 ± 0,63	0
	MM+ <i>M. fimbriolata</i> 12 h	1,13 ± 0,03	0,158	0,28 ± 0,01	0	0,51 ± 0,05	0
	MM+ <i>M. fimbriolata</i> 24 h	1,25 ± 0,03	0	0,01 ± 0	0,181	0,52 ± 0,01	0,166
	MM+ <i>M. fimbriolata</i> 36 h	6,98 ± 1,11	0,158	...	...	...	...
	MM+ <i>M. fimbriolata</i> 48 h	2,91 ± 0,07	0	0,68 ± 0,18	0,669	0,53 ± 0,05	0,161

5.4 Discussão

A metodologia de bioensaio em laboratório de aplicação de *Metarhizium* sobre ninfas de *M. fimbriolata* foi satisfatória, pois em todos os experimentos realizados neste trabalho a mortalidade da testemunha que recebeu apenas água destilada estéril mais espalhante adesivo foi inferior a 12%,

Os bioensaios com menores mortalidades de *M. fimbriolata* no controle foram obtidos por Macedo et al. (2006) que conseguiram diminuir a mortalidade da testemunha para 20% quando utilizaram Torre de Potter para pulverizar as ninfas sobre placa de Petri e posteriormente transferiram os insetos para raízes de cana-de-açúcar, porém a avaliação só foi realizada até o quinto dia após a pulverização do fungo. Esse curto período experimental não é adequado, pois conforme observado aqui o TL_{50} dos fungos testados variou de 5,1 a 9,9 dias. Desta forma, é essencial proporcionar condições adequada ao desenvolvimentos dos insetos por um período maior para determinar a ação do fungo. O sucesso da metodologia aqui desenvolvida, provavelmente deve-se aos seguintes fatos: proporcionar para a ninfa um período de ambientação anterior a aplicação do fungo; utilizar o substrato natural de alimentação que são raízes de plantas vivas e saudáveis; evitar manipular as ninfas após receber o tratamento. Esse conjunto de fatores proporcionaram menor estresse aos insetos resultando em baixa mortalidade natural.

As ninfas de *M. fimbriolata*, assim como os cercopídeos de uma forma geral, secretam espuma que tem como função proteger o inseto imaturo da desidratação formando um microclima com umidade e temperatura favorável ao desenvolvimento do inseto, além de servir de proteção a possíveis inimigos naturais (predadores, parasitóides e patógenos). Especulou-se que essa espuma poderia proteger a ninfa contra ação do fungo entomopatogênico, e o tempo em que estão sem a proteção da espuma configura um período de maior vulnerabilidade do inseto (WHITTAKER, 1970). Porém, foi demonstrado aqui que a presença da espuma não interferiu na ação de *Metarhizium* sobre ninfas de *M. fimbriolata*. A espuma é formada de líquidos eliminados pelo ânus e de uma substância mucilagínosa secretada pelas glândulas epidérmicas denominadas glândulas de “Batelli” (GUIBEAU, 1908) e pelos resultados aqui observados parecem não apresentar compostos que inibem a germinação e/ou crescimento do fungo. O espaço proporcionado pelas bolhas de ar presentes na espuma não foi um fator impeditivo para o contato dos conídios com a

cutícula do inseto. Estudos para entender como os conídios atingem o inseto dentro da espuma são necessários.

A dificuldade em criar *M. fimbriolata* e manter uma quantidade de insetos provenientes de campo em laboratório é uma das principais limitações para condução de bioensaios para seleção de isolados de *M. anisopliae* patogênicos a esta espécie. Foi mostrado neste estudo que existe uma suscetibilidade diferencial entre as 3 espécies de insetos testados a *M. anisopliae* e dificilmente a seleção para uma espécie alternativa levaria aos melhores isolados a serem usados para *M. fimbriolata*. Entre os melhores isolados para *T. molitor* e *D. saccharalis* estão ESALQ 1641, ESALQ 1116, ESALQ 1175, ESALQ 425 e ESALQ 412. Destes, apenas ESALQ 1641 está entre os que apresentaram menor TL_{50} para *M. fimbriolata*. Por outro lado, *M. anisopliae* ESALQ 1204 provocou mortalidade confirmada de 45% em *T. molitor*, 62,5% em *D. saccharalis* e 83,62% em *M. fimbriolata*, com TL_{50} de 11,9, 9,5 e 7,7 dias respectivamente. *M. robertsii* ESALQ 1426 também apresentou virulência diferenciada para os três insetos com valores de TL_{50} de 9,5 dias para *T. molitor*, 7 dias para *D. saccharalis* e 5,1 dias *M. fimbriolata*. Outro resultado discrepante foi apresentado pelo isolado ESALQ 1175 que apresentou mortalidade confirmada elevada, acima de 82% para *T. molitor* e *D. saccharalis* e baixa, 29% para *M. fimbriolata*.

O gene *pr1A* é responsável pela codificação da principal enzima de *M. anisopliae* que degrada o tegumento do inseto durante o processo de infecção sendo considerado como um dos principais fatores de virulência de *M. anisopliae* (BAGGA et al., 2004). Dos três genes avaliados *pr1A* foi o que sofreu maior indução quando os fungos foram cultivados em MM, pobre em nutrientes, e MM contendo cutícula de *T. molitor* ou *M. fimbriolata*. A presença de cutícula de *D. saccharalis* no meio não resultou no mesmo efeito que as demais, principalmente para os fungos ESALQ 1037 e ESALQ 1641, com baixos valores de expressão de *pr1A*. Bagga et al. (2004) sugerem que não só *Pr1A*, mas as 10 isoformas da enzima tem a sua produção influenciada pelo tipo de cutícula do hospedeiro. Mohanty et al. (2008) avaliaram atividade da enzima *Pr1* quando cultivaram *M. anisopliae* em meio de cultura contendo cutícula de uma das três espécies de mosquitos, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* ou *Anopheles stephensi* e observaram que a CL_{50} de conídios foi menor para *C. quinquefasciatus*, em relação a *A. aegypti* e a *A. stephensi*, enquanto que a atividade de *Pr1* foi maior para *C. quinquefasciatus*,

demonstrando uma alta correlação entre a virulência do fungo, dada pela CL₅₀, e a atividade de Pr1.

A alta expressão de *pr1A* observada nos momentos iniciais de desenvolvimento de *M. anisopliae* no presente trabalho é fato comum e extensivamente descrito (St. LEGER, et al., 1986, 1989; St. LEGER, 1995).

A magnitude da expressão de *pr1A* foi drasticamente aumentada pela privação de nutrientes em MM. Embora esse gene parece apresentar resposta específica para diferentes cutículas, a privação de nutrientes é um fator conhecido por estimular a produção de proteases, incluindo a enzima Pr1A e sugere-se que a expressão deste gene esteja mais relacionado a disponibilidade de nutrientes do que propriamente a qualidade dos mesmos (FREIMOSER et al., 2003; St. LEGER et al., 1991, 1994).

Wang e St. Leger (2005) ao avaliar os genes diferencialmente expressos por *M. anisopliae* observaram que Pr1A e Try2 foram os transcritos mais abundantes quando o fungo foi cultivado na cutícula de *Manduca sexta* em comparação a hemolinfa e exudados de raízes. Freimoser et al. (2005) observaram variações nos padrões de expressão dos genes relacionados à virulência de *M. anisopliae* em respostas a cutículas de diferentes hospedeiros e meios de cultura. Estes autores transferiram o fungo para meio mínimo (MM), ou meio mínimo mais cutícula de diferentes insetos após um período de crescimento em um meio rico em nutrientes. A expressão da subtilisina *pr1A* foi regulada positivamente em MM, e em maior medida no meio contendo cutículas de insetos. Resultados semelhantes foram observados no presente estudo apenas para o isolado ESALQ 1204, quando cultivado em meio contendo cutícula de *M. fimbriolata*.

O gene *Mad1* é responsável pela codificação de adesinas que permitem a adesão de *Metarhizium* na cutícula do hospedeiro, sendo que a falta deste gene provoca atrasos na germinação, restringe a formação de blastosporos e reduz drasticamente a virulência do fungo a insetos. No presente estudo, observou-se que o cultivo em meio mínimo ou em meio mínimo com cutícula de insetos não induziu a expressão de *Mad1* quando o meio rico foi considerado com normalizador. Resultados esses consistentes com os observados por Wang e St. Leger (2007a) que relataram que esse gene é regulado positivamente em meio rico (SDB - Sabouraud Dextrose Broth), além disso os autores relatam uma baixa quantidade de transcritos desse gene nos estágios iniciais de desenvolvimento do fungo, o mesmo

só foi detectado em meio mínimo após 12 horas de cultivo do fungo. *Mad 1* normalmente é induzido durante o processo de aumento do turgor do conídio e durante o crescimento do fungo em contato com a hemolinfa do inseto hospedeiro (WANG; St. LEGER, 2007a).

O gene *mpl* é responsável pela codificação de uma perilipina, proteína que normalmente está associada a estocagem de lipídeos em mamíferos. Este gene está relacionado a regulação da lipólise controle do turgor apressorial e diferenciação nas estruturas de infecção em *M. anisopliae*. Isolados que tiveram este gene silenciado mostraram um menor turgor no apressório devido a uma estocagem deficitária de lipídeos nessas células, com isso a virulência desses isolados foi comprometida quando testados sobre larvas de *M. sexta* (WANG; St. LEGER, 2007b). No presente trabalho apenas o isolado ESALQ 1204 apresentou regulação positiva de *mpl* quando o fungo foi cultivado em meio mínimo e em meio contendo cutícula de insetos durante as 48 horas de avaliação. A expressão em meio contendo cutícula de *D. saccharalis* foi regulada positivamente e aumentaram em magnitude com o tempo. Para os demais isolados os resultados foram inconsistentes, apresentando expressão relativa positivamente ou negativamente reguladas.

Outros genes como *cag8* (regulador da via de síntese de proteínas G), *ssgA* (hidrofobina), *try 1* e *try 2* (tripsina), *ste 1* (esterase) e *chy1* (quimotripsina) são também conhecidos por estar envolvidos no processo de infecção de *Metarhizium* ao hospedeiro e tem sua virulência afetada negativamente quando os mesmos são silenciados. Iniciadores correspondentes a estes genes foram testado na fase inicial deste estudo, porém sua utilização foi descartada. Porém, isso não indica que esses genes não foram expressos pelo três isolados estudados, mas provavelmente a metodologia empregada não foi adequada, ou mesmo que o tempo avaliado foi insuficiente para detectar a expressão desses genes.

Os resultados de expressão relativa dos genes de virulência do fungo parecem isoladamente não correlacionar com a virulência diferencial de *M. anisopliae* as espécies de insetos testadas *in vivo*. Embora a concentração de conídios utilizada tenha sido discriminatória para *T. molitor* e *D. saccharalis*, não detectou diferenças significativas na mortalidade total de *M. fimbriolata* e em todos os insetos a mortalidade dos isolados foi superior a 50%. Desta forma, seria

importante determinar a CL₅₀ dos isolados para comparar com a expressão especialmente *Pr1A*.

Referências

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 11, p. 289-382.

ALVES, S.B.; LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; MARQUES, E.J. Produção massal de fungos entomopatogênicos na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. cap. 8, p. 215-238.

ANDERSEN, S.O. Cuticular sclerotization. In: MILLER, T.A.; NAKADAI, T.; NASUNO, S.; IGUCHI, N. **Cuticle techniques in Arthropods**. New York: Springer-Verlag, 1980. p. 185-217.

BAGGA, S.; HU, G.; SCREEN, S.E.; St. LEGER, R.J. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, Amsterdam, v. 324, p. 159-169, Jan. 2004.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 333 p.

FREIMOSER, F.M.; HU, G.; ST. LEGER, R.J. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. **Microbiology**, Reading, v. 151, p. 361-371, Feb. 2005.

FREIMOSER, F.M.; SCREEN, S.; BAGGA, S.; HU, G.; St. LEGER, R.J. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. **Microbiology**, Reading, v. 149, n. 1, p. 239-247, Jan. 2003.

FREITAS, A.F.; LOUREIRO, E.S.; ALMEIDA, M.E.B.; PESSOA, L.G.A. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) para o controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n. 2, p.247-254, Abr./Jun. 2012.

GARCIA, J.F. **Técnica de criação e tabela de vida de *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae)**. 2002. 59 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P. Laboratory rearing technique of *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, p. 73-76, Jan./Feb. 2007.

GUILBEAU, B.H. The origin and formation of the froth in spittle-insects. **The American Naturalist**, Chicago, v. 42, n. 504, p. 783-798, Dec. 1908.

LOUREIRO, E.S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; PESSOA, L.G.A. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok. contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera:Cercopidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 5, p. 791-798, set./out. 2005.

MACEDO, D.; ALVES, S.B.; VIEIRA, S.A. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. a *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 47-52, 2006.

MOHANTY, S.S.; RAGHAVENDRA, K.; DASH, A.P. Induction of chymoelastase (Pr1) of *Metarhizium anisopliae* and its role in causing mortality to mosquito larvae. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 10, p. 2283-2288, Oct. 2008.

OLIVEIRA, D.G.P. **Proposta de um protocolo para avaliação da viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos e determinação da proteção ao calor conferida a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pela formulação em óleo emulsionável**. 2010. 89 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 2003-2007, May 2001.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 9, p. 2-10, May 2002.

SHAH, F.A.; WANG, C.S.; BUTT, T.M. Nutrition influences growth and virulence of the insectpathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 251, n. 2, p. 259-266, Oct. 2005.

SMALL, C.L.N.; BIDOCHKA, M.J. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 3, p. 307-313, Mar. 2005.

St. LEGER, R.J. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, n. 1, p. 1119-1125, 1995.

St. LEGER, R.J.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 313, n. 1, p. 1-7, Aug. 1994.

St. LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 48, n. 1, p. 85-95, July 1986.

St. LEGER, R.J.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Changes in translatable mRNA species associated with nutrient deprivation and protease synthesis in *Metarhizium anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 137, p. 807-815, Apr. 1991.

St. LEGER, R.J.; BUTT, T.M.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, Orlando, v. 13, n. 3, p. 253-262, Sept. 1989.

St. LEGER, R.J.; ALLEE, L.L.; MAY, B.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, n. 12, p. 1007–1015, Dec. 1992.

WANG, C.; St. LEGER, R.J. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 6, n. 5, p. 808-816, May 2007a.

_____. The *Metarhizium anisopliae* perilipin homolog MPL1 regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure and virulence. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 282, p. 21110-21115, 2007b.

WANG, C.; HU, G.; St. LEGER, R. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudates and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanism of physiological adaptation. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, n. 8, p. 704-718, Aug. 2005.

WANG, C.; TYPAS, M.A.; BUTT, T.M. Detection and characterisation of Pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 213, n. 2, p. 251-255, Aug. 2002.

WHITTAKER, J.B. Cercopid spittle as a microhabitat. **Oikos**, Copenhagen, v. 21, n. 1, p. 59-64, Jan. 1970.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A diversidade genética de isolados brasileiros de *Metarhizium* foi explorada com êxito neste trabalho com a identificação de duas linhagens predominantes e observação de três possíveis novas espécies distintas das descritas atualmente. Levando em consideração a importância do fungo *Metarhizium* dentro dos programas de controle biológico no Brasil sugere-se que as possíveis novas espécies continuem sendo foco de estudo para futura descrição a fim de evitar que tais descobertas acabem por esquecidas.

Três regiões do DNA nuclear foram analisadas para acessar a diversidade e proporcionar a identificação específica de isolados de *Metarhizium*. O melhor resultado neste sentido foi alcançado com a concatenação de três marcadores (5'-TEF, MzIGS3 e FG543) que produziu uma filogenia altamente resolvida e bem suportada para o clado PARB, demonstrando a sua utilidade para resolver a filogenia do grupo e acessar a diversidade das populações do entomopatógeno. Quando analisadas isoladamente observou-se que a região MzIGS3 foi a que proporcionou um maior grau de resolução genética entre os isolados, porém a mesma foi incapaz de reconstruir uma filogenia bem suportada. A filogenia gerada por MzIGS3 foi incongruente com as topologias apresentadas por 5'-TEF e FG543, já que não conseguiu suportar o monofiletismo tanto de *M. anisopliae* sl quanto de *M. robertsii* s.l.. A incapacidade de MzIGS3 em recapitular a filogenia consenso para o clado PARB torna complicado a sua utilização como uma ferramenta diagnóstica única para a identificação de espécies ou análise filogenética de *Metarhizium*. À luz destes resultados, recomenda-se a continuação do uso de 5'-TEF como marcador primário para identificação de espécies. Porém, ressalta-se que o acesso a diversidade apresenta ganho considerável quando o marcador MzIGS3 é empregado.

A investigação de ocorrência de *Metarhizium* em canaviais surpreendeu ao mostrar *M. robertsii* como espécie predominante no solo, já que todos os isolados provenientes de cigarrinhas estudados no capítulo 3 foram identificados como *M. anisopliae*. Assim, esperava-se encontrar essa segunda espécie como predominante no agroecossistema da cana-de-açúcar. Porém, esses resultados abriram novas perspectivas para o desenrolar de pesquisas visando o conhecimento da dinâmica das populações das espécies de *Metarhizium* em plantios de cana-de-açúcar. Além

disso, os dados gerados no capítulo 4 podem contribuir para a seleção de marcadores adequados que possibilitem monitorar o comportamento dos fungos entomopatogênicos nativos e comerciais nos campos nos quais tem se empregado o manejo das cigarrinhas com *Metarhizium*.

Foi desenvolvida uma técnica de bioensaio em laboratório para avaliação de patogenicidade de *Metarhizium* spp. sobre *M. fimbriolata* que proporcionou baixa mortalidade na testemunha. Além disso, também realizou a caracterização da expressão de genes relacionados à virulência, *pr1A*, *mad1* e *mpl*, de três isolados de *M. anisopliae* (ESALQ 1037, ESALQ 1641 e ESALQ 1204) e aparentemente não foi observada associação entre a expressão relativa dos genes e a patogenicidade e virulência dos fungos *in vivo*. Ao iniciar este trabalho foi levantada a hipótese da possibilidade de substituir o bioensaio de seleção de isolados e o teste de virulência por uma análise de expressão gênica dos genes relacionados à virulência, utilizando como ferramenta molecular a PCR em tempo real. Da mesma forma, o estudo da atividade de genes poderia ser empregado como referência no controle da qualidade de bioinseticidas para monitorar as mudanças na virulência em função, por exemplo, do tempo de armazenamento do produto. Porém, os dados aqui gerados não suportam a utilização da técnica PCR em tempo real como ferramenta em estudos de seleção de isolados e no controle de qualidade do fungo comercializado.