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

**Monitoramento de *Metarhizium* spp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) por
marcadores moleculares em plantios de cana-de-açúcar**

Natasha Sant’Anna Iwanicki

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2015**

Natasha Sant'Anna Iwanicki
Engenheira Agrônoma

Monitoramento de *Metarhizium* spp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) por marcadores moleculares em plantios de cana-de-açúcar

Orientador:
Prof. Dr. **ITALO DELALIBERA JÚNIOR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2015**

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

Iwanicki, Natasha Sant'Anna

Monitoramento de *Metarhizium* spp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) por marcadores moleculares em plantios de cana-de-açúcar / Natasha Sant'Anna Iwanicki. - - Piracicaba, 2015.

68 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Controle biológico 2. *Metarhizium anisopliae* 3. Marcadores moleculares
4. Microsatélite 5. Diversidade genética 6. Monitoramento ambiental I. Título

CDD 633.61
I96m

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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ivania Sant'Anna e Jacek Lech Iwanicki, pela força, amor, carinho e pelas oportunidades e orientações que me ofereceram para conseguir chegar até aqui.

*Aos meus amáveis irmãos, Lara Sant'Anna Iwanicki e André Sant'Anna Iwanicki, pelo
companheirismo e amizade*

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP) e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Prof. Dr. Italo Delalibera Júnior pela orientação, oportunidade e confiança em meu trabalho;

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ USP, pelos ensinamentos transmitidos durante o período do curso;

À equipe do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos pelos ensinamentos, auxílios e companheirismo;

As Doutoradas Vanessa da Silveira Duarte, Janayne Rezende, Celeste D'Alessandro e Ana Beatriz Zanardo pelas orientações e ensinamentos;

À minha colega de Laboratório e amiga Ana Carolina de Oliveira dos Santos pela ajuda e orientação nos experimentos de campo e laboratório;

À Dra. Maria Imaculada Zucchi e aos alunos Jaqueline Bueno de Campos e Dr. Alessandro Alves Pereira do Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento do Departamento de Genética da ESALQ-USP pela orientação e ajuda na parte de biologia molecular deste trabalho;

À equipe da Usina Iracema, especialmente, Jader Sahade da Silva e André Geovane Oliveira Rizzo, pelo apoio nos experimentos de campo;

Ao Lucas Sartori e Laís Penna pelos auxílios em campo e laboratório;

À Patrícia Zambon do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CEBEMEG) da Unicamp, pelo apoio e serviços prestados;

À Dra Ingeborg Klingen do Norwegian Institute of Bioeconomy Research (NIBIO) pelos ensinamentos, orientações e oportunidades oferecidas;

À minha família e amigos pelos estímulos, confiança, apoio e carinho;

“ Foi o tempo que dedicou a sua rosa, que a fez tão importante”

(O Pequeno Príncipe)

Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 A importância da cultura da cana-de-açúcar.....	17
2.2 Cigarrinha-das-raízes: <i>Mahanarva fimbriolata</i> (Stål).....	17
2.3 O fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metchn.) Sorokin	19
2.4 Marcadores moleculares: um enfoque nos microssatélites	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Localização da área	23
3.2 Produção e aplicação de <i>M. anisopliae</i> em campo	24
3.3 Amostragem de solo, raiz e cigarrinhas-das-raízes	25
3.4 Isolamento do fungo <i>Metarhizium</i> spp. de amostras de solo, raiz e cigarrinha-das-raízes	28
3.5 Extração de DNA	30
3.6 Genotipagem.....	31
3.7. Análise dos dados de genotipagem	33
3.8. Amplificação, sequenciamento, edição e alinhamento múltiplo.....	34
3.9. Análise dos dados de sequenciamento.....	35
4 RESULTADOS	37
4.1 Isolamento de <i>Metarhizium</i> de solo, raiz e inseto	37
4.1.1 Isolados recuperados de solo e raiz	37
4.1.2. Amostragem de cigarrinha-das-raízes e isolados recuperados.....	37
4.2 Genotipagem e Sequenciamento.....	40
4.2.1 Extração de DNA Genotipagem e AMOVA.....	40
4.2.2 Monitoramento ambiental do isolado aplicado	44
4.2.3 Sequenciamento o gene 5'-TEF.....	45
5 DISCUSSÃO.....	49
REFÊRENCIAS	53
ANEXO.....	65

RESUMO

Monitoramento de *Metarhizium* spp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) por marcadores moleculares em plantios de cana-de-açúcar

O objetivo deste estudo foi caracterizar a diversidade de *Metarhizium* em um plantio de cana-de-açúcar e monitorar a eficácia e persistência do isolado ESALQ 1604 de *M. anisopliae*, após aplicação em campo, através de técnicas moleculares. Isolados foram recuperados de amostras de solo, raiz e cigarrinha-das-raízes infectadas de duas áreas de um canavial em Iracemápolis-SP, uma com aplicação do fungo (isolado ESALQ 5310) e colheita mecânica e outra sem aplicação e colheita manual antecedida por queimada. Os isolados de insetos foram recuperados de ninfas e adultos coletados 51, 42 e 1 dia (s) antes da aplicação do fungo e 7, 30, 60 e 90 dias após a aplicação. Isolados de solo e raiz foram obtidos 90 dias pré-aplicação do fungo e 30 e 90 dias pós-aplicação. A aplicação de *M. anisopliae* foi realizada em 09/01/15 com suspensão de $3,72 \times 10^6$ conídios viáveis/mL numa vazão de 150L/ha. Nas análises moleculares também foram incluídos 22 isolados provenientes das mesmas áreas coletados em 18/12/2012. A diversidade haplotípica de *Metarhizium* foi obtida pela genotipagem de 10 marcadores microssatélites para 213 isolados provenientes de amostras de solos, 22 de raízes e 73 de cigarrinha-das-raízes. A identificação específica dos fungos foi obtida pelo sequenciamento do gene 5'-TEF de 57 isolados provenientes de solos, 6 de raízes e 14 de cigarrinha-das-raízes selecionados dentre os diferentes haplótipos gerados pelas análises dos marcadores microssatélites. Dentre os 310 isolados genotipados, foram obtidos 156 haplótipos do fungo, destes, 132 provenientes de isolados de solo, 17 de raízes e 20 de cigarrinha-das-raízes. A maior diversidade haplotípica foi encontrada nos solos $h=0,989$ e a menor em insetos $h=0,779$. A divergência genética entre isolados provenientes de insetos, solos e raízes foi significativa ($\Phi_{ST}=0.303$), sendo a maior proporção da variação dentro (69,6 %) do que entre (30,3 %) esses grupos. A mortalidade de cigarrinha-das-raízes por *M. anisopliae* antes da aplicação variou de 0 a 14,8% para ninfas e 7,3-18,1% para adultos. Sete dias após a aplicação, observou-se 50% de mortalidade confirmada de ninfas e 10,7% de adultos. O isolado aplicado em campo foi recuperado somente em cigarrinha-das-raízes e nas coletas 7, 30 e 60 dias pós-aplicação, compreendendo 50%, 50% e 70,5% de todos os insetos mortos por *M. anisopliae*, respectivamente. A população da praga reduziu após 90 dias e não foram observadas cigarrinhas infectadas nesta amostragem. No solo, foram encontradas as espécies *M. robertsii* (clados Mrob 1, Mrob 2 e Mrob 4), *M. anisopliae* (Mani 1 e Mani 2) e *M. brunneum*. Em raízes foram encontradas as espécies *M. brunneum* e *M. anisopliae* (Mani 2). Em adultos e ninfas de cigarrinha-das-raízes foram encontrados somente haplótipos de um único clado (Mani 2) de *M. anisopliae*, e o isolado ESALQ 5310 aplicado nos anos anteriores na área não foi recuperado. Os resultados obtidos neste trabalho revelam a grande diversidade haplotípica de *Metarhizium* spp. e o impacto das populações locais de *M. anisopliae* na regulação de cigarrinhas em cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Controle biológico; *Metarhizium anisopliae*; Marcadores moleculares; Microssatélite; Diversidade genética; Monitoramento ambiental

ABSTRACT

Molecular monitoring of *Metarhizium* spp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) in sugarcane plantations

The aim of this study was to characterize the diversity of *Metarhizium* in a sugarcane plantation and to monitor the efficacy and persistence of the isolate ESALQ 1604 of *M. anisopliae* after field application, by molecular techniques. Isolates were recovered from samples of soil, root and infected spittlebugs of two areas in Iracemápolis-SP: one with application of the fungus (isolate ESALQ 5310) and mechanical harvesting and another without fungal application and manual harvest preceded by burning. The isolates from insects were recovered from nymphs and adults collected 51, 42 and 1 day (s) before application of the fungus and 7, 30, 60 and 90 days after application. Isolates of soil and root were obtained 90 days pre-application of the fungus and 30 and 90 days post-application. The application of *M. anisopliae* was carried out in 9/Jan/15 with suspension of $3,72 \times 10^6$ viable conidia/mL at a volume rate of 150 l/ha. In the molecular analyses, 22 isolates from the same areas collected in 18/12/2012 were also included. The haplotype diversity of *Metarhizium* was obtained by genotyping 10 microsatellite markers of 213 isolates from soil samples, 22 from roots and 73 from spittlebugs. The specific identification of fungi was obtained by sequencing the gene 5'-TEF of 61 isolated from soil, 6 from root and 13 from spittlebug selected among the different haplotypes generated by analysis of microsatellite markers. Among 310 isolates genotyped, 156 haplotypes of the fungus were obtained, of these, 132 from soil isolates, 17 of root and 20 of spittlebug. The highest haplotype diversity was found in soil $h=0.989$ and the smallest in spittlebug $h = 0.779$. The genetic divergence among isolates from insect, soil and root was significant ($\Phi_{ST} = 0.303$), being the largest proportion of the variation within (69.6%) than among (30.3%) these groups. The mortality of spittlebugs by *M. anisopliae* before application ranged from 0 to 14.8% for nymphs and 7.3-18.1% for adults. Seven days after application, 50% of nymph mortality and 10.7% of adult mortality was observed. The isolate applied on the field was recovered only in spittlebugs and only 7, 30 and 60 days, post-application, and accounted for 50%, 50% and 70.5% of all insects killed by *M. anisopliae*, respectively. The pest population reduced after 90 days and no spittlebug infected was observed in this sample date. The species and clades found in isolates from soil were *M. robertsii* (clades Mrob 1, Mrob 2 and Mrob 4), *M. anisopliae* (Mani 1 and Mani 2) and *M. brunneum*. In roots the species found were *M. brunneum* and *M. anisopliae* (Mani 2). In adults and nymphs of spittlebug only haplotypes of a single clade (Mani 2) of *M. anisopliae* were found. The isolate ESALQ 5310 applied in previous years in the area was never recovered. The results obtained in this work revealed the great diversity of haplotype *Metarhizium* spp. and the impact of local populations of *M. anisopliae* on population regulation of spittlebugs in sugarcane.

Keywords: Biological control; *Metarhizium anisopliae*; Molecular markers; Microsatellite; Genetic diversity; Environmental monitoring

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) representa um importante grupo de fungos entomopatogênicos de ampla distribuição mundial (ZIMMERMANN, 2007). São encontrados no solo, em insetos e na rizosfera de plantas (ROCHA et al., 2013; SASAN; BIDOCHKA, 2013). Produtos formulados a base deste fungo são usados na agricultura no mundo todo, atuando assim, como agentes de controle biológico de diversas ordens de insetos pragas (ALVES, 1998). No Brasil, *Metarhizium anisopliae* (Metchn.) Sorokin é a espécie do fungo com maior número de registros de produtos no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), além de ser o entomopatógeno mais comercializado pelas empresas e produzido em larga escala por usinas de cana-de-açúcar para controle de um importante grupo de pragas, as cigarrinhas do gênero *Mahanarva* spp.

Estudos de diversidade de *Metarhizium* nos ambientes de solo, raiz e insetos vem sendo realizados por muitos autores no mundo. No Brasil, já foram encontradas as espécies: *M. anisopliae*, *M. acridum*, *M. majus*, *M. flavoviride*, *M. pingshaense*, *M. robertsii*, *M. lepidiotae* e mais três espécies indeterminadas: *Metarhizium* sp indet..1, *Metarhizium* sp indet..2 e *Metarhizium* sp indet..3 (ROCHA et al., 2009; ROCHA et al., 2012; LOPES et al., 2013; ZANARDO, 2015; REZENDE, 2014), porém, poucos estudos foram conduzidos para entender a diversidade de *Metarhizium*, sendo que alguns destes estudos, enfocaram na caracterização dos isolados encontrados em coleção de microrganismos. Sabe-se hoje que a diversidade de espécies de *Metarhizium* encontrada no solo é grande. *M. robertsii* e *M. anisopliae* são as espécies com mais registros de ocorrência no país, sendo *M. robertsii* muito encontrado em solos de cinco biomas brasileiros e sob as mais diversas coberturas vegetais (ZANARDO, 2015, ROCHA et al., 2013, REZENDE 2014). *M. anisopliae* é a espécie mais encontradas infectando insetos (REZENDE et al., 2015; LOPES et al., 2013; ALVES et al., 2004). Em cana-de-açúcar, já foram encontradas as espécies *M. robertsii*, *M. anisopliae*, *Metarhizium* sp indet. 1 e *Metarhizium* sp indet.4 (ZANARDO, 2015; REZENDE 2014). Diferente da alta diversidade de espécies em solo, somente foi observado um clado de *M. anisopliae* infectando naturalmente cigarrinha-das-raízes (REZENDE et al., 2015).

Nos estudos de Rezende (2014), foram obtidos apenas cinco isolados das espécies *M. robertsii* e *M. anisopliae* associados a raízes de cana-de-açúcar, sendo este o único resultado sobre diversidade de espécies de *Metarhizium* em raízes no país.

O Brasil é um grande produtor de cana-de-açúcar e segundo estimativa de Zengzhi et al (2010), em 2008 mais de um milhão de hectares de cana-de-açúcar foram tratados com o

fungo *M. anisopliae* para controle de cigarrinhas do gênero *Mahanarva*. Acredita-se que o uso deste fungo hoje no país ultrapasse dois milhões de hectares anualmente. Porém, pouco se sabe sobre os impactos naturais do fungo *Metarhizium* em cigarrinhas e sobre a eficácia e persistência das aplicações do mesmo neste agroecossistema. Sendo assim, devido a importância da cultura para o país e da abrangência da adoção do controle biológico com *Metarhizium* spp, estudos de monitoramento do fungo aplicado em campo são necessários para que se conheça o sucesso no controle da praga alvo, assim como, para entender sua ecologia na parte aérea e no ambiente edáfico. Este monitoramento é feito através da constatação da mortalidade da praga pelo fungo e recuperação dos mesmos nos solos, raízes e insetos. Porém, sabe-se que esses métodos de monitoramento são imprecisos, pois devido a ocorrência natural desses fungos no ambiente, não é possível diferenciar morfológicamente um isolado aplicado em campo daqueles já presentes na área.

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, uma nova frente de pesquisa, a aplicação de marcadores moleculares na agricultura vem ganhando destaque nos últimos anos. Os marcadores moleculares são ferramentas precisas, capazes de detectar polimorfismos de DNA nas diferentes populações de uma determinada espécie, sendo assim, considerada uma técnica ideal para que se consiga monitorar e estudar a ecologia de fungos entomopatogênicos naturalmente existentes e aplicados em campos agrícolas.

Neste contexto, os principais objetivos do presente trabalho foram: i) caracterizar a diversidade genética de *Metarhizium* spp em cigarrinha-das-raízes, solo e raiz de cana-de-açúcar em áreas com e sem aplicação do fungo; ii) desenvolver um marcador molecular do tipo microssatélite para um isolado comercial do fungo *M. anisopliae*, e ii) monitorar este isolado comercial após aplicação em plantio de cana-de-açúcar, através da recuperação de isolados provenientes de amostras de solo, raiz, adultos e ninfas de cigarrinha-das-raízes durante um período de três meses.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A importância da cultura da cana-de-açúcar.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) está entre as culturas de maior importância econômica no Brasil. A indústria sucroenergética é responsável pela geração de 4,5 milhões de empregos e de 12% do Produto Interno Bruto (PIB) (UNICA, 2012). Em 2012, mais de 9,6 milhões de hectares de cana foram plantados no Brasil sendo 5 milhões apenas no estado de São Paulo (FAOSTAT, 2015). Apesar das atuais crises do setor, estão se expandindo as possibilidades de negócios gerados a partir da cana-de-açúcar. Temos observado o surgimento de novas biorrefinarias, aumento nos investimentos em P&D em bioplásticos (DA SILVA et al., 2012) e intensificação dos estudos na área de bioeletricidade (LOPES, 2013). A tendência em aumentar o percentual de energia gerada, proveniente de combustíveis renováveis, fez com que muitos países colocassem o etanol em suas pautas de importação.

Neste cenário promissor para o setor, incentivos e programas governamentais estão sendo criados para aumentar a eficiência na produção de cana-de-açúcar. Com a finalidade de desenvolver novas tecnologias que aumentem a eficiência agrícola do setor, foi lançado em fevereiro de 2014 o programa PAISS Agrícola – Programa de Apoio à Inovação Tecnológica Agrícola no Setor Sucroenergético. Para ilustrar a importância do novo programa, a presidente da UNICA, Elizabeth Farina, destacou que 60% do custo de produção de etanol e açúcar estão na área agrícola (UNICA, 2014). Dentre esses custos, destacam-se os gastos com insumos para o controle de pragas e doenças.

Como consequência da mudança radical na forma da colheita da cultura da cana, por meio do Decreto-Lei Estadual nº 42.056/9, que dispõe sobre a proibição da queimada da cana para colheita e da adoção do corte mecanizado, os canaviais ganharam um aumento significativo de matéria orgânica depositada no solo, o que por consequência tem favorecido a ocorrência de pragas e doenças, tais como: percevejos, besouros, cupins, formigas cortadeiras, cigarrinhas, fungos, bactérias, nematoides e plantas daninhas infestantes que antes eram eliminadas com a queima (NAKANO, 2011).

2.2 Cigarrinha-das-raízes: *Mahanarva fimbriolata* (Stål).

As cigarrinhas são consideradas importantes insetos-pragas de pastagens e da cana-de-açúcar. No Brasil, são quatro as principais espécies de cigarrinhas que atacam a cana, todas

pertencentes ao gênero *Mahanarva* (Hemiptera: Cercopidae): As cigarrinhas-das-raízes correspondem as espécies *M. fimbriolata* (Stal), *M. spectabilis* (Distant, 1909) e *M. liturata* (Le Peletier; Serville, 1825) (ALVES; CARVALHO, 2014) e a cigarrinha-da-folha é representada pela espécie *M. posticata* (Stal) (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). A espécie *M. fimbriolata* a mais comumente encontrada em canaviais no Brasil (ALVES; CARVALHO, 2014).

A cigarrinha das raízes, *M. fimbriolata* é um hemíptera da família Cercopidae, de hábitos crepusculares com um ciclo biológico de aproximadamente 80 dias. Os adultos vivem de 15 a 20 dias (GALLO et al., 2002) e após o acasalamento, as fêmeas colocam entre 310 e 380 ovos na superfície da palhada, próximo a base das touceiras. Após cerca de 20 dias, ocorre a eclosão das ninfas que permanecem no solo, se alimentando da seiva das raízes e produzindo espuma, na qual, ficam submersas por aproximadamente 37 dias, quando então, emergem os adultos e o ciclo recomeça (GARCIA, 2002). No Brasil, são relatados três picos populacionais de cigarrinhas das raízes em canaviais da região sudeste; o primeiro, de maior intensidade, ocorre no início das chuvas, entre outubro e novembro, o segundo pico ocorre nos meses de janeiro e fevereiro e um último pico, de menor intensidade entre março e abril (DINARDO-MIRANDA, 2007).

As formas jovens da cigarrinha extraem grande quantidade de água e nutrientes das raízes. Os adultos sugam a seiva das folhas e injetam toxinas, causando necrose nos tecidos foliares (ALVES; CARVALHO, 2014). Além de reduzir a produtividade de colmos, estes insetos alteram a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar, utilizada como matéria-prima na indústria, através da redução do teor de açúcar nos colmos e aumento do teor de fibras (DINARDO-MIRANDA et al., 2014). Nas pastagens, são responsáveis por causar amarelecimento das folhas e diminuir o valor nutritivo das mesmas (GALLO et al., 2002).

No estado de São Paulo, a eliminação gradual da prática de colheita da cana-de-açúcar sem queima prévia da palha, promoveu aumentos significativos nas populações da cigarrinha das raízes, *M. fimbriolata* (DINARDO-MIRANDA; GIL, 2007). As condições de umidade e temperatura proporcionadas pela presença da palha no solo favorecem o desenvolvimento de insetos como a cigarrinha-das-raízes, *M. fimbriolata* (RAVANELI et al., 2011). A queima da palha de cana a fogo, antes da colheita, contribuiu para redução da praga, pois causava destruição significativa de todas as formas biológicas da praga, especialmente dos ovos em diapausa (BALBO JR.; MOSSIM, 1999).

O controle de *M. fimbriolata* em usinas e áreas de pastagem é feito através da aplicação do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* (ALVES, 1998; BATISTA FILHO et al. 2002;

TEIXEIRA,2010) ou através da aplicação de inseticidas como Carbofuran, Thiamethoxam, Fipronil (DINARDO-MIRANDA et al. 2001; NOVARETTI et al. 2001).

2.3 O fungo *Metarhizium anisopliae* (Metchn.) Sorokin

Metarhizium spp são fungos ascomicetos pertencentes a família Clavicipitaceae. Embora recentes descobertas atribuam novas funções ecológicas a este grupo de fungos, foi pela sua patogenicidade a insetos que o gênero *Metarhizium* veio a ser reconhecido.

Recentemente, Bischoff et al. (2009) em estudos filogenéticos multilocus, concluíram que o que se conhecia por *M. anisopliae*, na verdade compreende um complexo de nove espécies: *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum*, *M. majus*, *M. lepidiotae*, *M. brunneum*, *M. globosum* e *M. robertsii*, sendo estas duas últimas, descritas naquele trabalho.

Este grupo de fungos pode ser encontrado em diferentes habitats nas mais diversas regiões do mundo. Permanecem no solo por longos períodos sem a presença do inseto hospedeiro (BIDOCHKA et al., 2001; BRUCK, 2005; NISHI et al., 2011) e conseguem colonizar e sobreviver na rizosfera de plantas (HU; LEGER, 2002; VEGA, 2008; WYREBEK et al., 2011; KHAN et al., 2012; SASAN; BIDOCHKA, 2012)

Existem registros de que *Metarhizium* spp conseguem infectar mais de 200 espécies de insetos e outros artrópodes (ROBERTS; HAJEK, 1992). Segundo Zimmermann (1993), besouros, gafanhotos, cigarrinhas e cupins, representam os grupos de insetos mais susceptíveis a estes fungos. Por esses motivos, espécies de *Metarhizium* estão entre as mais estudadas pela comunidade científica mundial na área de controle biológico de pragas.

Dentre as vantagens da utilização de fungos no controle biológico, quando comparado a outros organismos adotados neste tipo de controle, estão: a facilidade de produção das unidades infectivas em escala comercial, formulações que permitem a aplicação em campo através da utilização dos mesmos maquinários empregados para aplicação de defensivos químicos, baixo custo de produção, maior tempo de prateleira do que macrorganismos e baixo impacto ambiental (ALVES et al., 1998; ORLANDELLI; PAMPHILE, 2011). A espécie *M. anisopliae* destaca-se por ser considerada uma das mais produzidas no mundo no que concerne a formulação de biopesticidas (ZIMMERMAN, 2007), inclusive no Brasil.

O sucesso da utilização deste fungo no Brasil concretizou-se no programa de controle biológico da cigarrinha *M. posticata* na cultura da cana-de-açúcar na região nordeste do país. Estudos demonstraram uma eficiência de 60 a 100% no controle das populações da cigarrinha

em canaviais do Estado de São Paulo (DINARDO-MIRANDA et al., 2004; LOUREIRO et al., 2012). Estima-se que mais de um milhão de hectares de cana-de-açúcar foram tratados com o fungo *M. anisopliae* em 2008 (ZENGZHI et al., 2010) sendo este um dos maiores programas de controle microbiano de insetos do mundo (BETTIOL; MORANDI, 2009). No Brasil, existem atualmente onze produtos registrados contendo em sua formulação o fungo *M. anisopliae* (AGROFIT, 2015). Estes produtos são empregados nas culturas da cana-de-açúcar e pastagens em geral. O alvo principal de controle são as cigarrinhas das pastagens pertencentes ao gênero *Deois* spp. e *Notozulia* spp. e as cigarrinhas que atacam tanto as pastagens como a cana-de-açúcar: *M. fimbiolata* e *M. posticata*. Apesar dos registros se restringirem a essas pragas, a aplicação de *M. anisopliae* produz bons resultados no controle de outras pragas como cupins, carrapatos e formigas (HUSSAIN et al., 2011; QUINELATO et al., 2012; CASTILHO et al., 2010; GARCIA, 2008).

2.4 Marcadores moleculares: um enfoque nos microssatélites

Nas últimas décadas, grandes avanços nas pesquisas na área de agricultura foram obtidos pela popularização e maior acessibilidade as técnicas para estudos do DNA e RNA. A biologia molecular aplicada à agricultura pode envolver diversas áreas, estando entre as principais: a genômica de plantas e artrópodes, a transgenia e o desenvolvimento de marcadores moleculares. No que se refere aos estudos de ecologia microbiana, a aplicação de técnicas moleculares, baseadas na análise do DNA trouxeram grandes avanços, permitindo assim, um maior entendimento da biologia e filogenia de fungos e bactérias (BIDOCHKA et al., 1994; RANJARD et al., 2000; WANG et al., 2004; OULEVEY et al., 2009; PAVARIPOLL et al., 2011, REZENDE., 2015; PATTEMORE et al., 2014; SCHNEIDER et al., 2012; D’ALESSANDRO et al., 2014)

Um marcador molecular é um “locus” polimórfico que caracteriza o genótipo do indivíduo que o possui. Portanto, marcadores moleculares podem ser derivados de qualquer tipo de dado molecular que forneça um polimorfismo detectável entre os organismos a serem comparados (SALLES et al., 2003).

Os métodos de marcação molecular podem ser reunidos em duas grandes categorias: os marcadores do tipo RFLP (Análise de restrição de fragmentos polimórficos), fundamentado na presença de variabilidade nas sequências de nucleotídeos do DNA genômico após digestão por enzimas de restrição (BOTSTEIN et al., 1980) e os marcadores baseados no método da reação em cadeia da polimerase (PCR) que compreendem as técnicas:

Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso (RAPD), Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP), Microssatélite (SSR) (CARRER ; BARBOSA ; RAMIRO, 2010; SCHLÖTTERER, 2004).

Devido a maior acessibilidade aos métodos de sequenciamento genético e marcação molecular, muitos autores estão buscando estudar divergências filogenéticas ou procuram entender melhor a dinâmica e ecologia desses fungos no ambiente, o que antes não era possível apenas com conhecimentos sobre a morfologia dos mesmos. Dentre os métodos, os mais aplicados para caracterização de isolados de *Metarhizium* spp. são: RAPD (BIDOCHKA et al., 2001), RFLP (VELÁSQUEZ et al., 2007) e SSR ou microssatélites (ENKERLI et al., 2005; OULEVEY et al., 2009; FREED et al., 2010; KEPLER et al., 2015).

A utilização de microssatélites (SSR) vêm ganhando destaque nos estudos filogenéticos, de estrutura populacional e diversidade genética de fungos. Estes marcadores consistem em sequências repetidas em tandem de um a seis nucleotídeos, encontradas dispersas em todo o genoma (JARNE; LAGODA, 1996). O polimorfismo é representado pela variação no número de elementos repetidos que constituem o microssatélite, os quais produzirão fragmentos de diferentes tamanhos (CARRER, BARBOSA, RAMIRO, 2010). Os marcadores SSR caracterizam-se por serem codominantes, abundantes, dependentes de pequena quantidade de DNA dos indivíduos analisados e uma vez obtidos os iniciadores (“primers”) informativos para uma espécie/isolado, os custos e a demanda de mão-de-obra são reduzidos drasticamente, e os ensaios laboratoriais são rápidos, aumentando assim a acessibilidade da técnica (SALLES et al., 2003).

Nos estudos de Enkerli et al. (2005) e Oulevey et al., (2009) foram descritos 41 microssatélites reconhecidos para o gênero *Metarhizium*. As espécies para as quais foram reconhecidos com esses microssatélites foram: *M. anisopliae*, *M. brunneum* e *M. robertsii*, porém, mais recentemente, Mayerhofer et al. (2015) também validou entre 15 a 34 regiões de microssatélite daquelas 41 descritas anteriormente para as espécies, *M. guizhouense*, *M. lepidiotae*, *M. majus* e *M. pingshaense*.

Estudos que utilizaram marcadores do tipo microssatélites para diferenciar isolados de *Metarhizium* spp (VELÁSQUEZ et al., 2007; KEPLER et al., 2015; STEINWENDER et al., 2011) demonstraram a eficiência desta técnica, podendo assim, ser considerada uma ferramenta eficaz para estudos de monitoramento de produtos formulados aplicados em campo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização da área

Os experimentos de campo foram conduzidos em um canavial pertencente a Usina Iracema, localizado na cidade de Iracemápolis no estado de São Paulo (Figura 1). Neste canavial, duas glebas foram utilizadas para o experimento, sendo uma anualmente tratada com *Metarhizium anisopliae* e colhida mecanicamente ($22^{\circ}36'10''\text{S}$, $47^{\circ}33'17''\text{W}$) e outra onde nunca foi aplicado o fungo e colhida manualmente após a queima ($22^{\circ}36'30''\text{S}$, $47^{\circ}33'23''\text{W}$). O solo das glebas é classificado como Latossolo Vermelho Eutrófico. As variedades de cana foram SP80-3280 na área com aplicação e RB975952 e RB966928 na área sem aplicação. No momento do início do experimento, a cana da área tratada encontrava-se no 4º corte e a da área não tratada no 9º corte. As mesmas glebas deste estudo, foram utilizadas por Rezende (2014) para amostragem de solo e raiz em dezembro de 2012.

Figura 1 – Localização das áreas de cana-de-açúcar na Usina Iracema em Iracemápolis-SP, onde foi realizada a coleta de solos, raízes e insetos para isolamento de *Metarhizium* spp. Detalhe da área amostrada: Área do canavial com aplicação de *Metarhizium* sp. e área do canavial sem aplicação de *M. anisopliae*. Retângulos em cinza representam a parcela amostral

3.2 Produção e aplicação de *M. anisopliae* em campo

O isolado ESALQ1604 de *M. anisopliae* proveniente da Coleção de Microrganismos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, foi escolhido para aplicação em campo. A escolha por este isolado foi devido ao fato dele ter sido um haplótipo único em duas análises filogenéticas inferidas com 96 (REZENDE et al., 2015) e 318 sequências (ZANARDO, 2015) de isolados de *Metarhizium* spp. coletados em todo o Brasil, com base na região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3. Este isolado é comercializado pela empresa BIOTECH® com o nome de Biotech G.

O fungo foi produzido em 25kg de arroz parboilizado no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ/USP. A aplicação do fungo foi realizada no dia 09 de janeiro de 2015 com início às 10h da manhã sob temperatura de 28°C, com uma suspensão de $3,72 \times 10^6$ conídios viáveis/mL numa vazão de 150L/ha. O volume total de calda aplicada, contendo fungo na concentração de $5,58 \times 10^{11}$ conídios/ha e espalhante adesivo Tween® 80 (0,05%), foi de 1800L aplicados em 12 ha. A aplicação ocorreu com o auxílio de um pulverizador autopropelido com capacidade de tanque para 3000 litros (Figura 2). A máquina foi equipada com 36 bicos de leque duplo do modelo TTJ60, Tijet 05. O espaçamento entre bicos foi regulado para 50cm, a aplicação foi ajustada colocando a barra de aplicação na altura da folha da cana para que os pingentes de aplicação entrassem aproximadamente 50cm dentro da cultura fornecendo assim, uma boa cobertura de aplicação. A cana encontrava-se com aproximadamente 2m de altura.

Figura 2 – Aparato para lavagem do arroz com fungo na Usina (a). Tanque com arroz + fungo em mistura com água (b). Barra do pulverizador no momento da aplicação do fungo em campo (c)

3.3 Amostragem de solo, raiz e cigarrinhas-das-raízes

Coletas de solo e raiz de cana-de-açúcar foram realizadas nas áreas com e sem aplicação em quatro datas distintas sendo a primeira realizada em 18 dezembro de 2012 por Rezende (2014). A segunda coleta ocorreu no dia 9 de outubro de 2014 (90 dias antes da aplicação do fungo em campo), a terceira coleta foi feita no dia 9 de fevereiro de 2015 (30 dias após a aplicação) e a última coleta no dia 10 de abril de 2015 (90 dias após a aplicação). As amostras de solo foram obtidas com a ajuda de uma pá de alumínio. Foram removidos os restos culturais da superfície e o solo foi obtido de uma profundidade de 0-10cm. Para as amostras de raízes, utilizou-se uma enxada para remoção da touceira e posterior corte das mesmas.

A amostragem seguiu o modelo definido por Jürg Enkerli (Agroscope, Institut für Nachhaltigkeitswissenschaften INH, Zurique, Suíça) para estudos de filogeografia global do gênero *Metarhizium* e utilizado por Rezende (2014) nas coletas nas mesmas áreas cujos isolados foram incluídos nestas análises (Figura 3). Dentro de cada parcela, pontos foram amostrados a cada cinco metros em quatro linhas de 100m de comprimento, denominadas de A, B, C, D nas entrelinhas do canavial. Cada linha foi espaçada uma da outra por 10m perfazendo 20 pontos de coleta de solo por linha e 80 pontos por área para as coletas pré-aplicação do fungo. Nas coletas pós-aplicação, amostras de solo foram obtidas a cada 10m ao invés de 5m, totalizando assim 40 amostras por área e por data. Foram coletadas também 20 amostras de raízes em cada área, 30 dias após aplicação. Devido a colheita da cana na área

sem aplicação, não foram obtidas amostras de raízes desta área 90 dias após aplicação, somente na área com aplicação.

Figura 3- Desenho amostral da coleta de solo e raízes na data pré-aplicação para caracterização das populações de *Metarhizium* spp. em plantios de cana-de-açúcar: Em vermelho, estão representados os pontos de coleta de raízes; em preto, os pontos de coleta de solo (REZENDE, 2014)

As amostras foram acondicionadas individualmente em sacos plásticos previamente identificados com local e ponto amostral e mantidas em caixa térmica até serem transportadas para o laboratório, onde foram mantidas em sala refrigerada até o processamento.

Além das amostras de solo e raiz foram realizadas nas duas áreas coletas de cigarrinhas em sete datas, sendo três coletas antes da aplicação do fungo (51, 42 e 1 dia antes) e quatro coletas após a aplicação (7, 30, 60 e 90 dias após). Nas duas primeiras coletas (antes da aplicação), adultos e ninfas de cigarrinha foram amostrados, ao acaso. A partir da terceira data, a metodologia empregada seguiu o esquema de levantamento populacional adotado pela Usina Iracema (Figura 4).

Figura 4- Esquema para levantamento populacional de cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata*, em cana-de-açúcar na Usina Iracema

As ninfas foram coletadas com auxílio de pinças e acondicionadas em potes contendo um pouco de solo que estava aderido à raiz da cana onde as mesmas se encontravam, para manter a umidade. Esses potes foram imediatamente colocados em caixas de isopor. O mesmo procedimento foi realizado para coleta de adultos, porém, não se adicionou solo nos potes e sim pedaços de folha de cana. As ninfas, no laboratório, foram mantidas em quarentena junto à raiz de mudas de cana-de-açúcar cultivadas em substrato vegetal (Figura 5a), e os adultos foram mantidos nas folhas de cana que se encontravam dentro de gaiolas (confeccionadas com garrafas pets) com aberturas laterais vedadas com tecido tipo “voil” para prover ventilação. Os insetos foram mantidos nas plantas até a observação de sua mortalidade (Figura 5a e 5b) e quando necessário, foram feitas reposições das mesmas.

Insetos com sintomas de mortalidade pelo fungo *Metarhizium* sp. foram armazenados individualmente em tubos Eppendorf devidamente identificados e mantidos à 4°C em geladeira.

Figura 5 – Muda de cana-de-açúcar utilizada para manutenção de ninfas e adultos de *Mahanarva* sp. coletados na Usina Iracema (a). Detalhe da espuma produzida pelas ninfas aderidas à raiz de plantas de cana-de-açúcar (b)

3.4 Isolamento do fungo *Metarhizium* spp. de amostras de solo, raiz e cigarrinha-das-raízes

O isolamento de *Metarhizium* spp. das amostras de solo e raiz foi realizada por meio de dois métodos: meio seletivo, para as coletas de 90 dias pré-aplicação e 30 dias pós-aplicação e “Insect baiting” para todas as coletas. Devido à baixa recuperação de isolados por meio seletivo este método não foi realizado no restante das amostras. A metodologia empregada para o isolamento com meio seletivo seguiu o procedimento descrito por Goettel e Inglis (1997) utilizando o meio seletivo PDAY (Batata Dextrose Ágar e Extrato de levedura) e fungicida Dodine para evitar o crescimento de fungos não entomopatogênicos (RANGEL et al., 2010). A partir de cada amostra, 10g de solo foram colocados em tubos de vidro (Schott®) contendo 90 mL de água destilada estéril mais 0,01% de espalhante adesivo Tween® 80. Os tubos foram mantidos em uma mesa agitadora orbital (modelo: MA 140 CFT, Marconi) programada para 200 rotações 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 espalhada no meio de cultura PDAY com auxílio de uma alça de Drigalski. Foram feitas duas placas para cada diluição. As mesmas foram mantidas em câmara

climatizada do tipo B.O.D (Biological Oxigen Demand) por aproximadamente 7 dias, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12h de fotofase. Os isolados de *Metarhizium* sp. obtidos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) Difco™, USA para obtenção de culturas puras.

Para o isolamento por “Insect baiting”, tanto para amostras de solo quanto raiz foram utilizadas larvas de 3º ou 4º instar de *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae). A metodologia adotada seguiu técnicas adaptadas de Zimmermann (1986) e Meyling e Eilenberg (2006). Em potes plásticos de 140 ml foram colocados 80 g de solo 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 14 dias, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12h de fotofase e invertidos diariamente durante a primeira semana para induzir o movimento das larvas e aumentar a chance de contato com o fungo. A avaliação da mortalidade das larvas foi feita a cada 3 dias. Conforme necessário, o solo foi umedecido com água destilada. Todas as larvas mortas foram separadas do solo, esterilizadas superficialmente em 5% de hipoclorito de sódio por 1 minuto e então imersas em água destilada estéril três vezes. Em seguida, foram transferidas individualmente para câmara úmida e mantidas em B.O.D. por 7 dias, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12h de fotofase para confirmação da mortalidade pelo fungo (Figura 6a). As larvas mortas que apresentaram o corpo coberto por crescimento fúngico foram colocadas em microtubos e uma pequena porção do fungo que cresceu sob os insetos foi transferida para placas de Petri contendo meio de cultura BDA para obtenção de colônias puras (Figura 6b e 6d). Uma vez obtidas, os conídios foram raspados e armazenados em tubos Eppendorf devidamente identificados.

Para a recuperação de isolados de *Metarhizium* sp. a partir de raiz foi empregada a metodologia descrita por Wyrebek et al. (2011). As raízes foram lavadas com água destilada estéril para retirar o excesso de solo e em seguida cortadas em pequenos pedaços de aproximadamente 0,5 cm. Esses pedaços foram colocados em tubos tipo Falcon contendo 20 mL de água destilada estéril mais 0,01% de espalhante adesivo Tween® 80. Os tubos foram manualmente agitados vigorosamente e a partir desta suspensão foram preparadas três diluições seriadas. Desta etapa em diante adotou-se o mesmo procedimento realizado para as amostras de solo.

Os insetos que morreram durante o transporte até o laboratório ou no período de quarentena, foram esterilizados superficialmente conforme descrito anteriormente. Em seguida, foram mantidas em B.O.D. durante 7 dias a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12h de fotofase para observação do crescimento do fungo *Metarhizium* sp. Após a constatação da mortalidade pelo

fungo, a obtenção de colônias puras foi realizada conforme mencionado para larvas de *T. molitor* (Figura 6c).

Figura 6 - (a) Larvas de *Tenebrio molitor* mortas e mantidas em câmara úmida. (b) Larva de *T. molitor* infectada por *Metarhizium* sp. (c) *Mahanarva* sp. em diferentes etapas de infecção pelo fungo *Metarhizium* sp. (d) Colônias puras de *Metarhizium* sp. obtidas de larvas de *T. molitor*

3.5 Extração de DNA

No presente estudo foram selecionados isolados de *Metarhizium* sp. provenientes de uma ou duas larvas de *T. molitor* infectadas e uma colônia de meio seletivo de cada amostra de solo coletada, das áreas com e sem aplicação. Todos os isolados provenientes de insetos infectados foram utilizados nas análises. Para as análises moleculares, também foram utilizados 33 isolado de solo, sendo 5 da área com aplicação e 28 da área sem aplicação da coleta realizada em 18 de dezembro de 2012 por REZENDE (2014).

A extração do DNA foi feita a partir de conídios obtidos de colônias puras de isolados recuperados pelos métodos de “insect baiting” e meio seletivo, de amostras de solo e de raízes, e pelo isolamento direto do fungo de cigarrinha-das-raízes infectadas, anteriormente descritos. Para tanto, foi utilizada a metodologia descrita por Kepler et al. (2014), com algumas modificações. Conídios de cada isolado obtido foram inoculados sobre o papel de filtro (Grade 2 - Whatman) em Placas de Petri pequenas (3 cm de diâmetro) contendo BDA Difco®. Em seguida, as placas foram colocadas em câmara climatizada do tipo B.O.D por 5 a 7 dias, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12h 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 de 2 mL (Screw Cap Micro Centrifuge Tube Sarstedt). Dentro de cada microtubo, juntamente com o material fúngico, foi adicionado 350 μL de tampão de extração (2,1g de Metassilicato de sódio (Sigma), 0,5g de ácido cítrico (Sigma); 2,64 mL de 2-butoxi-etanol-akaethyleno-glicol-butil-éter (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 pérolas de zircônia-sílica de 1mm e 2,3mm (BioSpec Products). Os tubos foram fechados e levados ao equipamento L-Beater 24 (Loccus Biotecnologia) por três ciclos de 10 s com velocidade de 5.5 m/s. Após o processo de homogeneização e lise celular, os tubos foram colocados imediatamente em banho quente (100°C) por 10 min e em seguida centrifugados por 10 min a 14.000x g. Após a centrifugação, as amostras foram imediatamente colocadas em rack resfriado e a partir de cada tubo foi retirado uma alíquota de 175 μL do sobrenadante, tomando cuidado para evitar a sujeira do fundo. O DNA foi transferido para um novo microtubo estéril e armazenado em freezer -20°C para posterior utilização.

3.6 Genotipagem

Para o desenvolvimento de um marcador molecular do tipo microssatélite, inicialmente, foram obtidos e sintetizados pela empresa Eurofins MWG operon, um total de 23 “primers” de microssatélite, com cauda M13(29) (para incorporação de fluorescências). Estes “primers” foram descritos por Oulevey et al. (2009) e por Enkerli et al. (2005) e representam a totalidade de “primers” de microssatélites já descritos para o gênero *Metarhizium*.

O método de genotipagem adotado foi o multiplex que permite a análise simultânea de diferentes “primers” para uma mesma amostra. O método consiste na adoção de fluorescências de diferentes cores que são incorporadas via um ciclo extra na PCR do

“primer” em questão (SCHUELKE, 2000). Após a genotipagem, como resultado final, picos de diferentes cores são observados e avaliados quanto ao tamanho do fragmento.

Cada região de microssatélite foi amplificada em termociclador da marca MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) com o seguinte programa: 1 ciclo de desnaturação a 95°C por 2 min, seguido de 36 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento com temperatura definida em função do primer (variando de 56 a 60°C) por 30s e extensão de 72°C por 40 segundos. Para que ocorresse a incorporação da fluorescência, um novo ciclo, repetido 10 vezes de 94°C por 40 segundos, 53°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos foi acrescido ao programa da PCR após os 36 ciclos iniciais. Por fim, a finalização se deu com o ciclo de extensão a 72°C por 7 min.

Inicialmente foram testados os 23 “primers” de microssatélite em 10 isolados (Ma099, Ma142, Ma145, Ma164, Ma165, Ma307, Ma325, Ma375, Ma417, Ma2054, Ma2055, Ma2060, Ma2064, Ma2065, Ma2089, Ma2097, Ma2098, Ma2099, Ma2109, Ma2274, Ma2279, Ma2287, Ma2296). Desses, foram selecionados 13 que melhor amplificaram fragmentos do isolado comercial aplicado em campo, verificado via gel de agarose 2%. Dos 13 “primers” selecionados, após a genotipagem de uma placa teste, foram selecionados os 10 melhores “primers” que apresentaram picos mais concisos nas análises realizadas no programa GeneMarker V1.95 para a maioria dos isolados testados.

Os 10 “primers” selecionados foram organizados em 3 conjuntos multiplex; 2 conjuntos com 3 primers e 1 conjunto com 4 “primers” (Tabela 1). Cada primer de cada conjunto incorporou uma cor de fluorescência (HEX, FAM ou NED). A única exceção foi o conjunto multiplex 01, onde 2 “primers” (Ma2054 e Ma142) receberam a mesma fluorescência (HEX), porém, como os fragmentos gerados por cada primer difere em mais de 50 pares de base, não houve problemas para analisar os picos posteriormente.

Tabela 1- Conjunto de multiplex com informações sobre os “primers” utilizados na análise de microsatélite dos isolados de *Metarhizium* spp.: tamanho médio dos fragmentos obtidos por cada “primer”, fluorescência atribuída, motif de cada região de microsatélite e referência onde estão descritos os “primers”

Multiplex	Primer	Tamanho do fragmento (pb +- 50)	Fluorescência	Motif	Artigo referência
Multiplex 01	Ma2054	239	HEX	GT ₁₄ /(ATAC) ₄ /(TATG) ₆	Oulevey et al.,(2009)
	Ma142	111	HEX	(CA) ₈ (CGC) ₅	Enkerli et al.,(2005)
	Ma2097	191	FAM	(GT) ₁₀ (T) ₆ G(T) ₄	Oulevey et al.,(2009)
	Ma2099	251	NED	(GT) ₄ /(GT) ₄ AT(GT) ₆	Oulevey et al.,(2009)
Multiplex 02	Ma2064	163	HEX	(T) ₆ A(T) ₂ A(T) ₉ A(T) ₇ (GT) ₁₅	Oulevey et al.,(2009)
	Ma2065	145	FAM	(GT) ₄ GA(GT) ₈ GA(GT) ₃	Oulevey et al.,(2009)
	Ma165	139	NED	(CA) ₄	Enkerli et al.,(2005)
Multiplex 03	Ma2296	142	HEX	(CT) ₈ CCAT(CT) ₇	Oulevey et al.,(2009)
	Ma2292	197	FAM	(T) ₅ C(T) ₇ /(CT) ₆ C(CT)T(CT) ₂	Oulevey et al.,(2009)
	Ma2063	141	NED	(GT) ₁₁	Oulevey et al.,(2009)

Para genotipagem de todos os 447 isolados obtidos de: insetos (n=98), raízes (n=32), solo (n=315) mais o isolado aplicado pela Usina em anos anteriores e o isolado aplicado (ESALQ 1604), com os 10 “primers” de microsatélites selecionados, foram inicialmente montadas placas com DNAs dos isolados obtidos, diluídos na proporção de 1:10. Para cada placa de DNA diluído, 10 placas de PCR foram realizadas, sendo uma placa por “primer” selecionado, garantindo assim, que todos os isolados fossem amplificados para todos os microsatélites.

As placas de genotipagem foram montadas de acordo com os conjuntos de multiplex pré-estabelecidos. Para cada 10 Placas de PCR (1 para cada “primer”) foi montado uma placa de genotipagem. As placas foram enviadas para genotipagem no Laboratório do Centro de biologia molecular e engenharia genética (CBMEG) da UNICAMP, Campinas/SP, e os resultados obtidos foram analisados no programa GeneMarkerV1.95.

3.7. Análise dos dados de genotipagem

Para análise dos dados de genotipagem, foi construída no Pacote Office Excel 2010, uma matriz de alelos encontrados para todos os isolados. Posteriormente, com o auxílio do pacote de extensão do programa Pacote Office Excel 2010, “GenAlEx 6.501”, o número de haplótipos foi obtido por população de inseto, solo e raiz. Para determinar a diversidade

genética nas populações, com o auxílio do mesmo pacote de extensão citado anteriormente, foram feitas análises de estimativas de diversidade haplotípica, obtendo-se os seguintes índices: N = número de isolados; NH = número de haplótipos; NeH = número efetivo de haplótipos; I = índice de Shannon e h = diversidade haplotípica. Os valores do parâmetro diversidade haplotípica podem variar entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1, maior a diversidade entre os haplótipos analisados (NEI; TAJIMA, 1981). O índice de Shannon é um índice de diversidade que foi originalmente descrito para riqueza de espécies e depois foi adaptado para riqueza alélica e no caso deste estudo refere-se à diversidade haplotípica. Ele não apresenta valor máximo, mas quanto mais elevado o valor significa que maior é a diversidade haplotípica. Para visualização gráfica dos resultados, foi elaborada uma rede de haplótipos no programa de análises estatísticas “R”, com o auxílio dos pacotes “adeget” e “poppr”.

Análises de variância molecular (AMOVA) também foram realizadas com o programa de análises estatísticas “R”. A AMOVA foi delineada por Excoffier et al. (1992) e é baseada na correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica produzindo estimativas de componentes de variância análogas às estatísticas F de Wright, denominadas de “estatística Φ ”. A significância dos componentes de variância e das estatísticas Φ , é testada por meio de um procedimento permutacional não paramétrico AMOVA (ZUCCHI, 2002). Na primeira análise de AMOVA foram utilizados dados de 10 microssatélites obtidos para cada um dos 309 isolados de *Metarhizium* spp. recuperados de amostras de solo ($n= 215$), raiz ($n= 22$) e insetos ($n= 73$), considerando dois níveis hierárquicos. Na segunda análise, composta por três níveis hierárquicos, foram utilizados dados de 10 microssatélites obtidos para cada um de 237 isolados de *Metarhizium* spp. provenientes de amostras de solo ($n= 215$) e raiz ($n= 22$) levando em consideração as duas áreas de coleta (com e sem a aplicação do fungo).

3.8. Amplificação, sequenciamento, edição e alinhamento múltiplo

Para identificação a nível de espécie dos isolados de *Metarhizium* sp. que ocorreram nas duas áreas de cana-de-açúcar e também para reconstruir a filogenia correta desses isolados, foi utilizada a região 5'-TEF. A reação de amplificação foi realizada com o par de primers: EF1T (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e EF2T (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT) (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009). A reação de PCR foi conduzida com um volume final de 25,0 μ L, contendo 14,85 μ L de água destilada

estéril, 5,0 µl de 1X GoTaq®ReactionBuffer, 0,5 µM de dNTP mix, 0,15µl de GoTaq®DNA Polymerase (5U/µl) (Promega), 0,75 µM de cada um dos “primers” diluídos à 10pmol/ µl e 3 µl de DNA diluído à 1:5. As amostras foram amplificadas em termociclador. O programa da PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação à 94°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 40s, anelamento a 55°C por 45 s e polimerização a 72°C por 45 s, finalizando com extensão a 72°C por 10 min. A qualidade e o tamanho do produto final das PCRs para ambos os genes foram analisados em gel de agarose (1% p/v).

Para reação de sequenciamento, os produtos da PCR foram purificados por digestão enzimática com o Kit Illustra™ ExoProStar 1-Step (GE Healthcare, São Paulo, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante e preparados para sequenciamento com Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os primers para sequenciamento foram os mesmos utilizados na amplificação. O sequenciamento foi realizado utilizando o equipamento ABI3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP (CBMEG).

As sequências foram editadas manualmente, o alinhamento par a par foi realizado para obtenção da sequência consenso de cada indivíduo e posteriormente, o alinhamento múltiplo foi construído utilizando a ferramenta ClustalW do programa BioEdit versão 7.2.5 (HALL, 1999) e a edição manual foi realizada para certificação da posição das bases nitrogenadas.

3.9. Análise dos dados de sequenciamento

A análise de Máxima Verossimilhança (MV) foi realizada com auxílio do programa RAxML GUI v.1.3 (SILVESTRO; MICHALAK,2012) implementando o modelo evolutivo GTR+G. A análise foi conduzida considerando “gaps” como dados faltantes e o suporte dos relacionamentos obtidos foi acessado a partir de 1000 réplicas de “bootstrap”, utilizando o algoritmo “rapid bootstrap” (STAMATAKIS; HOOVER; ROUGEMONT, 2008). A matriz de dados foi construída com 57 sequências de isolados provenientes de solo, 6 de raiz e 14 de insetos. A escolha dos isolados para confirmação da espécie foi baseada nos haplótipos (n=52) obtidos nas análises de genotipagem, nos quais 41 haplótipos foram recuperados em solo, 6 em insetos e 5 em raiz. Além dessas sequências, foram incluídas oito sequências de referência taxonomicamente autenticados (denominadas ARSEF e CBS), uma identificada como *M. brunneum* proveniente de solo de morango (ESALQ 2623) (dado cedidos por Thiago Castro, ainda não publicado), 14 identificadas por Zanardo (2015) e 15 por Rezende et

al. (2015). A árvore gerada foi visualizada e editada com auxílio do programa MEGA6 (TAMURA et al., 2013). Os nós foram considerados com bom suporte estatístico quando os valores de “bootstrap” foi $\geq 70\%$ (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2006).

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento de *Metarhizium* de solo, raiz e inseto

4.1.1 Isolados recuperados de solo e raiz

Uma porcentagem significativamente maior de larvas de *T. molitor* infectadas por *Metarhizium* spp. pelo método de isolamento por “insect baiting”, foram obtidas de amostras de solo da área sem aplicação em relação a com aplicação do fungo nas datas de 90 dias pré-aplicação e 90 dias pós-aplicação (Tabela 2). A quantidade de larvas infectadas obtidas de amostras de raízes não diferiu em nenhuma data de coleta.

Tabela 2- Porcentagem de lagartas infectadas por *Metarhizium* spp. em amostras de solo e raiz pelo método de isolamento por “insect baiting” com *T. molitor* em área com aplicação e sem aplicação do fungo e quantidade de isolados selecionados para análises moleculares.

	Pré-aplicação				Pós-aplicação	
	90 dias		30 dias		90 dias	
	Solo	Raiz	Solo	Raiz	Solo	Raiz
Com aplicação	58,7±3,1 a (49)	19,4±7,1 a (6)	56,5±5 a (43)	21,2±6,7 a (15)	32,4±5 a (38)	0
Sem aplicação	71,8±3,2 b (64)	11,2±5,6 a (5)	69,7±4,4 a (47)	7,5±4 a (3)	49,2±5 b (61)	*

Dados correspondem a média± Erro padrão de lagartas infectadas e entre parênteses a quantidade de isolados utilizados nas análises moleculares

*Não foram coletadas raízes nesta data por motivo de replantio da cana.

Média seguida pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

Através do método de “insect baiting”, foram selecionados um total de 316 isolados provenientes de uma ou duas lagartas infectadas de cada amostra. Para o método de meio seletivo foram obtidos somente 15 isolados provenientes de solo, os quais foram incluídos nas análises. No total, foram selecionados para as análises moleculares, 331 isolados provenientes de amostras de solo e raiz de ambas as áreas (Tabela 2).

4.1.2. Amostragem de cigarrinha-das-raízes e isolados recuperados

Cigarrinhas-das-raízes foram encontradas somente na área com aplicação. Para o levantamento populacional, foram amostrados uma média de 23 pontos por data. Foram

recuperados um total de 91 isolados de insetos. Deste total, 77 são provenientes de ninfas e 14 de adultos (Tabela 3).

Tabela 3- Quantidade de adultos e ninfas de cigarrinha-das-raízes coletados por data amostral e entre parênteses, quantidade de isolados de *Metarhizium anisopliae* obtidos

	Dias em relação a data de aplicação	Data de amostragem	Adultos	Ninfas	Total
Pré-aplicação	51	19/11/2014	22(4)	54(8)	76(12)
	42	28/11/2014	41(3)	17(0)	58(3)
	1	08/01/2015	16(0)	21(0)	37(0)
Pós-aplicação	7	16/01/2015	28(3)	97(49)	125(52)
	30	12/02/2015	31(2)	31(0)	62(2)
	60	12/03/2015	12(2)	90(20)	102(22)
	90	15/04/2015	15(0)	19(0)	34(0)

A variação na densidade média de ninfas foi maior do que a variação na densidade de adultos por touceira por data (Figura 7). Para os adultos, foram observados dois picos de maior ocorrência, o primeiro no final do mês de novembro e o segundo no final da última quinzena de fevereiro, representando um total de 2,6 e 1,6 insetos/touceira, respectivamente. Para as ninfas, também foram observados dois picos, que sucederam os picos encontrados para os adultos; o primeiro no início da segunda quinzena de janeiro e o segundo pico na primeira quinzena de março, representando um total de 5,3 insetos/touceira em ambas as datas. Poucos insetos foram encontrados na última coleta.

Ninfas e adultos foram coletados infectados no campo nas datas 19/11/14; 16/01/15; 12/03/15, além dessas datas também foram encontrados adultos infectados nas datas: 28/11/14 e 12/02/15 (Figura 7).

A infecção natural por *Metarhizium* em 19/11/14 (51 dias pré-aplicação) foi de 18,2% dos adultos e 14,8% das ninfas. Uma semana após a aplicação do fungo, 50,5% das ninfas coletadas estavam infectadas, sendo esta a maior taxa obtida no período de avaliação. A infecção em adultos nesta data foi de apenas 10,7%. Após 30 dias, observou-se uma drástica redução na população de ninfas e nenhuma ninfa e apenas dois adultos infectados. Após 60 dias, a densidade de cigarrinhas voltou a subir assim como os níveis de infecção. A população de cigarrinhas reduziu novamente aos 90 dias e nenhuma cigarrinha infectada foi encontrada.

Além de adultos e ninfas de cigarrinha, foram coletados em campo, em conidiogênese do fungo *Metarhizium* spp., um besouro da família Scarabaeidae, uma lagarta de família não

identificada e um besouro da família Curculionidae. Dois adultos de cigarrinhas foram encontrados infectados pelo fungo *Batkoa* sp.

Durante o período de amostragem de solo, raiz e cigarrinhas, a temperatura registrada na Usina Iracema- Iracemápolis/SP variou de 21,5°C (abril/2015) à 26°C (janeiro/2015). A menor precipitação acumulada foi verificada no mês de abril/2015 com 11mm e a maior no mês de fevereiro/2015 com 345mm.

Figura 7 - Porcentagem de infecção (barras) de cigarrinha-das-raízes antes e após a aplicação do isolado comercial do fungo *Metarhizium anisopliae* e densidade média de insetos coletados por touceira (linhas). Seta representa o momento da aplicação do fungo em campo. No eixo da abscissa está representada a data de amostragem e em parênteses os dias que antecederam ou sucederam a aplicação do fungo

Figura 8 -Temperatura média (°C) e precipitação (mm) na Usina Iracema em Iracemápolis para o período de novembro de 2014 a abril de 2015. Seta representa o momento da aplicação do fungo em campo

4.2 Genotipagem e Sequenciamento

4.2.1 Extração de DNA Genotipagem e AMOVA

Foram extraídos DNAs de um total de 465 isolados de *Metarhizium* spp., dos quais 29 foram recuperados de amostras de raiz, 302 de amostras de solo, 95 de adultos e ninfas de cigarrinha das raízes, 2 de besouros, 1 de lagarta, 1 do isolado comercial aplicado, 1 do isolado utilizado pela Usina (ESALQ 5310) e mais 34 isolados referentes à uma coleta de amostras de solo e raiz realizada em 2012 na mesma gleba da área aplicada (REZENDE,2014).

Do total de DNAs extraídos, foram genotipados, para os dez “primers” de microssatélite selecionados, 446 isolados. Desse total, 311 isolados amplificaram às 10 regiões de microssatélite, sendo 22 (3 da área com aplicação e 19 da área sem aplicação) da coleta feita em 18 de dezembro de 2012 por REZENDE (2014).

Um total de 62 alelos foram obtidos para os 10 “locus” de microssatélite avaliados. Foram obtidos, 6, 10, 9, 5, 7, 3, 5, 3, 5 e 8 alelos para os “primers” Ma2097, Ma142, Ma2054, Ma2099, Ma2065, Ma2064, Ma165, Ma2292, Ma2296, Ma2063, respectivamente. O “loco” mais polimórfico foi o Ma142, com 10 alelos obtidos, enquanto os dois menos polimórficos foram: Ma2064 e Ma2292, com apenas 3 alelos obtidos para cada um.

Foram obtidos 156 haplótipos, destes, 132 foram encontrados em amostras provenientes de isolados de solo, 17 em amostras de raízes e 20 em insetos. A maior diversidade haplotípica foi encontrada no solo $h=0,989$ e a menor foi nos insetos $h=0,779$ (Tabela 4). O índice de Shannon também aponta para uma maior diversidade no solo ($I=4,586$) e uma menor diversidade em insetos ($I=2,083$). O índice de Shannon é um índice de diversidade que foi originalmente descrito para riqueza de espécies, e depois foi adaptado para riqueza alélica, no caso deste trabalho, haplotípica. Ele não tem valor máximo, mas quanto mais elevado maior diversidade haplotípica. O número efetivo de haplótipos (NeH) representa uma correção para o número de haplótipos levando em consideração amostras com tamanhos amostrais desiguais, sendo assim é possível compará-las, a despeito da diferença amostral.

Tabela 4- Estimativas de diversidade haplotípica para *Metarhizium* spp. isolados a partir de insetos, raiz e solo. N = número de isolados; NH = número de haplótipos; NeH = número efetivo de haplótipos; I = índice de Shannon; h = diversidade haplotípica

Origem	N	NH	NeH	I	h
Inseto	73	20	4,308	2,083	0,779
Raiz	22	17	12,737	2,713	0,965
Solo	213	132	65,754	4,586	0,989

A quantidade de haplótipos provenientes de isolados recuperados de solo foi muito semelhante para ambas áreas, 60,6% para a área com aplicação e 62,9% para área sem aplicação. Um baixo número de isolados foi recuperado de raízes, quando comparado com os recuperados de solo, porém, quase todos os isolados recuperados de raízes representaram haplótipo diferentes (Tabela 5).

Tabela 5- Quantidade de isolados e haplótipos obtidos de populações de solo, raiz e inseto em área com aplicação e sem aplicação do fungo

	Com aplicação			Sem aplicação		
	Isolados	Haplótipos	%*	Isolados	Haplótipos	%*
Solo	89	54	60,67	124	78	62,90
Raiz	14	13	92,85	8	5	62,5
Inseto	73	20	27,4	-	-	-
Total	103	-	-	132	-	-

*Porcentagem de haplótipos obtidos em relação ao número de isolados recuperados.

De acordo com um dendrograma e heat map (dados não apresentados) construído com base em distâncias genéticas de Rogers (1972), isolados recuperados de insetos são geneticamente mais divergentes de isolados provenientes de solo e raiz, sendo a divergência destes menor para isolados de raiz do que de solo.

Na rede de haplótipos (Figura 9), podem ser visualizados 3 grupos principais de haplótipos o primeiro (ramo mais ao alto da imagem) formado em sua grande maioria por isolados do solo; o segundo (ramo no centro da imagem) onde estão concentrados os haplótipos de isolados de insetos, mas que também são compartilhados por isolados do solo e de raiz; e o terceiro (mais embaixo) com haplótipos compartilhados por isolados de raiz e solo. Foram encontrados também haplótipos de ocorrência exclusiva em raiz, solo e insetos.

O haplótipo que corresponde ao isolado aplicado pela Usina (ESALQ 5310) não foi recuperado de nenhuma das populações.

Figura 9- Rede de haplótipos composta por 309 isolados de *Metarhizium* spp. recuperados de insetos, solo e raiz. Cada círculo representa um haplótipo. O diâmetro do círculo é proporcional à quantidade de isolados que compartilham o mesmo haplótipo. A largura e a tonalidade das conexões são proporcionais à distância genética de Rogers (1972)

Uma análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada para verificar a distribuição da variabilidade genética considerando grupos de isolados provenientes de solo, raiz e insetos. A divergência genética entre os grupos foi significativa ($\Phi_{ST} = 0.303$). Foi observada maior proporção da variação dentro (69,6 %) do que entre (30,3 %) os grupos (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise de variância molecular (AMOVA) para haplótipos de 309 isolados de *Metarhizium* spp. provenientes de insetos, solo e raiz, com base em 10 “locus” microssatélites. GL = graus de liberdade

Fonte da Variação	GL	SQ	Componentes de variância	Variação (%)	Índice de Fixação	P (valor)
Dois níveis hierárquicos						
Entre grupos	2	154,80	1,06	30,36	$\Phi_{ST}=0,303$	(<0,001)
Dentro de grupos	306	741,18	2,42	69,64		
Total	308	895,98	3,48	100,00		

Outra AMOVA com três níveis hierárquicos foi realizada para comparação de haplótipos obtidos de solo e de raiz e posteriormente relacionando-os por áreas amostradas. A maior parte da variação está dentro das áreas (78,25%), enquanto a variação entre áreas com e sem aplicação dentro de solo e raiz é de quase 22%. Não existe divergência entre os isolados de raiz e de solo (-0,22), resultado do compartilhamento de haplótipos entre estes grupos (rede de haplótipos), por causa disso, o phi-ST foi negativo (-0,002) (Tabela 7).

Tabela 7- Análise de variância molecular (AMOVA) para haplótipos obtidos de 237 isolados de *Metarhizium* spp. provenientes de solo e raiz em duas áreas distintas, com base em 10 “locus” microssatélites. GL = graus de liberdade; ns = não significativo

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de variância	Variação (%)	Índice de Fixação	P (valor)
Três níveis hierárquicos						
Entre solo e raiz	1	15,80	-0.007	-0,22	$\Phi_{ST} = -0,002$	ns
Dentro de solo e raiz entre áreas com e sem aplicação	3	100,77	0.704	21,96	$\Phi_{IS} = 0,219$	(<0,001)
Dentro de áreas com e sem aplicação	231	579,56	2,509	78,25	$\Phi_{IT} = 0,217$	(<0,001)
Total	235	696,13	3,206	100,00		

4.2.2 Monitoramento ambiental do isolado aplicado

O isolado comercial aplicado, representado pelo haplótipo C, foi recuperado somente em insetos coletados em todas as datas pós-aplicação (Figura 10), com exceção de 90 dias quando não foram recuperados insetos infectados. Os isolados recuperados de insetos referentes as datas pré-aplicação, representam 5 haplótipos, 4 dos quais não foram constatados para as datas pós-aplicação.

O fungo aplicado em campo foi recuperado em insetos em até 2 meses após a aplicação, sendo responsável pela mortalidade de 50% (n=19) e 70,5% (n=12) de todos os insetos que se encontravam infectados respectivamente, 7 e 60 dias após a aplicação. Os outros 50% dos isolados encontrados 7 dias pós aplicação correspondem a 9 haplótipos (D; E; F; 1; 2; 4; 8; 9; 10) já para os isolados recuperados 60 dias pós-aplicação, 29,5% representam 4 haplótipos (B; D; 5, 11).

Após 30 dias da aplicação foram recuperados somente 2 isolados de cigarrinha, um haplótipos C e outro haplótipo 6, além de um haplótipo (3) isolado de besouro scarabeídeo.

Figura 10 - Haplótipos provenientes de isolados de insetos obtidos nas datas de pré- aplicação e 7, 30 e 60 dias após a aplicação. Letras representam haplótipos encontrados em mais de um indivíduo e números representam haplótipos únicos

4.2.3 Sequenciamento o gene 5'-TEF

Para a construção da filogenia dos isolados de *Metarhizium* sp. recuperados em solo, raiz e insetos, foi avaliado o gene 5'-TEF (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009) que resultou em sequências de aproximadamente 560 pares de base. De acordo com a reconstrução da árvore de Máxima Verossimilhança (Figura 10), as espécies encontradas no agroecossistema de cana-de-açúcar foram: *M. robertsii*, *M. anisopliae* e *M. brunneum* (Figura 12). No solo, foram encontradas as espécies *M. robertsii* (Mrob 1, Mrob 2, e Mrob 4), *M. anisopliae* (Mani 1 e Mani 2) e *M. brunneum*. Em raízes foram encontradas as espécies *M. brunneum* e *M. anisopliae* (Mani 2). Infectando insetos adultos e ninfas de cigarrinha-das-raízes foi encontrado somente a espécie *M. anisopliae* (Mani 2). Neste estudo, uma espécie de besouro da família Scarabaeidae, foi encontrada infectada por *M. robertsii* (Mrob 1).

Figura 11 - Árvore de Máxima Verossimilhança inferida do alinhamento de 115 sequências da região nuclear 5'-TEF. Em negrito estão os isolados de referência, sendo aqueles com estrela preta se referem a isolados taxonomicamente autenticados, ARSEF e CBS (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009); círculo rosa indicam isolados identificados por Rezende et al. (2015); triângulo azul por Zanardo (2015) e quadrado verde, sequência cedida por Thiago Castro. O clado descrito como Mrob1 apresenta a sequência de referência ARSEF 727 e mais 40 sequências de solo. Apenas os valores de bootstrap (1000 repetições) acima de 70% estão representados nos nós

Figura 12 - Espécies de *Metarhizium* de ocorrência no agroecossistema da cana-de-açúcar

5 DISCUSSÃO

Este trabalho compreende o primeiro estudo no Brasil que utiliza de técnicas de biologia molecular para o entendimento da ecologia de *Metarhizium* spp no agroecossistema da cana-de-açúcar. Na realidade, embora o uso de *M. anisopliae* em cana-de-açúcar remonte da década de 70 no país, poucos foram os estudos que determinaram a eficácia das aplicações de *M. anisopliae* nesta cultura. A pulverização do isolado ESALQ 1604 resultou em mortalidade de 50% de ninfas após sete dias e uma eficiência menor a adultos. Esta mortalidade pode ser considerada elevada levando-se em conta as condições da aplicação; um baixo volume de calda (150L/ha) para um canavial fechado já próximo ao ponto de colheita com grande área foliar, uma baixa concentração de conídios ($3,72 \times 10^6$ conídios/mL), e em um dia ensolarado com temperaturas elevadas. A comparação destes resultados com outros estudos é dificultada devido a quantidade de variáveis a serem consideradas nos experimentos e a falta de informações sobre os procedimentos adotados. Dinardo-Miranda et al (2004) conseguiram até 85,7% de controle de ninfas e adultos após 31 dias em um canavial em Tarumã /SP com uma aplicação de alto volume, na concentração de 1kg/ha de arroz mais fungo lavado (9.10^8 esporos/g de arroz) realizada em dezembro de 2002, quando o nível de infestação se encontrava em 3 insetos/m. A aplicação foi direcionada para a base da touceira e segundo os autores, que as condições climáticas após a aplicação do fungo provavelmente tenham favorecido a atuação do mesmo. Por outro lado, em condições bem distintas do trabalho anterior, Batista-Filho, Almeida e Machado (2004) testaram a eficiência de diferentes isolados com 5 aplicações quinzenalmente ou 3 aplicações mensalmente (no período de novembro/2000 a janeiro/2001) na concentração de 1×10^7 conídios/mL com vazão de 200 litros/ha em um canavial no município de Sertãozinho, SP. Antes da aplicação do fungo, o nível de infestação da área era de 2,5 ninfas/m sendo os melhores resultados obtidos para os isolados IBCB 10 aplicado quinzenalmente e ESALQ 1037 aplicado mensalmente, sendo que as população de ninfas se mantiveram abaixo de 3 ninfas/m.

A porcentagem da mortalidade causada pelo isolado aplicado em relação a mortalidade por isolados nativos não era conhecida nestes estudos devido a não utilização de técnicas moleculares. O monitoramento da infecção antes da aplicação na área pulverizada ou o monitoramento em uma área não aplicada controle poderia trazer informações importantes sobre o impacto dos isolados nativos na dinâmica populacional da praga. Em nosso estudo, os resultados do monitoramento através de marcadores de microsatélite demonstraram que 50%, 50% e 70,5% de todos os insetos que se encontravam infectados 7, 30 e 60 dias após a

pulverização, respectivamente, estavam infectados pelo isolado aplicado ESALQ 1604. Os outros 50%, 50% e 29,5% dos insetos infectados encontrados nestas datas, estavam infectados por 15 haplótipos de isolados nativos de *M. anisopliae*, responsáveis pela mortalidade natural de até 25% de ninfas e 18,6% de adultos de cigarrinha-das-raízes.

Segundo Dinardo-Miranda, Gil (2007), o nível de dano econômico (NDE) para *M. fimbriolata* em cana-de-açúcar está entre 3 a 5 insetos/m e o nível de controle (NC) entre 2 a 3 insetos/m (GARCIA, 2006). No presente estudo, se considerarmos as populações de ninfas e adultos em conjunto, o NDE fora atingido em todos os períodos amostrados, o que indica que a aplicação do fungo não foi capaz de manter o nível populacional de cigarrinha-das-raízes abaixo do NDE. Uma semana após a aplicação do fungo, 50 % das ninfas coletadas se encontravam infectadas. Esta alta infecção pode ter refletido no fato observado 30 dias após a aplicação do fungo, em que o nível de infestação caiu de 6,1 para 3,3 ninfas/touceira. Em abril, período caracterizado como final do período chuvoso na região e queda de temperatura, observou-se poucos insetos em campo e nenhum inseto infectado. As condições climáticas observadas naquele mês são responsáveis por induzir a diapausa dos ovos (GARCIA, 2006) finalizando o ciclo de cigarrinhas em canaviais. O fungo *Metarhizium* spp ocorreu enzooticamente na área de cana-de-açúcar, tanto em adultos quanto em ninfas, mas pouco contribuiu para a mortalidade de adultos. Apesar de existirem relatos de que a espuma produzida pelas cigarrinhas proteja-as contra microrganismos, esse estágio de desenvolvimento é considerado o mais suscetível a infecção do fungo devido à baixa esclerotização da cutícula e por estar em constante contato com o solo e com raízes (SASAN; BIDOCHKA, 2013; ROCHA et al., 2013), locais de alta umidade, protegidos de radiação solar, sendo o solo um reservatório natural de *Metarhizium* spp. (ALVES, 2008; KLINGEN, HAUKELAND, 2006). Um padrão de flutuação populacional de ninfas, semelhante ao constatado neste estudo, também foi verificado por Garcia (2006) em um canavial na cidade de Pradópolis-SP. O mesmo autor também constatou baixa infestação no mês de novembro, com um aumento progressivo em dezembro e um pico máximo em janeiro, com 4,5 ninfas/m, mês de maior infestação também verificado por Dinardo-Miranda et al (2004). A dinâmica populacional de cigarrinha-das-raízes diferiu do que foi verificado por Garcia (2006), mas se assemelhou ao relatado por Alves et al., (1985) para as espécies de cigarrinhas-das-pastagens; quando ocorre uma maior infestação de ninfas, uma menor quantidade de adultos é encontrada.

Nem o isolado ESALQ1604 aplicado em janeiro de 2015 foi recuperado de solo e raiz, nem o isolado da Usina (ESALQ 5310) aplicado pela última vez na área em outubro de 2013,

foi recuperado de solo, raiz e inseto. Outra informação interessante é que a porcentagem de larvas de *T. molitor* infectadas no isolamento pelo método “insect baiting” não foi alterada pela aplicação do isolado ESALQ1604. Estas informações juntas, podem indicar uma curta persistência do fungo no ambiente ou que estes permaneçam em níveis muito inferiores aos isolados nativos, não sendo detectados pelos métodos de amostragens empregados neste estudo. Para clarificar estas questões seria necessário proceder a uma nova coleta de insetos após um ano da aplicação do isolado ESALQ 1604 e aumentar o número de amostras genotipadas para incrementar as chances da detecção dos isolados aplicados.

No presente estudo, a espécie *M. brunneum* foi encontrada pela primeira vez em cana-de-açúcar. Esta espécie não foi detectada em mais de 400 isolados provenientes dos diferentes biomas brasileiros sequenciados pelo nosso grupo de pesquisa (ZANARDO 2015, REZENDE 2014). Havia apenas um único relato desta espécie no país baseado em um isolado da coleção do CENARGEN (LOPES, et al. 2014).

Os resultados obtidos neste estudo corroboram os trabalhos recentes de Rezende (2014) e Zanardo (2015) no sentido de que *M. anisopliae* é a espécie mais comum em isolados provenientes de insetos e *M. robertsii* mais comum em isolados provenientes de solo do Brasil. Rocha et al (2013) por outro lado, embora também tenha encontrado uma maior predominância de *M. robertsii* em relação a *M. anisopliae* em solos do cerrado em Goiás, observou que *Metarhizium* sp. indet 1 foi a mais abundante de todas.

Uma grande diversidade dentro de *M. anisopliae* e *M. robertsii* foi observada, sendo encontrados representantes de quase todos os clados destas espécies conhecidos até o momento. A maior diversidade haplotípica de *Metarhizium* obtida por microssatélite foi encontrada em solo ($h=0,989$) e a menor em insetos ($h=0,779$). A grande quantidade de haplótipos encontrados no solo (132) reflete a existência de uma grande diversidade de isolados nesse ambiente, resultado verificado também nos dados de sequenciamento do gene 5'-TEF, onde um maior número de espécies foi encontrado naquele ambiente em relação a insetos e raízes. Kepler et al.,(2015), estudaram a diversidade genética presente em 265 isolados recuperados de solo agrícola do estado de Maryland nos Estados Unidos. Do total de isolados recuperados, 186 pertencem a espécie *M. robertsii*. Com oito microssatélites, aqueles autores encontraram um total de 37 haplótipos, 19,9% em relação ao total de isolados. No presente estudo, de 213 haplótipos de solo que representam as espécies *M. robertsii*, *M. anisopliae* e *M. brunneum*, foram encontrados 132 haplótipos, 62% em relação ao total de isolados.

A baixa diversidade haplotípica encontrada em insetos por microssatélite se confirmou pelos dados de sequenciamento. Todos os isolados recuperados de cigarrinhas se alocaram no clado Mani 2 de *M. anisopliae*. Rezende et al (2015) sequenciou o gene 5'-TEF de 32 isolados recuperados de cigarrinhas de diversas regiões do Brasil e observou que todos também alocaram-se dentro do clado Mani 2 de *M. anisopliae*. No presente estudo foi encontrado um besouro da família Scarabaeidae infectado por *M. robertsii*. Além deste isolado, são raros os isolados de *M. robertsii* provenientes de insetos infectados naturalmente no Brasil. Lopes et al (2013) identificou esta espécie em *Phyllophaga capillata* (coró da soja) e há alguns isolados provenientes de insetos de solo do Brasil na coleção do ARSEF. Estes resultados reforçam estudos recentes que apontam para a existência de uma ecologia diferente para *M. anisopliae* e *M. robertsii* sendo a primeira espécie mais adaptada a patogenicidade em insetos da parte aérea das plantas e a segunda para uma vida no solo com interações com a rizosfera e insetos.

Poucos isolados foram recuperados de raízes (n=22), porém, a diversidade haplotípica (h=0,965) foi superior ao encontrado para insetos. As espécies encontradas em raízes foram: *M. anisopliae*, Mani 2 e *M. brunneum*. No estudo de Rezende (2014), realizado na mesma área do presente estudo, *M. robertsii* e uma nova espécie *Metarhizium* sp. indet. 4 foram obtidas de raízes, sendo esta última também encontrada em solo da mesma área. No presente estudo, um exemplar de *Metarhizium* sp. indet. 4 foi genotipado (ESALQ 1684), porém, somente 7 “primers” de microssatélite dos 10 selecionados, obtiveram sucesso para amplificação dos fragmentos deste exemplar, para os outros 3 “primers” (Ma2097, Ma142 e Ma2054) não foram obtidos fragmentos. Devido a este ocorrido seria necessário refazer a genotipagem para verificar houve algum erro humano durante o preparo da amostra ou se pelo fato de ser uma nova espécie, estes “primers” não se anelaram as regiões de microssatélite, o que justificaria não termos encontrado esta espécie na área, uma vez que o sequenciamento procedeu a partir dos resultados das análises de genotipagem para isolados que obtiveram as 10 regiões de microssatélite amplificadas.

Diversos autores relataram a ocorrência das espécies *M. anisopliae* e *M. robertsii* em raízes (BRUCK, 2005; SASAN & BIDOCHKA, 2013; PAVA-RIPOLL et al., 2011; WYREBEK et al., 2011) e a ocorrência de *M. brunneum*, menos comum, foi constatado também por Wyrebek et al. (2011) para raízes de arbustos, árvores e flores silvestres e por Steinwender et al. (2015) em raízes de aveia, centeio e couve. Pela análise dos dados de microssatélite, isolados recuperados de cigarrinhas são mais semelhantes aos recuperados de raiz do que de solo. Essa semelhança pode ser devido à localização das ninfas nas raízes, o que pode indicar uma transição de habitat/hospedeiro do fungo, uma vez que, como mostra a

rede de haplótipos, onde observa-se um maior compartilhamento de haplótipos entre insetos e raiz do que entre insetos e solo.

A Análise de variância molecular (AMOVA) de dois níveis hierárquicos, mostrou uma divergência genética significativa ($\Phi_{ST} = 0.303$) entre os grupos insetos, raiz e solo sendo que a maior proporção da variação ocorreu dentro (69,6 %) do que entre (30,3 %) os grupos. Uma variação significativa de 21,96% foi atribuída ao efeito das áreas, verificado na AMOVA de três níveis hierárquicos sendo o restante da variação, 78,25% ocorrendo dentro de cada área. Outros autores também encontraram diferenças significativas na abundância e diversidade de espécies de *Metarhizium* spp no solo em função do manejo e cobertura vegetal (KEPLER et al., 2015; MEYLING et al., 2011; FREED; JIN; REN, 2011).

Como resultado das análises de genotipagem, a quantidade de alelos obtidos para cada loco estudado variou bastante sendo superior ao número encontrado nos trabalhos de Velásquez et al., (2007) para 38 isolados do Chile, Steinwender et al., (2014), em 124 amostras de solo agrícola na Dinamarca e Oulevey et al. (2009) em uma população da Suíça com 35 isolados, com uma única exceção neste último trabalho para o “primer” Ma2292, onde assim como no presente trabalho, foram encontrados três alelos. Considerando que para o presente estudo foram genotipados 312 isolados, o número superior de alelos pode ser justificado pela maior quantidade de isolados analisados.

Devido ao alto grau de polimorfismo, os marcadores de microssatélite foram eficientes na diferenciação do isolado aplicado em relação aos demais, sendo os resultados obtidos neste estudo, de grande auxílio para o entendimento da ecologia de *Metarhizium* em canaviais e do destino da aplicação de um isolado de *M. anisopliae* no ambiente.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R.T.; CARVALHO, G.S. Primeiro registro das espécies de cigarrinhas-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva spectabilis* (Distant) e *Mahanarva liturata* (Le Peletier & Serville) atacando canaviais na região de Goianésia (GO), Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.81, n.1, p.83-85, 2014.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 11, p. 289-382.
- ALVES, L.F.A.; ALVES, V.S.; BRESSAN, D.F.; NEVES, P.M.O. J.; ALVES, S.B. Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Moniliales: Moniliaceae) em adultos de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), em aviários comerciais em Cascavel, PR, Brasil. **Neotropical Entomology**, Londrina v.33, p. 793-795. 2004
- BALBO JÚNIOR, W.; MOSSIM G.C. Ocorrência e tentativa de controle de pragas em cana crua na Usina Santo Antônio; In: SEMANA DA CANA-DE-AÇÚCAR DE PIRACICABA, 4., 1999, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: AFOCAPI, 1999. p.40-42.
- BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; MACHADO, L.A. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: Cercopidae). **STAB Açúcar, Álcool Subprod**, Piracicaba, v.21 p.84-89. 2002.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Comercialização de produtos microbianos. In. BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Org). **Biocontrole de doenças e plantas: Uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.22-24.
- BIDOCHKA, M. J.; MCDONALD, M. A.; LEGER, R. J. S.; ROBERTS, D. W. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetics**, New York, v.2, p. 107–113, 1994.
- 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, 2001.
- BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, New York, v. 101, n. 4, p. 512–530, 2009.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Cambridge, v.32, p. 314–331, 1980.

BRUCK, D. J. Ecology of *Metarhizium anisopliae* in soilless potting media and the rhizosphere: implications for pest management. **Biological Control**, Corvallis, v. 32, n. 1, p. 155–163, 2005.

CARRER H, BARBOSA, A.L, RAMIRO, D. Biotecnologia na agricultura. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 149–164, 2010.

CASTILHO, A. M. C.; FRAGA, M.E.; AGUIAR-MENEZES, E.L.; ROSA, C.A.R. Selection of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates pathogenic to *Atta bisphaerica* and *Atta sexdens rubropilosa* soldiers under laboratory conditions. **Ciência. Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1243-1249, 2010.

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

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 1657–1659, 2000.

CITO, A.; MAZZA, G.; STRANGI, A.; BENVENUTI, C.; BARZANI, G.P.; DREASSI, E.; TURCHETTI, T.; FRANCARDI, V.; ROVERSI, P.F. Characterization and comparison of *Metarhizium* strains isolated from *Rhynchophorus ferrugineus*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 355, n. 2, p. 108–115, 2014.

D’ALESSANDRO, C. P.; JONES, L. R.; HUMBER, R. A.; LÓPEZ LASTRA, C. C.; SOSA-GOMEZ, D. R. Characterization and phylogeny of *Isaria* spp. strains (Ascomycota: Hypocreales) using ITS1-5.8S-ITS2 and elongation factor 1- α sequences. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 54, n. 1, p. 21–31, 2014.

DA SILVA, A. T. B. D.; SPERS, R. G.; WRIGHT, J. T. C.; COSTA, P. R. D. Cenários prospectivos para o comércio internacional de etanol em 2020. **Revista de Administração**, São Paulo, v.48. n.4, p.727-738. 2013.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FERREIRA, J.M.G.; CARVALHO, P. A. M. Influência da época de colheita e do genótipo de cana-de-açúcar sobre a infestação de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.30: p.145-149, 2001.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.; FERREIRA, J.M.G.; GARCIA, C.A.; COELHO, A.L.; GIL, M.A. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.33, n.6, p.91-98, 2004.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; GIL, M. A. Estimativa do nível de dano econômico de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (hemiptera: cercopidae) em cana-de-açúcar. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 1, p. 81-88, 2007.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; COSTA, V. P. DA; FRACASSO, J. V.; PERECIN, D.; OLIVEIRA, M. C.; IZEPI, T. S. Resistance of Sugarcane Cultivars to *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 43, n. 1, p. 90–95, 2014.

ENKERLI, J.; KÖLLIKER, R.; KELLER, S.; WIDMER, F. Isolation and characterization of microsatellite markers from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 384–386, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Bethesda, v. 131, n. 2, p. 479–491, 1992.

FAO, FAOSTAT (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS). Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>>. Acesso: 1 out. 2015.

FREED, S.; JIN, F.-L.; REN, S.-X. Determination of genetic variability among the isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from different geographical origins. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 359–370, 2010.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GARCIA, J. F. **Bioecologia e manejo da cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae), em cana-de-açúcar**. 2006. 99 p.. Tese (Doutorado em Entomologia), Piracicaba. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

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

GARCIA, M. V. **Aplicação Do Fungo *Metarhizium Anisopliae* Em Pastagem Visando O Controle Do Carrapato *Boophilus Microplus* em Bovinos**. 2008. 45p.. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Jaboticabal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2008.

GOETTEL, M. S. ; INGLIS, G. D. **Fungi: Hyphomycetes**. Manual of Techniques in Insect Pathology (ed. by L. A. Lacey). San Diego: Academic Press, 1997. p. 213-249.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, New York, v. 315, n. 5813, p. 808-810, 2007.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95–98, 1999.

HU, G.; LEGER, R. J. S. Field Studies Using a Recombinant Mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) Reveal that It Is Rhizosphere Competent. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 12, p. 6383-7. 2002.

HUSSAIN, A.; AHMED, S.; SHAHID, M. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* for controlling subterranean termites. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 40, ed. 2, p. 244-250. 2011.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v.11, p.424-9, 1996.

KEPLER, R.M.; UGINE, T.A.; MAUL, J.E.; CAVIGELLI, M.A.; REHNER, S.A. Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.8, p.2791-2804. 2015.

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, 2013.

KHAN, A. L.; HAMAYUN, M.; KHAN, S. A.; SHINWARI, Z. K.; KAMRAN, M.; UR REHMAN, S.; KIM, J. G.; LEE, I. J. Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. **World journal of microbiology & biotechnology**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 1483–94, 2012.

KLINGEN, I.; HAUKELAND, S.; The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. In: EILENBERG, J.; HOKKANEN H.M.T (Eds). **An ecological and Societal Approach to Biological Control**, Dordrecht, v.2, p.145-211. 2006.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 2009.

LI Z., ALVES S. B., ROBERTS D. W., FAN M., DELALIBERA I., TANG J., LOPES R. B., FARIA M., RANGEL D. E. M. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their success using entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, London, v.20, p.117–136, 2010.

LOPES A.O. **Avaliação de métodos avançados de geração de energia elétrica na indústria de açúcar e bioenergia**. 2013. 66p. Dissertação (Mestrado em Agroenergia) - Escola de Economia de São Paulo, Fundação Getulio Vargas, São Paulo, 2013.

LOPES, R.B.; MESQUITA, A.L.M.; TIGANO, M.S.; SOUZA, D.A.; MARTINS, I.; FARIA, M. Diversity of indigenous *Beauveria* and *Metarhizium* spp. in a comercial banana field and their virulence toward *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). **Fungal Ecology**, Manchester, v. 6, n. 5, p. 356–364, 2013.

LOUREIRO, E.S.; FILHO, A.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MENDES, J.M. ; PESSOA, L.G.A. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* (metsch.) sorok. no controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae), em condições de campo. **Arquivos do Instituto Biológico**., São Paulo, v.79, n.1, p.47-53, 2012.

MAYERHOFER, J.; LUTZ, A.; WIDMER, F.; et al. Multiplexed microsatellite markers for seven *Metarhizium* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, Illinois, v. 132, p. 132–134, 2015.

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, 2006.

MEYLING, N.V., THORUP-KRISTENSEN, K., EILENBERG, J. Below- and above ground abundance and distribution of fungal entomopathogens in experimental conventional and organic cropping. **Bio Control**, Orlando, v.59, p.180–186. 2011.

MOITINHO, M. R., PADOVAN, M. P., PANOSSO, A. R., & LA SCALA JR, N. Efeito do preparo do solo e resíduo da colheita de cana-de-açúcar sobre a emissão de CO₂. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.37, p.1720-1728. 2013

NAKANO, O. **Entomologia econômica**. Piracicaba, 2011. 464 p.

NEI, M.; TAJIMA, F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. **Genetics**, Bethesda, v. 97, n. 1, p. 145–163, 1981.

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, 2011.

NOVARETTI, W.R.T.; PAIVA, L.A.; BELLUCCI, E.; PIVETTA, J.P.; JORGE, E.A.; CAMPOS, R.; NEME, L.H.F.M. Efeito da aplicação dos produtos Aldicarb 150G e Fipronil 800WG isolados ou em associação, no controle da cigarrinha das raízes da cana-de-açúcar. **STAB**, Piracicaba, v.19, p.42-46, 2001.

- ORLANDELLI, R.C.; PAMPHILE, J.A. fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* como agente de controle biológico de insetos pragas. **SaBios-Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v.6, n.2, p.79-82, 2011.
- OULEVEY, C.; WIDMER, F.; KÖLLIKER, R.; ENKERLI, J. An optimized microsatellite marker set for detection of *Metarhizium anisopliae* genotype diversity on field and regional scales. **Mycological research**, Cambridge, v. 113, n. Pt 9, p. 1016-24, 2009.
- PATTEMORE, J. A; HANE, J. K.; WILLIAMS, A. H.; et al. The genome sequence of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* and comparative genomics of *Metarhizium* species. **BMC genomics**, London, v. 15, n. 1, p. 660, 2014.
- PAVA-RIPOLL, M.; ANGELINI, C.; FANG, W. The rhizosphere-competent entomopathogen *Metarhizium anisopliae* expresses a specific subset of genes in plant root exudate. **Microbiology** (Reading, England), London, v. 157, n. Pt 1, p. 47-55, 2011.
- PÉREZ-GONZÁLEZ, V. H.; GUZMÁN-FRANCO, A. W.; ALATORRE-ROSAS, R.; et al. Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. **Journal of Invertebrate Pathology**, Illinois, v. 119, p. 54–61, 2014.
- QUINELATO, S.; GOLO, P.S.; PERINOTTO, W. M. S.; SÁ, F.A.; CAMARGO, M.G.; ANGELO, I. C.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Veterinary Parasitology**, Oxford, v. 190, n. 3/4, p. 556-565, 2012.
- RANGEL, D.E.N.; DETTENMAIER; S.J.; FERNANDES; E.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, 2010.
- RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture- independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in microbiology**, Paris, v. 151, n. 3, p. 167-77, 2000.
- RAVANELI, G.C.; MUTTON, M.J.R.; GARCIA, D.B.; STUPIELLO, J. P.; MUTTON, M.A. Danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes sobre a qualidade tecnológica da cana. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, Jaboticabal, v. 3, n. 1, p. 16-27, 2011.
- REZENDE, J.M.; ZANARDO, A.B.R.; LOPES, M.S.; DELALIBERA JR, I.; REHNER, S.A. Phylogenetic diversity of Brazilian *Metarhizium* associated with sugarcane agriculture. **BioControl**, Dordrecht, v. 60, n. 4, p. 495-505, 2015.
- REZENDE, J. M. **Diversidade filogenética e expressão de genes de virulência de *Metarhizium* com ênfase em isolados brasileiros associados a cultura da cana-de-açúcar**. 2014. p.138. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ROBERTS, D.W.; HAJEK, A.E. Entomopathogenic Fungi as Bioinsecticides. In: LEATHAM, F.G. **Frontiers in Industrial Mycology**. New York, 1992. p.144-159.

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. 251-9, 2012.

ROCHA, L.F.N.; TAIA, M.H.H.; SANTOS, A.H.; ALBERNAZA, D.A.S.; HUMBER, R.A.; LUZ, C. Occurrence of invertebrate-pathogenic fungi in a Cerrado ecosystem in Central Brazil. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 547–553, 2009.

ROGERS, J.S. **Measures of genetic similarity and genetic distances**. **Studies in Genetics**. Austin: Univ. Texas Publ, 1972. p.145-153..

SALLES, G.B.C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S.;BRONDANI, R.V. Marcadores Microsatélites em Espécies Vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 30, p.46-50. 2003.

SASAN, R. K.; BIDOCHKA, M. J. Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Lancaster, v. 35, n. 3, p. 288-293, 2013.

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**, Lancaster, v. 99, n. 1, p. 101–7, 2012.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers--just a matter of fashion? **Nature reviews. Genetics**, London, v. 5, n. 1, p. 63–69, 2004.

SCHNEIDER, S.; WIDMER, F.; JACOT, K.; KÖLLIKER, R.; ENKERLI, J. Spatial distribution of *Metarhizium* clade 1 in agricultural landscapes with arable land and different semi-natural habitats. **Applied Soil Ecology**, Firenze, v. 52, n. 1, p. 20–28, 2012.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature biotechnology**, London, v. 18, n. 2, p. 233-234, 2000.

SILVESTRO, D.; MICHALAK, I. RaxmlGUI: A graphical front-end for RAxML. **Organisms Diversity and Evolution**, Jena, v. 12, n. 4, p. 335–337, 2012.

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, 2008.

STEINWENDER, B. M.; ENKERLI, J.; WIDMER, F.; EILENBERG, J. Molecular diversity of the *Metarhizium anisopliae* lineage in an agricultural field. **Journal of Applied Entomology**, Washington, v. 66, p. 113–115, 2011.

STEINWENDER, B.M.; ENKERLI, J.; WIDMER, F.; EILENBERG, J.; KRISTENSEN, H.L.; BIDOCHKA, M.J.; MEYLING, N.V., Root isolations of *Metarhizium* spp. from crops reflect diversity in the soil and indicate no plant specificity, **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, No prelo, 2015.

STEINWENDER, B.M.; ENKERLI, J.; WIDMER, F.; EILENBERG, J.; THORUPKRISTENSEN, K.; MEYLING, N.V. Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 123, p. 6–12, 2014.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TEIXEIRA, V.M. **Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. no controle de cigarrinhas das pastagens (Homoptera: Cercopidae) em capim-marandu (*Brachiaria bryzantha*) em Corumbiara, Rondônia.** 2010. 55p. Dissertação (Agroecologia e Desenvolvimento Rural) - Universidade Federal de São Carlos. Araras.

TEMPLETON, A.R.; CRANDALL, K.A.; SING, C.F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, Bethesda, v. 132, n. 2, p. 619–633, 1992.

TKACZUK, C.; KRÓL, A.; MAJCHROWSKA-SAFARYAN, A.; NICEWICZ, Ł. The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from fields cultivated in a conventional and organic system. **Journal of Ecological Engineering**, Poland, v. 15, n. 4, p. 137–144, 2014.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. 2012). Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/871626920312979436/liderancas-do-setor-sucroenergetico-cobram-politicas-publicas-em-audiencia-no-senado/>>. Acesso: 5 out. 2015.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. 2014). Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/21209732920310621254/novo-programa-de-inovacao-em-cana-de-acucar-visa-ganhos-de-productividade/>>. Acesso: 5 out. 2015.

VEGA, F. E. Insect pathology and fungal endophytes. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 98, n. 3, p. 277–279, 2008.

VELÁSQUEZ, V.B.; CÁRCAMO, M.P.; MERIÑO, C.R.; IGLESIAS, A.F.; DURÁN, J.F. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 1, p. 89–99, 2007.

WANG, C.; FAN, M.; LI, Z.; BUTT, T. M. Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 96, n. 4, p. 861–870, 2004.

WYREBEK, M.; HUBER, C.; SASAN, R.K.; BIDOCHKA, M.J. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. **Microbiology**, Reading, v. 157, p. 2904–2911, 2011.

ZANARDO, A. B. R. **Abundância de fungos entomopatogênicos da ordem Hypocreales e diversidade genética de *Metarhizium* spp. isolados de amostras de solo de áreas representativas de cinco biomas brasileiros.** 2015. 154 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

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

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 17, n. 9, p. 879–920, 2007.

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

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC. utilizando marcadores de RAPD e SSR.** 2002. 130p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ANEXO

ANEXO A- Descrição dos isolados (n= 77) de *Metarhizium* sp. sequenciados com a região nuclear 5'-TEF, incluindo código de acesso à Coleção de Entomopatógenos "Prof. Sérgio Batista Alves" da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil, origem de coleta, área do canavial em Iracemópolis/SP onde foram coletados e data de coleta

(continua)

Espécie	Código	Origem	Área	Data
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 4961	Solo	Sem aplicação	09/10/2014
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 4978	Solo	Sem aplicação	09/10/2014
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 4992	Solo	Sem aplicação	09/10/2014
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5289	Raiz	Sem aplicação	09/10/2014
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5290	Solo	Sem aplicação	09/10/2014
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 4985	Solo	Sem aplicação	09/10/2014
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 4993	Solo	Sem aplicação	09/10/2014
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5032	Solo	Com aplicação	09/10/2014
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5001	Solo	Com aplicação	09/10/2014
<i>M. brunneum</i>	ESALQ 5022	Solo	Com aplicação	09/10/2014
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5291	Solo	Com aplicação	09/10/2014
<i>M. brunneum</i>	ESALQ 4999	Solo	Com aplicação	09/10/2014
<i>M. brunneum</i>	ESALQ 5038	Solo	Com aplicação	09/10/2014
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5060	Solo	Sem aplicação	09/10/2014
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5064	Solo	Sem aplicação	09/10/2014
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5070	Raiz	Sem aplicação	09/10/2014
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5077	Solo	Sem aplicação	09/10/2014
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5120	Inseto	Com aplicação	16/01/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5129	Inseto	Com aplicação	16/01/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5144	Inseto	Com aplicação	16/01/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5146	Inseto	Com aplicação	16/01/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5151	Inseto	Com aplicação	16/01/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5154	Inseto	Com aplicação	16/01/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5157	Inseto	Com aplicação	16/01/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5163	Inseto	Com aplicação	16/01/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5165	Inseto	Com aplicação	16/01/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5168	Inseto	Com aplicação	12/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5240	Solo	Sem aplicação	09/10/2014
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5179	Solo	Sem aplicação	09/10/2014
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5178	Solo	Sem aplicação	09/10/2014
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5241	Solo	Sem aplicação	09/10/2014
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5242	Solo	Sem aplicação	09/10/2014
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5243	Inseto	Com aplicação	12/03/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5244	Inseto	Com aplicação	12/03/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5245	Inseto	Com aplicação	12/03/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5246	Inseto	Com aplicação	12/03/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5247	Solo	Com aplicação	09/02/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5248	Raiz	Com aplicação	09/02/2015
<i>M. brunneum</i>	ESALQ 5181	Raiz	Com aplicação	09/02/2015

ANEXO A- Descrição dos isolados (n= 77) de *Metarhizium* sp. sequenciados com a região nuclear 5'-TEF, incluindo código de acesso à Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil, origem de coleta, área do canavial em Iracemápolis/SP onde foram coletados e data de coleta

(conclusão)

Espécie	Código	Origem	Área	Data
<i>M. brunneum</i>	ESALQ 5249	Raiz	Com aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5250	Solo	Com aplicação	09/02/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5251	Raiz	Com aplicação	09/02/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5252	Solo	Com aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5253	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5254	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5255	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5256	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5257	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5172	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5258	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5259	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5260	Solo	Com aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5261	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5262	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5263	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5264	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5265	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5266	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5267	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5268	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5269	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5270	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5272	Solo	Com aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5273	Solo	Sem aplicação	09/02/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5274	Solo	Sem aplicação	10/04/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5275	Solo	Sem aplicação	10/04/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5276	Solo	Sem aplicação	10/04/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5277	Solo	Sem aplicação	10/04/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5278	Solo	Sem aplicação	10/04/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5279	Solo	Sem aplicação	10/04/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5280	Solo	Sem aplicação	10/04/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5281	Solo	Sem aplicação	10/04/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5282	Solo	Sem aplicação	10/04/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5283	Solo	Com aplicação	10/04/2015
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 5284	Solo	Com aplicação	10/04/2015
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 5285	Solo	Com aplicação	10/04/2015
<i>M. brunneum</i>	ESALQ 5286	Solo	Com aplicação	10/04/2015